

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**REGULACIÓN NERVIOSA DE LA DEPRESIÓN Y ANSIEDAD
EN RATAS CON SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA,
TRATADAS CON TIANEPTINA**

por

Biol. Verónica Trujillo

Directora: Marta Magdalena Suárez

Cátedra de Fisiología Animal - Departamento de Fisiología - Escuela de Biología

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dra. Marta Suárez, Cátedra de Fisiología Animal, FCEFyN, UNC. Córdoba, Argentina

Dr. Daniel Mascó, Centro de Biología Molecular y Celular (CEBICEM), FCEFyN, UNC. - Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, CONICET. Córdoba, Argentina

Dra. Flavia Saravia, Laboratorio de Neurobiología, FCEyN, U.B.A - Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET. Buenos Aires, Argentina

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- Trujillo V., Masseroni M.L., Levin G. y Suárez M.M. (2009). Tianeptine influence on plasmatic catecholamine levels and anxiety index in rats under variable chronic stress after early maternal separation. *International Journal of Neuroscience* 119(8):1210-1127.
- Zalosnik M.I., Pollano A., Trujillo V., Suárez M.M., Durando P.E. (2014). Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: evidence for the match-mismatch hypothesis. *Stress* 17(5):445-450.

ÍNDICE

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	3
1. Introducción	5
1.1. Depresión	6
1.2. Ansiedad	10
1.3. Estrés	11
1.4. Modelo Animal de Depresión	16
1.5. Circuito de Motivación.....	19
1.6. Separación Materna Temprana	23
1.7. Antidepresivo: Tianeptina	31
2. Objetivos.....	34
2.1. Objetivo General	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. Materiales y Métodos	37
3.1. Animales	38
3.2. Separación Materna	40
3.3. Modelo de Depresión	40
3.4. Antidepresivo	41
3.5. Determinación de Corticosterona	41
3.5.1. Extracción de sangre	41
3.5.2. Grupos CM+V y CM+E+V	42
3.5.3. En los demás grupos	42
3.6. Índices de Anhedonia	43
3.7. Índices de Ansiedad	43
3.8. Inmunohistoquímica.....	44
3.8.1. Obtención de los cerebros	44
3.8.2. Obtención de los cortes	44
3.8.3. Inmunomarcación	45
3.8.4. Montaje	45
3.8.5. Visualización	45
3.8.6. Cuantificación	46
3.9. Método Estadístico	46
3.9.1. Corticosterona plasmática	46
3.9.2. Índices de anhedonia	46
3.9.3. Índices de ansiedad	46
3.9.4. Neuronas inmunoreactivas a GR, MR y Fos	47

4. Resultados	48
4.1. Corticosterona Plasmática	49
4.2. Conducta	51
4.2.1. Índices de ansiedad	51
4.2.2. Índices de anhedonia	52
4.3. Núcleo Paraventricular	55
4.3.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a GR	55
4.3.2. Determinación de neuronas inmunoreactivas a MR	55
4.3.3. Balance MR/GR	57
4.3.4. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos	57
4.4. Hipocampo Dorsal	59
4.4.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a GR	59
4.4.2. Determinación de neuronas inmunoreactivas a MR	61
4.4.3. Balance MR/GR	63
4.4.4. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos	65
4.5. Amígdala	67
4.5.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a GR	59
4.5.2. Determinación de neuronas inmunoreactivas a MR	61
4.5.3. Balance MR/GR	63
4.5.4. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos	65
4.6. Corteza Prefrontal Medial	71
4.6.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos	71
4.7. Núcleo Accumbens	73
4.7.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos	73
4.8. Área Tegmental Ventral	74
4.8.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos	74
5. Discusión	75
5.1. Corticosterona	76
5.2. Conducta	78
5.2.1. Índices de ansiedad.....	78
5.2.2. Índices de anhedonia	79
5.3. Núcleo Paraventricular	82
5.4. Hipocampo	85
5.5. Amígdala	92
5.6. Corteza Prefrontal Medial	95
5.7. Núcleo Accumbens	98
5.8. Área Tegmental Ventral	100
5.9. Consideraciones Finales	102
6. Conclusión	106
7. Bibliografía	109

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y su regulación.....	12
Figura 2: Circuito de recompensa mesocorticolímbico.....	20
Figura 3: Diferencias en la capacidad adaptativa individuos con diferente susceptibilidad genética a las influencias ambientales.....	28
Figura 4: Hipótesis de los 3 golpes.....	29
Figura 5: Estructura química de tianeptina.....	31
Tabla 1: Grupos experimentales.....	39
Figura 6: Procedimientos experimentales.....	40
Figura 7: Aparato de la Laberinto en Cruz Elevada.....	44
Figura 8: Niveles de corticosterona plasmática.....	49
Figura 9: Test de ansiedad - <i>Plus Maze</i> -.....	51
Figura 10: Índices de anhedonia.....	53
Figura 11: Inmunoreactividad a GR en núcleo paraventricular.....	55
Figura 12: Inmunoreactividad a MR en núcleo paraventricular.....	56
Figura 13: Balance MR/GR en núcleo paraventricular.....	57
Figura 14: Inmunoreactividad a Fos en núcleo paraventricular.....	58
Figura 15: Inmunoreactividad a GR en hipocampo dorsal.....	59
Figura 16: Fotografías representativas de las neuronas inmunoreactivas a GR en hipocampo dorsal.....	60
Figura 17: Inmunoreactividad a GR en hipocampo dorsal.....	62
Figura 18: Fotografías representativas de las neuronas inmunoreactivas a MR en hipocampo dorsal.....	63
Figura 19: Balance MR/GR en hipocampo dorsal.....	64
Figura 20: Inmunoreactividad a Fos en hipocampo dorsal.....	65
Figura 21: Fotografías representativas de las neuronas inmunoreactivas a Fos en hipocampo dorsal.....	66
Figura 22: Inmunoreactividad a GR en amígdala.....	67
Figura 23: Inmunoreactividad a MR en amígdala.....	68
Figura 24: Balance MR/GR en amígdala.....	69
Figura 25: Inmunoreactividad a Fos en amígdala.....	70
Figura 26: Inmunoreactividad a Fos en corteza prefrontal.....	72
Figura 27: Inmunoreactividad a Fos en núcleo accumbens.....	73
Figura 28: Inmunoreactividad a Fos en área tegmental ventral.....	74

RESUMEN

Las situaciones estresantes crónicas, a menudo acompañadas de una desregulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA) e hipercortisolemia, pueden desencadenar episodios depresivos y/o desordenes de ansiedad. La anhedonia o pérdida de interés es un síntoma central de la depresión y es controlada a nivel central por el sistema de recompensa mesocorticolímbico. Además, los eventos de la vida temprana pueden producir alteraciones persistentes en circuitos neuronales específicos que controlan la respuesta de estrés y la conducta emocional, confiriéndoles a los individuos vulnerabilidad o resiliencia al estrés en la vida adulta.

En este trabajo, se analizó si la separación materna temprana y el estrés crónico variable en el adulto y/o su interacción, afectan la inmunoreactividad de las neuronas que expresan receptores de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR), y el balance MR/GR en el hipocampo dorsal, núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y núcleos medial y central de la amígdala, estructuras cerebrales participantes de la regulación de la respuesta de estrés. Además, se analizó si estos tratamientos modifican la actividad neuronal, medida a través de la inmunoreactividad a Fos, en las estructuras antes mencionadas y también en núcleo accumbens (NAc), corteza prefrontal medial (CPFm) y área tegmental ventral (ATV), estructuras pertenecientes al circuito de recompensa mesocorticolímbico. Por otro lado, para indagar si estas alteraciones a nivel central se manifiestan con cambios endócrinos y conductuales, se determinaron los niveles plasmáticos de corticosterona y se evaluaron índices de ansiedad y conducta hedónica. Finalmente, nos propusimos analizar si el tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico tianeptina previene o revierte los posibles cambios neuroendócrinos y conductuales provocados por los tratamientos de estrés crónico y separación materna.

Todos los grupos sometidos a separación, estrés o a la interacción de ambos tratamientos presentaron una sobre-activación del eje HHA, lo cual fue atenuado por el tratamiento con tianeptina. Mientras que, el balance MR/GR fue aumentado por la separación materna en el NPV y disminuido en el giro dentado hipocampal de animales no estresados y tratados con tianeptina. Además en los animales estresados, la corticosterona aumentó, y esto fue atenuado tanto por el tratamiento previo de separación materna como el tratamiento simultaneo con el antidepresivo. Por otro lado, en los animales estresados, ya sea criados o separados de la madre, disminuyó la actividad neuronal de la CPFm, mientras que ésta no fue afectada por la droga utilizada. En cambio en el ATV sólo se observó efecto de la droga, la cual disminuyó la actividad neuronal en esta estructura. Tanto la separación como el estrés tuvieron un efecto ansiogénico, el cual fue atenuado por el tratamiento con tianeptina. Por último la actividad neuronal del NAc y los índices de anhedonia no fueron afectados significativamente con ninguno de los tratamientos.

En conclusión, nuestros resultados muestran que los eventos de la vida temprana producen alteraciones en la regulación de la respuesta de estrés en el adulto y que el tratamiento con tianeptina produce cambios a nivel central y conductual tendientes a atenuar la desregulación del eje HHA y las modificaciones conductuales, alterados en la depresión.

SUMMARY

Chronic stress, often associated with hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysregulation and hypercortisolism, may trigger episodes of depression and / or anxiety disorders. Anhedonia or loss of interest is a core symptom of depression and it is modulated in the brain by the mesocorticolimbic reward system. In addition, early life events can produce persistent alterations in specific neural circuits that control stress response and emotional behavior, resulting in vulnerability or resilience to stress in later life.

The aim of this study was to analyze whether early maternal separation and variable chronic stress in adults and / or their interaction, would alter immunoreactivity of neurons that express glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors, and MR/GR balance in dorsal hippocampus, paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and medial and central nucleus of the amygdala, key structures involved in stress response regulation. In addition, we analyzed whether these treatments modify the neuronal activity evaluated by the immunoreactivity to Fos, in the structures named above and also in nucleus accumbens (NAc), medial prefrontal cortex (mPFC) and ventral tegmental area (VTA), structures of the mesocorticolimbic reward circuits. Furthermore, to investigate whether these central alterations are linked to endocrine and behavioral changes, we determined the plasmatic corticosterone levels and evaluated anxiety indexes and hedonic behavior. Finally, we analyzed whether chronic treatment with the tricyclic antidepressant tianeptine prevents or reverses the possible neuroendocrine and behavioral changes caused by chronic stress and maternal separation.

All groups subjected to maternal separation, stress or their interaction, showed over-activation of the HPA axis, which was attenuated by tianeptine treatment. While MR/GR imbalance was increased by maternal separation in PVN and was decreased in dentate gyrus of hippocampus of unstressed and tianeptine-treated animals. Also in stressed animals, corticosterone increased, and this was attenuated by both pretreatment of maternal separation and simultaneous treatment with the antidepressant. Moreover, on stressed animals, independently from the early treatment, neuronal activity of mPFC decreased, whereas this was not affected by the drug. In contrast, tianeptine administration decreased neuronal activity in the VTA. On the other hand, maternal separation and chronic stress had an anxiogenic-like effect, which was attenuated by tianeptine treatment. Lastly, neuronal activity of NAc and anhedonia indexes were not significantly affected by any treatments.

In summary, our results support the view that early life events induce changes on the regulation of the stress response in adults and that treatment with tianeptine produces alterations at the central and behavioral levels leading to attenuate HPA dysregulation and behavioral changes, altered in depression.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEPRESIÓN

La depresión es uno de los desórdenes que produce mayor sufrimiento emocional y físico a las personas que la padecen. Constituye un gran problema de salud pública, siendo la principal causa de discapacidad ya que es una de las enfermedades que origina una marcada disminución de funciones físicas, sociales y laborales (American Psychiatric Association 2013; WHO 2001). De acuerdo al informe del año 2001 de la organización mundial de la salud (WHO 2001), la prevalencia de esta enfermedad era de 1,9 % para hombres y del 3,2% para mujeres; además se estimó que el 5,8% de los hombres y el 9,5 % de las mujeres experimentarían un episodio de depresión en un periodo de 12 meses. En la última década, la prevalencia global de esta afección se ha incrementado (Al-Qadhi y col. 2014).

La depresión mayor es un desorden caracterizado por episodios discretos, en donde el individuo presenta un prolongado estado de ánimo deprimido y/o anhedonia (pérdida de interés o placer en todas o casi todas las actividades), junto con otros síntomas psicológicos, fisiológicos y conductuales que incluyen desórdenes alimenticios, alteraciones del sueño, alteraciones psicomotrices, fatiga, sentimientos excesivos de auto-reproche y culpa, deterioro cognitivo, indecisión, pensamientos recurrentes de muerte, ideación frecuente de suicidio e intento de suicidio. Para ser considerado como un desorden de depresión mayor, se deben presentar al menos 5 de estos síntomas y uno de ellos debe ser anhedonia o ánimo deprimido. Además, los síntomas deben estar presentes la mayor parte del tiempo, casi todos los días, durante por lo menos 2 semanas y causarle al individuo una angustia significativa, afectando seriamente su capacidad funcional (producir deterioro social, ocupacional, etc.). Este desorden es generalmente recurrente y crónico, involucrando ciertos periodos de remisión (American Psychiatric Association 2013; Baker y col. 2006; McArthur y Borsini 2006).

Más allá de la variabilidad de síntomas que pueden relacionarse a la depresión, la pérdida de interés o placer está casi siempre presente, al menos en algún grado. Esto implica que los individuos se sienten menos interesados en pasatiempos o dejan de disfrutar actividades que anteriormente consideraban placenteras (American Psychiatric Association 2013; Baker y col. 2006). En el otro extremo se encuentran los disturbios psicomotores que son mucho menos comunes que los demás síntomas (American Psychiatric Association 2013).

A pesar de la cantidad de estudios clínicos y preclínicos realizados sobre depresión, aún se desconocen los procesos neurobiológicos exactos que llevan a esta afección, así como los

mecanismos que subyacen a los efectos terapéuticos de las drogas antidepresivas (Duman y col. 1999; Fuchs y col. 2004; Lucassen y col. 2004; Manji y col. 2001).

Las hipótesis clásicas sobre la patofisiología de la depresión, señalan al sistema de neurotransmisión monoaminérgico como el principal afectado. Numerosas investigaciones clínicas desde hace más de 50 años han demostrado, en pacientes depresivos, varias anormalidades de los sistemas serotoninérgico (5-HTérgico) y noradrenérgico (NAérgico), como también de otros neurotransmisores (NTs) y neuropéptidos a través de una variedad de estudios bioquímicos y neuroendocrinos, por ejemplo el análisis del líquido cefalorraquídeo, de la respuesta neuroendocrina a fármacos y de la unión a neuroreceptores (Fuchs y col. 2004; Lucassen y col. 2004; Manji y col. 2001). De acuerdo a esto, la patogénesis de la depresión se relacionaría con un desbalance entre los sistemas 5-HTérgico, NAérgico y dopaminérgico (DAérgico) (Oglodek y col. 2014). Otro dato que implica a las monoaminas en la depresión, es que este sistema está extensamente distribuido a través de los circuitos neuronales límbicos, estriatales y corticales, lo que podría constituir la base de las manifestaciones fisiológicas y conductuales presentes en los desórdenes afectivos (Manji y col. 2001). Además, se ha observado que las drogas antidepresivas ejercen sus efectos bioquímicos principales regulando las concentraciones intrasinápticas aberrantes de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) (Fuchs y col. 2004; Lucassen y col. 2004; Manji y col. 2001). Por otro lado, el tratamiento con antihipertensivos, los cuales producen depleción de monoaminas, pueden precipitar episodios depresivos en individuos susceptibles (Manji y col. 2001).

Otro anomalía ampliamente estudiada por su implicancia en la patofisiología de la depresión es la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA), la cual parece estar asociada con melancolía, rasgos psicóticos y riesgo de suicidio (American Psychiatric Association 2013; Taylor y col. 2005). Las alteraciones de este sistema pueden incluir tanto el aumento en los niveles de CRH como el deterioro de los mecanismos de retroalimentación negativa de los glucocorticoides (GC) (Taylor y col. 2005).

Sin embargo, aunque la mayoría de los antidepresivos ejercen sus efectos iniciales rápidamente, incrementando los niveles intrasinápticos de 5-HT y/o NA, sus efectos terapéuticos requieren la administración crónica, durante días o semanas. Esto sugiere que, la cascada de efectos corriente abajo (*downstream*) es en última instancia, la responsable de sus acciones antidepresivas clínicas. Esas observaciones indican que, aunque la disfunción de los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos sería un importante mediador de algunos

CRH = hormona liberadora de corticotrofina

aspectos patofisiológicos de la depresión, probablemente los mecanismos que subyacen la acción terapéutica de los antidepresivos, al igual que la etiología de la depresión, son mucho más complejo que un simple cambio en los niveles sinápticos de monoaminas (Duman y col. 1999; Manji y col. 2001).

Teniendo en cuenta esto, se han desarrollado otras hipótesis, las cuales proponen que la depresión estaría asociada con la disfunción de los mecanismos normales que involucran la plasticidad neuronal. Así, el deterioro de la plasticidad estructural y celular del sistema nervioso podría resultar en la incapacidad de producir respuestas adaptativas apropiadas a estrés u otros estímulos aversivos (Duman y col. 1999; Fuchs y col. 2004; Lucassen y col. 2004; Manji y col. 2001). Numerosas investigaciones han estudiado las vías de señalización intracelular involucradas en eventos de neuroplasticidad, que regulan tanto procesos cognitivos y psicológicos como también funciones vegetativas tales como apetito y vigilia (Manji y Lenox 2000). En este sentido, se conoce la contribución de la 5-HT a la neurogénesis y sobrevida celular, ya que estimula la producción de BDNF, el cual participa activamente en esos eventos (Alenina y Klempin 2014; Oglodek y col. 2014). Por otro lado, la acción de los antidepresivos y del litio sobre la plasticidad neuronal es conocida hace mucho tiempo (Manji y Lenox 2000). Entonces, de acuerdo con estas hipótesis, los antidepresivos afectarían las vías de señalización intracelular que regulan la neuroplasticidad y la sobrevida celular, para normalizar las alteraciones presentes en la depresión (Duman y col. 1999; Fuchs y col. 2004; Lucassen y col. 2004; Manji y col. 2001).

Imágenes de resonancia magnética (MRI) y estudios histopatológicos post-mortem de pacientes depresivos han mostrado reducción del volumen de la corteza prefrontal (CPF), hipocampo y amígdala. Además, en tales pacientes, se han encontrado cambios funcionales en el flujo sanguíneo cerebral y en el metabolismo de la glucosa en hipocampo y amígdala (X. Cao y col. 2012; Fuchs y col. 2004; Manji y col. 2001; McEwen y Chattarji 2004; Sheline y col. 2003; Wise y col. 2014). Se ha observado que las neuronas hipocampales, en particular, muestran una gran plasticidad y en el individuo adulto el principal lugar donde ocurre neurogénesis es en el giro dentado (GD) hipocampal (Czeh y col. 2001; Fuchs y col. 2004). Numerosos estudios preclínicos involucran a la neurogénesis y al volumen hipocampal en la etiología de la depresión, además se ha evaluado que el estrés induce una reorganización morfológica en el hipocampo a través del remodelado reversible de dendritas apicales de las neuronas piramidales en CA3 (Czeh y col. 2001; Fuchs y col. 2004; Magariños y col. 1999).

5-HT = serotonina || **BDNF** = factor neurotrófico derivado del cerebro

Por el contrario, los antidepresivos y la terapia electroconvulsiva han demostrado incrementar la neurogénesis y el volumen hipocampal, revirtiendo en cierta medida, el efecto del estrés prolongado (Czeh y col. 2001; Chen y col. 2009, 2010; Kaae y col. 2012).

Recientemente, estudios de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI) y por tomografía de emisión de positrones (PET) en adultos con depresión, han aportado evidencias sobre anomalías funcionales en sistemas neuronales relacionados con el procesamiento y regulación de las emociones, la interpretación de estímulos negativos y la búsqueda de recompensas (American Psychiatric Association 2013; Hamilton y col. 2013). Dentro de las estructuras que se han observado alteradas en estos pacientes, se incluye la corteza prefrontal medial (CPFm) y dorsolateral (CPFdl), la corteza cingulada anterior (CCA) y posterior (CCP), la corteza parahipocampal, la amígdala y la ínsula anterior (Hamilton y col. 2013).

1.2. ANSIEDAD

La depresión se encuentra frecuentemente comorbida con desórdenes de ansiedad, probablemente debido a que estas alteraciones comparten factores de riesgo tanto de personalidad como genéticos y ambientales, si bien también pueden producirse independientemente (American Psychiatric Association 2013).

La ansiedad es la respuesta de anticipación a una amenaza futura. Se encuentra asociada con tensión muscular y alerta en preparación para enfrentar a posibles daños y también con precaución y conductas de evitación. En los trastornos de ansiedad, además de una ansiedad aumentada, se pueden presentar otros síntomas, como preocupación excesiva, agitación, nerviosismo, fatiga, dificultad para concentrarse, irritabilidad, tensión muscular y alteraciones del sueño (American Psychiatric Association 2013).

El sistema 5-HTérgico ha sido implicado en la patofisiología de la ansiedad. Los agonistas del receptor 5-HT_{1A} son usados habitualmente como ansiolíticos en ratones, además la ansiedad se ha asociado con una downregulation de los receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo y en el lóbulo temporal. Este receptor, de efecto inhibitorio, se encuentra como receptor postsináptico en neuronas del procencéfalo y también como autoreceptor presináptico en las neuronas 5-HTérgicas del núcleo del rafe (Taylor y col. 2005). Así, se ha demostrado que la administración de un agonista 5-HT_{1A} dentro del núcleo medial del rafe tiene efectos ansiolíticos, mientras que, su administración dentro del hipocampo dorsal produce efectos ansiogénicos (File y col. 1996).

También se ha sugerido que el sistema 5-HTérgico y el eje HHA interactúan entre sí para mediar la respuesta de ansiedad. Con respecto a esto, se ha observado que en ratas, el pretratamiento con un agonista 5-HT_{1A} previno el aumento de ansiedad provocado por la administración i.c.v. de CRH. Mientras que la utilización tanto de un antagonista del receptor de CRH, como de un agonista 5-HT_{1A} inhibieron el aumento de 5-HT en el hipocampo ventral, producido por CRH i.c.v. Estos resultados indican que los efectos ansiogénicos del CRH se deberían a la facilitación de la liberación de 5-HT, al menos, en el hipocampo ventral (Kagamiishi y col. 2003).

5-HTérgico/as = serotoninérgico/as || **5-HT_{1A}** = receptor 1A de serotonina || **HHA** = hipotálamo-hipófiso-adrenal
i.c.v. = intracerebroventricular || **CRH** = hormona liberadora de corticotrofina || **5-HT** = serotonina

1.3. ESTRÉS

Existen numerosas evidencias clínicas de que a menudo el comienzo de episodios depresivos se encuentra relacionado con eventos estresantes (Kendler y col. 1999; Kendler y col. 2000; Kessler 1997). Además tanto en la depresión como en el estrés crónico (EC) se ha observado una desregulación del eje HHA, asociada a hipercortisolemia y elevados niveles de ACTH (Wong y col. 2000; Young y col. 2004).

Una respuesta de estrés es generada ante una amenaza, real o percibida, a la integridad fisiológica y psicológica de un organismo, con el objetivo de restaurar la homeostasis a través de adaptaciones fisiológicas y conductuales (McEwen 2000). En una situación de estrés, el estímulo estresante es percibido y valorado, luego esa información se procesa y por último, se genera la respuesta de estrés. Estos 3 componentes interactúan entre si y se auto-regulan por retroalimentación (Levine 2005). El proceso activo por el cual los organismos vivos se adaptan a potenciales amenazas y a cambios ambientales (*estresores*) para mantener la homeostasis y promover la supervivencia se conoce como alostasis (McEwen y Gianaros 2011). Los sistemas simpático-médula adrenal (SMA) e HHA son esenciales para la respuesta de estrés. Estos sistemas actúan conjuntamente y ejercen entre si un mutuo control, siendo las acciones producidas por la activación del eje HHA más lentas y más persistentes (De Kloet y col. 1998).

Bajo condiciones estresantes las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) secretan CRH y AVP, estas hormonas estimulan a la hipófisis anterior para que secrete ACTH, la que a su vez estimula la liberación de GC (corticosterona en la rata y principalmente cortisol en el humano) desde la corteza adrenal (fig. 1). Los GC producen varios efectos metabólicos y fisiológicos con el fin de movilizar la energía necesaria para una respuesta de estrés adaptativa e inmediata. Además, participan en la modulación de la respuesta inmune, los procesos cognitivos y las emociones (especialmente miedo y ansiedad), permitiéndole al individuo afrontar y adaptarse a la situación y preparándolo para el futuro (Girotti y col. 2006; Heuser y Lammers 2003; Taylor y col. 2005). Los GC son secretados en pulsos, aproximadamente cada 1 hora, con una mayor amplitud alrededor del pico circadiano (al despertar). Además de esas variaciones en los ritmos ultradianos y circadianos, las concentraciones de corticosterona (CORT) pueden aumentar hasta 100 veces luego de la exposición a estrés (de Kloet 2013).

HHA = hipotálamo-hipófisis-adrenal || **ACTH** = hormona adrenocorticotrofa || **CRH** = hormona liberadora de corticotrofina
AVP = arginina vasopresina || **GC** = glucocorticoides

Los *estresores* físicos activan directamente el sistema nervioso simpático y el eje HHA. En cambio los *estresores* psicológicos necesitan ser procesados en estructuras límbicas y su intensidad depende de la predictibilidad (involucrada en el comienzo de la respuesta) y de la posibilidad de controlarlos (determinante en la progresión y duración de la reacción). Además la magnitud y duración de la respuesta de estrés depende de las interacciones sociales, el género, la personalidad y la valoración del *estresor*, para lo cual es fundamental la experiencia previa (de Kloet 2013).

El eje HHA se encuentra bajo una estrecha regulación (fig. 1), ejercida por retroalimentación de la CORT sobre las áreas del cerebro que inicialmente desencadenan su liberación, incluyendo amígdala, hipocampo, NPV, septum y CPF (de Kloet 2013; Taylor y col. 2005). Esta retroalimentación puede ser positiva o negativa. La CORT ejerce una retroalimentación positiva al incrementar la expresión de CRH en la amígdala, principalmente en los núcleos medial (MeA) y central (CeA) (Herman y col. 2005). También actuando en neuronas dopaminoceptivas del circuito núcleo accumbens (NAc)-área tegmental ventral (ATV), el cual activa las neuronas DAérgicas del ATV, involucradas en el procesamiento de estrés psicológico (Barik y col. 2013). Por supuesto, existe además una retroalimentación negativa de la CORT, ejercida al actuar sobre el eje HHA y sobre el hipocampo (de Kloet 2013).

Los efectos de los GC en el cerebro están mediados por 2 tipos de receptores: el receptor de mineralocorticoides (MR) y el receptor de glucocorticoides (GR), los cuales actúan en el núcleo celular como factores de transcripción genética (de Kloet 2013). Los GR y MR están ampliamente distribuidos en el cerebro, y son particularmente abundantes en el NPV, hipófisis anterior, hipocampo, septum y amígdala (Taylor y col. 2005). Debido a que los GR tienen 10 veces menor afinidad para la CORT que los MR (Reul y de Kloet 1985), son ocupados sólo con altos niveles de la hormona, alcanzados luego de una situación de estrés o en los picos circadianos y ultradianos. En otras palabras, la ocupación de los MR por GC es tónica, mientras que la de los GR es transitoria (de Kloet 2013; Reul y de Kloet 1985). Estos mismos receptores, poseen también acciones rápidas no genómicas a nivel de la membrana celular, aunque con una menor afinidad por la CORT que los receptores citoplasmáticos (Karst y col. 2005; Karst y col. 2010). Los MR de membrana favorecen la neurotransmisión

HHA = hipotálamo-hipófisis-adrenal || **CORT** = corticosterona || **NPV** = núcleo paraventricular || **CPF** = corteza prefrontal
CRH = hormona liberadora de corticotrofina || **DAérgicas** = dopaminérgicas || **GC** = glucocorticoides

excitadora, mientras que, los GR tienen mayormente una influencia inhibitoria (de Kloet 2013).

La CORT coordina una enorme diversidad de acciones y es capaz de modular tanto el comienzo como la terminación de la respuesta de estrés. Actuando en concentraciones bajas, y por lo tanto con acciones mediadas preferentemente por MR, la CORT normaliza el metabolismo energético, la neurogénesis y la plasticidad neuronal. En cambio, bajo condiciones estresantes esta hormona, actuando por la vía rápida, a través de los MR de membrana, modula la valoración del *estresor*, la selección de la respuesta conductual más apropiada y el umbral o sensibilidad del sistema de estrés. Siendo por lo tanto importante para el comienzo de las reacciones de estrés. Subsecuentemente, vía acciones inhibitorias mediadas por GR, la CORT previene que esas reacciones iniciales no sean excesivas, produciendo la supresión de su propia secreción para retornar nuevamente a las condiciones basales. Así, las acciones mediadas por GR están relacionadas al control de la situación de estrés y a la recuperación del efecto que produjo el *estresor*. Al mismo tiempo, la activación de los GR, promueve el almacenamiento de la experiencia en la memoria y por lo tanto la preparación para el futuro. Por último, principalmente vía GR, la CORT también provee la energía para esos procesos adaptativos (de Kloet 2013).

Dado que los GR y MR actúan de manera complementaria, la activación de ambos tipos de receptores necesita operar en balance para controlar la plasticidad, resiliencia y adaptación al estrés. La hipótesis del balance MR/GR predice que, luego de un desbalance en las vías de señalización de estos receptores, a causa de estrés, de exposición aberrante a CORT o de variaciones genéticas del receptor, la respuesta a estresores será menos coordinada. Esto puede llevar a la desregulación del eje HHA y a una inadecuada adaptación conductual, promoviendo la vulnerabilidad a la neurodegeneración y a desórdenes mentales relacionados al estrés (de Kloet y col. 2005).

Cuando ocurre una desregulación del eje HHA, se producen niveles aberrantes de GC; esto ocurre comúnmente durante el EC (Suárez y Perassi 1994; Suárez y col. 1996; Suárez y Perassi 1997; Suárez y col. 1999). La exposición prolongada a elevados niveles de hormonas del estrés es dañina para el organismo y representa un factor de riesgo para muchas enfermedades físicas y mentales (Barden y col. 1995; Gold y Chrousos 2002; Taylor y col. 2005). Un individuo expuesto a EC desarrolla numerosas alteraciones, algunas de las cuales

GR = receptor de glucocorticoides || CORT = corticosterona || MR = receptor de mineralocorticoides
HHA = hipotálamo-hipófisis-adrenal || GC = glucocorticoides || EC = estrés crónico

son: incremento del peso de las adrenales (Suárez y col. 1996); disminución del timo; atrofia de las capas piramidales del hipocampo y de áreas de la corteza prefrontal; incremento del número y tamaño de la arborización dendrítica y de los botones sinápticos en la amígdala (McEwen 2007; Vyas y col. 2002); disminución de la neurogénesis, diferenciación y sobrevivencia celular en circuitos hipocámpales (Czeh y col. 2001; W. Liu y col. 2011); deterioro de la memoria espacial dependiente de hipocampo (Zalosnik y col. 2014) y por el contrario, fortalecimiento de la memoria de eventos adversos (probablemente por la sensibilización de la amígdala) (Conrad y col. 1996; Luine y col. 1994; Sandi y col. 2001).

Los cambios estructurales y funcionales inducidos por EC son probablemente adaptativos, pero al mismo tiempo pueden aumentar la vulnerabilidad a estresores subsecuentes (de Kloet 2013). Esto se debe a que los mismos mediadores (NTs, neuropéptidos, hormonas y citoquinas) que llevan a la homeostasis y permiten la adaptación exitosa, también median la carga y la sobrecarga homeostática que lleva a patologías (McEwen y Gianaros 2011).

Como consecuencia de la sobreactividad y desregulación de la adaptación homeostática, debido a que esta se prolonga o no termina inmediatamente, se produce la carga homeostática. Dicho de otra manera, la adaptación homeostática tiene un precio y el costo de esa adaptación es la carga homeostática, la cual produce el deterioro del cuerpo y del cerebro (McEwen y Gianaros 2011). Durante la cronicidad de situaciones estresantes el costo es alto, y por lo tanto se incrementa la carga homeostática pudiendo llegar a una sobrecarga, en donde está sobrepasada la capacidad del individuo para afrontar y adaptarse a la situación y por lo tanto se incrementa el riesgo de sufrir enfermedades (McEwen y Wingfield 2003). Para que esto no ocurra es fundamental el eficiente comienzo y finalización de la respuesta de estrés, ya que esto reduce la exposición total del organismo a los mediadores de la homeostasis (incluida la CORT). Las situaciones que pueden contribuir a la carga homeostática incluyen: exposición repetida a múltiples estresores, falta de habituación o adaptación, respuesta prolongada debido a una retroalimentación negativa deficiente lo cual impide el adecuado cese de la respuesta de estrés; y respuesta inadecuada que lleva a una hiperactividad compensatoria de otros mediadores (McEwen y Gianaros 2011).

EC = estrés crónico || NTs = neurotransmisores || CORT = corticosterona

1.4. MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN

Los eventos estresantes de la vida se reconocen como factores de riesgo ambientales para la precipitación de episodios de depresión mayor. En particular, las experiencias adversas en la infancia constituyen un potente elemento desencadenante de este desorden (American Psychiatric Association 2013; Kendler y col. 1999; Kessler 1997; Mello y col. 2003).

Teniendo en cuenta esto, se desarrolló como modelo animal de depresión, a principios de la década del '80, el modelo de estrés crónico impredecible. En el mismo se aplicaban en forma variable distintos estresores severos (por ejemplo shock eléctrico, inmersión en agua a 4°C o privación por 48 h de agua y comida) (Katz y col. 1981). Posteriormente, este modelo fue modificado por razones éticas y también a los fines de generar una simulación más realista del estrés de la vida diaria; así, se disminuyó la intensidad de los *estresores* utilizados para dar origen al modelo de estrés crónico moderado o variado (ECV) (Suárez y col. 1996; Willner 1997, 2005). En este modelo los animales son expuestos subsecuentemente, durante un periodo de semanas o incluso meses, a diferentes *estresores* moderados, aplicados en distintos horarios. Esta variabilidad tiene el propósito de lograr la impredecibilidad del estímulo y evitar la adaptación que usualmente produce la exposición repetida a un mismo estresor (Abelaira y col. 2013; Griffiths y col. 1992; Suárez y col. 1996). Adicionalmente, Willner y col. observaron que luego de la exposición a ECV, las ratas disminuyen su consumo y preferencia por una solución apetecible (generalmente sacarosa o sacarina), y propusieron que esta deficiencia refleja un estado anhedónico, el cual es un síntoma central de la depresión (Willner 1997, 2005).

Estudios independientes, utilizando diferentes especies (ratas o ratones) y diferentes medidas de estado hedónico han demostrado que ninguno de los estresores individuales es necesario o suficiente, mientras que la variabilidad y la repetición de experiencias es indispensable para la efectividad del procedimiento (Griffiths y col. 1992; Muscat y Willner 1992). En otras palabras lo que resulta estresante en el modelo de ECV es la exposición repetida a experiencias variables antes que la experiencia en sí misma. Esto sustenta la idea que la característica estresante de las manipulaciones experimentales no depende de su impacto físico. Además, el ECV produce una sensibilización a los estresores, mientras que la repetición de un mismo estresor, incluso severo, produce habituación o adaptación a ese estresor (Cabib y Puglisi-Allegra 1996). En este sentido, muchos investigadores han propuesto que las alteraciones conductuales y fisiológicas relacionadas al estrés dependen más

de parámetros como novedad, pérdida de control, incerteza o impredecibilidad que de la intensidad del estímulo nocivo (Cabib 1997; Huether 1996; J.M. Weiss y col. 1981).

Sin embargo, el modelo de ECV plantea algunos problemas de replicación entre laboratorios, principalmente, debido a la incapacidad de muchos estudios de producir una disminución del consumo de sacarosa (Willner 1997). Esto ha sido atribuido tanto a diferencias individuales en la sensibilidad a recompensas hedónicas de cada rata como a diferencias entre cepas o a diferencias sexuales (Duncko y col. 2003; Konkle y col. 2003; Nielsen y col. 2000). Además, la duración de la aplicación del estrés y las diferencias en el régimen de estresores utilizados también podrían explicar algunas de las discrepancias entre los diferentes estudios (Dalla y col. 2011). En opinión de Reid y col., el modelo de ECV, al menos como lo proponen Willner y col. es inválido e inconsistente (Reid y col. 1997). Estos investigadores no observaron diferencias en la preferencia por la sacarosa de los animales luego de la aplicación del ECV. En cambio sí encontraron una disminución en el consumo de la solución de sacarosa, pero atribuyen esta disminución del consumo a la pérdida de peso de los animales sometidos a ECV y no a una alteración del estado hedónico (Forbes y col. 1996; Matthews y col. 1995). Además, el test de anhedonia tal como lo aplican Willner y col. es precedido por un periodo de restricción de comida. Forbes y col. demostraron que esa privación de alimento por sí mismo, en ausencia de otros estresores, induce cambios en el consumo de sacarosa, similares a los publicados por Willner y col. como evidencia de anhedonia (Forbes y col. 1996).

Sin embargo, además de la disminución de consumo y/o preferencia por una solución de sacarosa débilmente apetitosa (1-2%) (Papp y col. 1996), la inducción de anhedonia luego de la exposición a ECV ha sido validada por el aumento del umbral requerido para la auto-estimulación intracranial en el ATV (Moreau y col. 1994), el deterioro de la habilidad de asociar recompensas con un ambiente determinado (condicionamiento de lugar) usando diversos reforzadores positivos (Papp y col. 1992; Willner 1997) o cambios en la liberación de DA (Di Chiara y col. 1999). Adicionalmente, este modelo reproduce otros síntomas de la depresión, incluido el aumento de la inmovilidad en los test de natación forzada (*forced swim test*) y de aprendizaje de indefensión (*learned helplessness*), disminución del acicalamiento (*grooming*) (Willner 2005), la disminución de la conducta social, agresiva y sexual (D'Aquila y col. 1994), pérdida de peso (S. J. Kim y col. 2006), disturbios del sueño (Moreau y col.

ECV = estrés crónico variable || ATV = área tegmental ventral || DA = dopamina

1995), aumento de la actividad del eje HHA con hipersecreción de CORT (Suárez y col. 1996; Suárez y col. 1999) e inmunosupresión (Ayensu y col. 1995). Además, se han encontrado efectos neurobiológicos del ECV que se asemejan a los observados en depresión, por ejemplo una disminución de 5-HT_{1A} en corteza prefrontal e hipocampo, disminución del GR hipocampal, aumento de CRH en NPV y disminución de la neurogénesis en el giro dentado (ver (M. N. Hill y col. 2012) para una revisión completa). La efectividad del modelo para producir otros síntomas más allá de la anhedonia como también la generación de anormalidades neurobiológicas y neurohormonales frecuentemente observadas en la depresión clínica agrega validez aparente al modelo (De Vry y Schreiber 1997).

Una ventaja que acredita este modelo es que permite evaluar drogas antidepresivas. Éstas, generalmente, no suelen tener efecto sobre individuos en situaciones basales y su eficacia requiere del tratamiento crónico durante semanas, por lo que la cronicidad de este modelo supone una ventaja (Willner 1997). Debido a esto, se han evaluado una gran cantidad de antidepresivos en animales expuestos a ECV. En ese sentido, el modelo ha demostrado ser sensible a una variedad de drogas antidepresivas como también a terapia electroconvulsiva, siendo el tiempo necesario para esos efectos similar a la de su acción clínica. Además, esos mismos agentes no tuvieron repercusión en los animales control. Por el contrario, una variedad de drogas no antidepresivas demostraron ser inactivas en este modelo (Vollmayr y Henn 2003; Willner 1997).

Así, a pesar de alguna controversia sobre la confiabilidad y replicación, el modelo de estrés crónico variable es ampliamente aceptado como un modelo válido de depresión en roedores y de gran utilidad tanto para estudiar la efectividad de antidepresivos e identificar nuevos agentes para el tratamiento de la depresión como para evaluar muchos de los efectos neurobiológicos concomitantes a la exposición a estrés crónico y que son similares a las alteraciones observadas en la depresión (M. N. Hill y col. 2012).

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **CORT** = corticosterona || **ECV** = estrés crónico variable
5-HT_{1A} = receptor 1A de serotonina || **GR** = receptor de glucocorticoides || **CRH** = hormona liberadora de corticotrofina
NPV = núcleo paraventricular

1.5. CIRCUITO DE MOTIVACIÓN

Las conductas motivacionales adaptativas incluyen tanto la búsqueda de objetos o metas confortables (recompensas) como la evitación de estímulos aversivos, ya sean físicos o psicológicos. La conducta de motivación supone dos procesos, por un lado que un estímulo adquiera la suficiente importancia para activar al organismo y, por otro lado, que esa activación provoque una respuesta conductual específica (Kalivas y Volkow 2005). Teniendo en cuenta esto, una recompensa (RE) puede definirse como un objeto o meta buscado y por el que, para adquirirlo, trabajamos dedicándole tiempo, energía o esfuerzo. Las REs hedónicas (comida apetitosa, apareamiento, interacción social, etc.) inician procesos de aprendizaje que llevan a la consolidación del gusto por esa RE. Así, un estímulo puede considerarse una RE si produce acciones de refuerzo positivo. Es decir que, si luego que un animal consigue un objeto, es más probable que repita en el futuro aquellas conductas que lo llevaron a conseguirlo. De esta forma, los refuerzos positivos aumentan la frecuencia con que se producen las conductas que llevan a la RE. Determinados estados motivacionales tales como hambre, deseo sexual o abstinencia a drogas incrementan la importancia motivacional de la RE o bien de algún indicio de ella (Arias-Carrion y col. 2014).

Los individuos no pueden buscar todas las REs posibles en un determinado momento. Debido a esto, se ha propuesto la existencia de un único sistema neuronal que procese todas las REs y de esta forma, permita evaluarlas y elegir las a través de una comparación directa (Shizgal 1997). Existen numerosas evidencias de que el sistema DAérgico mesocorticolímbico es el principal involucrado en cotejar y generar la respuesta hacia los distintos tipos de REs (Alcaro y col. 2007; Berridge y Robinson 1998; Ikemoto y Panksepp 1999; Phillips y col. 2008). Así, la dopamina (DA) llevaría la señal hedónica indicando el valor de RE de un determinado objeto o meta y produciendo en el individuo estados de expectación para futuras RE (Arias-Carrion y col. 2014).

En el cerebro casi todas las neuronas DAérgicas se encuentran en el ATV, ubicada en la parte ventral del mesencéfalo. Desde allí surgen 2 sistemas DAérgicos, el mesolímbico y el mesocortical. Estos sistemas están involucrados en las conductas relacionadas a la emoción, incluyendo las motivacionales y de RE. En el sistema DAérgico mesolímbico las proyecciones del ATV se dirigen principalmente al NAc y al bulbo olfatorio, pero además inervan el septum, la amígdala y el hipocampo. En cambio, en el sistema DAérgico

DAérgico/s/as = dopaminérgico/s/as || ATV = área tegmental ventral || NAc = núcleo accumbens

mesocortical, las fibras del ATV alcanzan las cortezas prefrontal, cingulada y perirrinial. Debido al solapamiento de estos 2 sistemas suele referirse como sistema mesocorticolímbico (Arias-Carrion y col. 2014) (fig. 2).

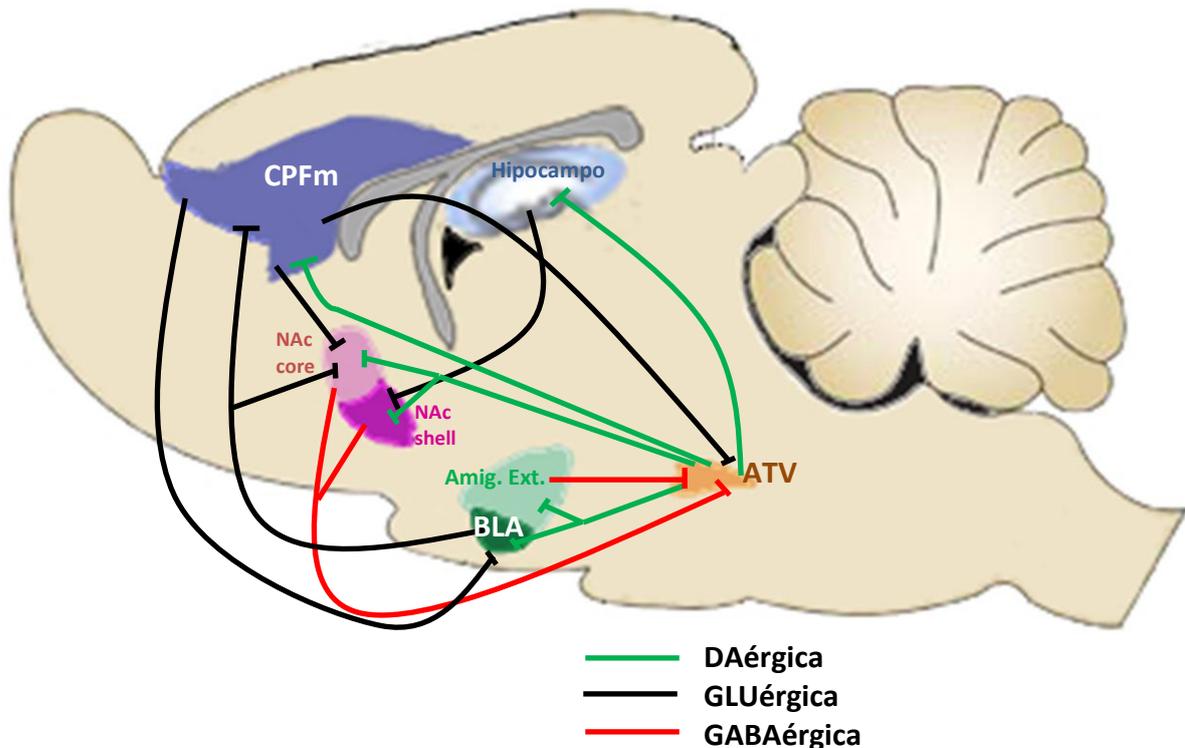


Fig. 2. Circuito de recompensa mesocorticolímbico. Esquema altamente simplificado de los circuitos neuronales involucrados en las conductas de búsqueda de recompensa. Ver texto para más detalles. Abreviaciones: CPFm: corteza prefrontal medial; NAc: núcleo accumbens; Amig. Ext.: amígdala extendida (incluyendo los núcleos central y medial de la amígdala y el núcleo bed de la estria terminal); BLA: núcleo basolateral de la amígdala; ATV: área tegmental ventral; DAérgica: vía dopaminérgica; GLUérgica: vía glutamatérgica; GABAérgica: vía gabaérgica.

Eventos motivacionalmente relevantes activan las neuronas DAérgicas del ATV. La DA liberada, inicia respuestas conductuales adaptativas y facilita cambios celulares para que se establezca el aprendizaje asociado con la RE o con estímulos ambientales predictivos de esa RE (Kalivas y Volkow 2005).

El NAc está asociado con conductas motivadas por la RE. Este núcleo, ubicado en la parte ventral del estriado, posee proyecciones GABA/Neuropeptidérgicas y se subdivide en 2 regiones: *shell* y *core*. Se ha demostrado que diferentes subgrupos de neuronas en el NAc responden diferencialmente a distintos eventos motivacionales. Además, la cualidad e

ATV = área tegmental ventral || DAérgicas = dopaminérgicas || DA = dopamina || RE = recompensa
NAc = núcleo accumbens || GABA = ácido gama-aminobutírico

intensidad de la respuesta conductual está fuertemente influenciada por las aferencias glutamatérgicas (GLUérgicas) y DAérgicas del NAc, cuya activación produce cambios morfológicos en las espinas dendríticas de este núcleo (Kalivas y Volkow 2005).

El NAc *shell* forma parte de la amígdala extendida, la cual se relaciona con *estresores* ambientales e interoceptivos, y está densamente interconectado con el hipotálamo y el ATV. Es importante en el procesamiento de las propiedades motivacionales primarias, tanto de las RE como de los estímulos aversivos. Además, contribuye a establecer el aprendizaje asociativo entre eventos motivacionales y su contexto ambiental. Esta subregión es especialmente importante en la regulación de las conductas alimentarias (Kalivas y Volkow 2005; Kelley 1999). Se ha observado que la liberación de DA en esta región, pero no en el *core*, es elevada rápidamente por estímulos gustativos apetecibles y reducida por estímulos gustativos desagradables (Wheeler y col. 2011).

En cambio, el NAc *core* tiene muchas proyecciones hacia el *pallidum* ventral, el cual constituye un área importante para la expresión de conductas motivacionales. Además, recibe aferencias glutamatérgicas, provenientes de la CCA y de la corteza orbitofrontal, que median la expresión de conductas aprendidas en respuesta a estímulos predictivos de una RE. Estas proyecciones CPF-NAc (*core*) proveen tanto la importancia motivacional de un evento u objeto, como la calidad e intensidad de la respuesta. Esta vía puede ser activada de dos maneras: por un lado, eventos estresantes pueden activar la amígdala extendida, la cual a su vez proyecta sobre el ATV, que a su turno activa la CPF. En cambio, indicios predictivos de una RE pueden activar el ATV, el cual posee eferencias hacia la amígdala basolateral (BLA) cuyas neuronas GLUérgicas activaran a la CPF (Kalivas y Volkow 2005).

Por otro lado, las proyecciones de la CeA hacia el tronco encefálico, el hipotálamo y ATV, participan en el establecimiento de asociaciones autónomas y endocrinas entre el evento motivacionalmente relevante y otros estímulos neutros, predictivos de dicho evento. Mientras que, proyecciones GLUérgicas desde la BLA hacia la CPF y el NAc son necesarias para aprendizajes asociativos que involucren respuestas conductuales complejas (Kalivas y Volkow 2005).

El modelo alostático del sistema motivacional del cerebro propone que la RE actúa, por un lado, sobre el mismo sistema en que produce su acción reforzadora primaria e incondicionada, generando un efecto opuesto, neutralizador de la reacción. Pero, por otro lado, también actúa sobre otros sistemas neurobiológicos diferentes al activado originalmente. Por ejemplo, en la

DAérgicas = dopaminérgicas || NAc = núcleo accumbens || ATV = área tegmental ventral || RE = recompensa
DA = dopamina || CCA = corteza cingulada anterior || CPF = corteza prefrontal || CeA = núcleo central de la amígdala

adicción a drogas, la disminución de la función DAérgica en el NAc y en la amígdala extendida podría participar en la habituación, es decir en la disminución de la eficacia reforzadora de la droga (recompensa); mientras que, el reclutamiento del sistema CRH-CRH₁ en la CeA, el núcleo *bed* de la estría terminal (BNST) y el ATV, durante la abstinencia, podría participar en la aparición del estado emocional negativo que conduce hacia la búsqueda de la RE. Además, estos dos sistemas (DAérgico y CRH) interaccionarían entre ellos (Arias-Carrion y col. 2014).

Las neuronas DAérgicas mesencefálicas localizadas en el ATV se han observado relacionadas con muchos desordenes, incluidos esquizofrenia, adicción a droga y desórdenes emocionales relacionados al estrés, tales como la depresión (J. L. Cao y col. 2010; Chaudhury y col. 2013; Friedman y col. 2014; Krishnan y col. 2007; Marinelli y White 2000; Valenti y col. 2011). Teniendo en cuenta que el síntoma principal de la depresión es la anhedonia o la falta de motivación por la RE y que estas neuronas del ATV se proyectan hacia regiones límbicas, incluidos el NAc, la CPFm y la amígdala, el circuito mesocotilímbico podría ser un componente importante en la etiología de esta enfermedad y en la regulación de las emociones (Baker y col. 2006; Walsh y Han 2014).

DAérgico/s/a/as = dopaminérgico/s/a/as || NAc = núcleo accumbens || CRH = hormona liberadora de corticotrofina
CRH₁ = receptor 1 de CRH || CeA = núcleo central de la amígdala || ATV = área tegmental ventral || RE = recompensa
CPFm = corteza prefrontal medial

1.6. SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA

Las experiencias de la vida temprana pueden influenciar la salud física, la susceptibilidad a drogas, las funciones cognitivas y la vulnerabilidad a desórdenes mentales asociados al estrés, tales como la depresión y el estrés post-traumático (Claessens y col. 2011; Daskalakis y col. 2013; Heuser y Lammers 2003). En este sentido, adultos que, durante la niñez, han sido víctimas de abuso sexual o físico, negligencia, indisciplina o conflictos familiares, tienen un riesgo considerablemente mayor para sufrir obesidad, diabetes, enfermedades cardíacas y mentales (Chapman y col. 2004; Edwards y col. 2003; Felitti y col. 1998; Heuser y Lammers 2003).

Se ha demostrado que los eventos ambientales pueden producir modificaciones epigenéticas, especialmente durante periodos sensibles del desarrollo, aunque también, con menor alcance, en adultos. Tales modificaciones alteran la expresión génica y la función neuronal (Daskalakis y col. 2013). Por ejemplo, se ha evidenciado que cambios epigenéticos ocurridos en la primera semana de vida afectan permanentemente la expresión hipocampal de GR (Weaver y col. 2004). También se ha sugerido que podrían ocurrir alteraciones epigenéticas en la amígdala, dado que, el estrés temprano afecta el aprendizaje de miedo, dependiente de esta estructura (Daskalakis y col. 2013). Además, recientemente, se ha observado que esos marcadores epigenéticos pueden modificarse en el adulto por experiencias estresantes (Lee y col. 2010; Witzmann y col. 2012).

En ratas, la etapa neonatal comprendida entre los días 3 a 14 después del nacimiento constituye el periodo de hipo-respuesta al estrés (SHRP). Ésta es una etapa crítica para la maduración del eje HHA, en la cual se encuentra atenuada la elevación de GC en respuesta a *estresores* moderados (que en adultos desencadenarían una respuesta pronunciada) (Levine 2001). En humanos existe una etapa hipo-sensible al estrés, análoga al de la rata, aunque menos definida en su duración. Sin embargo, puede ubicarse esta etapa, aproximadamente entre las edades de 1 a 6 años de vida (Gunnar y Donzella 2002).

Se ha sugerido que el cuidado materno y la alimentación regulan la sensibilidad del eje HHA de los neonatos durante el SHRP (Claessens y col. 2011). Debido a esto, la ausencia materna, durante esta etapa, produce que el neonato emerja del SHRP y muestre elevados niveles de GC, tanto basales como inducidos por estrés (Daskalakis y col. 2013). Estos altos niveles de GC pueden influenciar adversamente los procesos de crecimiento y maduración

GR = receptor de glucocorticoides || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || GC = glucocorticoides

normal (Heuser y Lammers 2003). De esta manera, la desinhibición del eje HHA producida por la separación materna temprana (SMT), puede afectar el desarrollo cerebral, produciendo cambios persistentes a largo plazo en los sistemas que regulan la respuesta de estrés. En el adulto, estos cambios incluyen, en condiciones basales o inducidas por estrés, la sensibilización de los sistemas HHA y SMA, con incremento de la sensibilidad adrenal a ACTH y de la concentración plasmática de NA (Anisman y col. 1998; Ladd y col. 2005; Suárez y col. 2001; Suárez y col. 2002).

Además de la hipersensibilidad al estrés, la SMT ha demostrado producir otros efectos en el adulto, como ser, aumento de la reactividad emocional, déficits cognitivos, alteración de la conducta social y susceptibilidad a drogas de abuso (Daskalakis y col. 2013). Con respecto a esto último, se ha observado que la SMT por 3 h diarias, durante las 2 primeras semanas de vida, aumenta el consumo de etanol en ratas (Huot y col. 2001) y en ratones (Cruz y col. 2008), evaluado tanto en test de elección libre como en una prueba de autoadministración operante. Además el tratamiento de SMT redujo la preferencia por sacarosa a favor de la solución con alcohol, sugiriendo un estado anhedónico, y también aumentó la ansiedad y la respuesta del eje HHA a un estímulo estresante (*airpuff startle*). Adicionalmente, todos estos efectos de la SMT fueron revertidos por el tratamiento con el antidepresivo paroxetina, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (SSRIs) (Huot y col. 2001). Teniendo en cuenta que desordenes psiquiátricos como la depresión podrían relacionarse con la dependencia a drogas a través de la alteración de los mismos sistemas de neurotransmisores (entre ellos los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico) (Markou y col. 1998), Huot y col. han propuesto que la SMT puede sensibilizar las vías amígdala-*locus coeruleus*-corteza prefrontal, las cuales a su vez modulan la actividad del núcleo del rafe y del sistema dopaminérgico mesolímbico. De esta forma, el estado de alarma y ansiedad resultante se asemejaría a un estado de abstinencia, incrementando la preferencia de esos animales por el alcohol y quizás por psicoestimulantes (Huot y col. 2001).

Existen diferentes procedimientos de SMT, los cuales varían en cuanto a la frecuencia y/o duración de la separación, la edad en la que se produce, el sexo de los animales o la manera en que se lleva a cabo dicha separación. Probablemente a estas diferencias procedimentales se deban la obtención de algunos resultados inconsistentes y contradictorios (Levine 2005). Sin embargo, a pesar de la existencia de alguna controversia, la mayoría de los trabajos coinciden

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || SMA = simpático-médula adrenal || ACTH = hormona adrenocorticotrofa
NA = noradrenalina

en que la separación materna prolongada (de 3 a 8 h de separación) lleva, en el individuo adulto, a una hiper-reactividad del eje HHA al estrés (Aisa y col. 2008; Ladd y col. 2004; Lippmann y col. 2007; D. Liu y col. 2000; Milde y col. 2004).

Se ha demostrado que la separación materna, produce en los animales adultos en condiciones basales o luego de la exposición a estrés, un aumento de CRH en la eminencia media (Plotsky y Meaney 1993) y un aumento de AVP en el NPV (Veenema y col. 2007). Además se ha observado un aumento de la ACTH plasmática y de los niveles de NA en el NPV (D. Liu y col. 2000) y también mayores niveles de corticosterona plasmática en condiciones basales (Marais y col. 2008). Por otra parte, O'Malley y cols. encontraron un aumento de CRH₁ en el hipotálamo de ratas con SMT en condiciones basales, mientras que en la corteza prefrontal y en el hipocampo se observó un aumento de los niveles de este receptor pero luego de la exposición a una prueba de campo abierto; en cambio en la amígdala aumentaron los niveles de CRH₂ (O'Malley y col. 2011). Adicionalmente, animales separados de la madre presentaron mayor actividad neuronal en NPV, CeA y BNST comparado con animales no separados (Sanders y Anticevic 2007). A nivel conductual, estos animales presentaron mayor ansiedad, evaluada en las pruebas de laberinto en cruz elevada (*elevated plus maze*), campo abierto (*open field*), exploración de un objeto novedoso (*novel object exploration*) (Veenema y col. 2007) y de retirada defensiva (*defensive withdrawal*) (Huot y col. 2002). Marais y cols. demostraron que los animales separados de la madre y luego sometidos a estrés crónico en edad adulta permanecen más tiempo inmóviles en el test de natación forzada, indicando una mayor conducta de depresión (Marais y col. 2008). Además estos animales mostraron una respuesta aumentada en la prueba de sobresalto a un estímulo acústico (*acoustic startle response test*) (Kalinichev y col. 2002) y un deterioro de la memoria espacial medido en un laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*) (Huot y col. 2002).

Por el contrario, la utilización de un modelo de manipulación temprana (*early-handled*, EH), en el cual se realizan periodos cortos de separación (generalmente entre 3 a 15 min), sugiere que los animales adultos expuestos previamente a EH tienen un fenotipo opuesto a aquellos expuestos a SMT (Levine 2005). De esta manera, se ha demostrado que la aplicación de este procedimiento de separación breve reduce, en el adulto, la conducta de ansiedad, la actividad del eje HHA y la respuesta al estrés, respecto de los animales SM (Levine 2005;

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **CRH** = hormona liberadora de corticotrofina || **AVP** = arginina vasopresina
NPV = núcleo paraventricular || **ACTH** = hormona adrenocorticotrofa || **NA** = noradrenalina || **CRH₁** = receptor 1 de CRH
SMT = separación materna temprana || **CRH₂** = receptor 2 de CRH || **CeA** = núcleo central de la amígdala
BNST = núcleo bed de la estricta terminal || **SM** = separados de la madre

Plotsky y col. 2005). En este sentido, se ha observado que animales expuestos a EH presentan una menor expresión de CRH en el hipotálamo y menores niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en condiciones de estrés (D. Liu y col. 2000; Plotsky y col. 2005). Además los animales EH presentan en el adulto una mayor retroalimentación negativa del eje HHA, comparado con animales no separados (Viau y col. 1993), lo cual puede relacionarse con el aumento de la expresión de GR en hipocampo y corteza prefrontal, observado en otros trabajos (Meaney y col. 1985; O'Donnell y col. 1994).

Otra fuente de variabilidad en los estudios sobre desarrollo consiste en la elección del grupo control. Por el momento no se ha logrado un consenso respecto de cuál es el grupo de comparación adecuado. De hecho, muchos investigadores consideran que en los estudios sobre desarrollo no existe un verdadero grupo control, ya que en esta etapa de desarrollo postnatal temprano es casi imposible lograr una manipulación ambiental (o la falta de esa manipulación) que no provoque algún efecto en el cerebro en desarrollo (Levine 2005). Así, cuando se estudian los efectos de la separación materna, algunos investigadores utilizan como grupo de comparación animales con EH (Ladd y col. 2005), otros animales sin ningún disturbio (comúnmente denominado NH, por *non-handled*) (Marais y col. 2008) o animales sólo manipulados brevemente 1 o 2 veces por semanas para la limpieza rutinarias de las cajas de crianza (comúnmente denominado AFR, por *animal facility rearing*) (Aisa y col. 2008; Veenema y col. 2007). Además, es común la utilización de 2 o 3 grupos de los anteriormente mencionados (Huot y col. 2002; Kalinichev y col. 2002; D. Liu y col. 2000; Plotsky y col. 2005).

Además de las manipulaciones postnatales, también se han estudiado variaciones naturales en el cuidado materno. Se ha observado que de acuerdo a la frecuencia con la que se producen algunas formas de conductas maternas en roedores, en especial el lamido y aseo (*licking/grooming*, LG) de las crías, las madres pueden dividirse en 2 categorías, con alta o baja frecuencia de LG. Las madres en estas 2 categorías, no difieren en la cantidad de tiempo en contacto con las crías (Meaney 2001). Cuando las crías de madres con alto LG son adultas, muestran respecto de las crías de madres con bajo LG, una respuesta a estrés aguda disminuida en cuanto a la liberación de ACTH, corticosterona y CRH, y también un aumento en el GR hipocampal, facilitando así la retroalimentación negativa del eje HHA (D. Liu y col. 1997; Meaney 2001). Adicionalmente, estos animales presentan una disminución del receptor

EH = manipulación temprana (*early-handled*) || **CRH** = hormona liberadora de corticotrofina
ACTH = hormona adrenocorticotrofa || **HHA** = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **GR** = receptor de glucocorticoides

de CRH en el *locus coeruleus* y se ha observado que las crías de madres con alto LG muestran en edad adulta un aumento de la exploración de un campo abierto y menores latencias para comer en un ambiente novedoso (Caldji y col. 1998).

De lo expuesto anteriormente se desprende que, a pesar de los distintos modelos usados, en términos generales se ha demostrado que las experiencias tempranas afectan en la cría un gran número de variables conductuales y neurobiológicas que persisten luego en el adulto. La hipótesis más tradicional sobre las influencias de la vida temprana es la del estrés acumulativo. De acuerdo con esta propuesta, la sucesión de *estresores* a lo largo de la vida llevan a un aumento progresivo de la carga alostática y cuando se excede un cierto umbral, aumenta el riesgo de los individuos a desarrollar enfermedades (McEwen y Wingfield 2003). En esta hipótesis, los efectos del estrés son acumulativos y las experiencias adversas en la vida temprana predisponen al individuo a ser más vulnerable a desafíos adversos en la vida adulta (Cotella y col. 2014; Walker y col. 2009).

Sin embargo, existen numerosas evidencias de que la exposición a *estresores* moderados predecibles en la vida temprana puede ser beneficiosa y llevar a un mejor afrontamiento de situaciones estresantes en la vida adulta (Claessens y col. 2011; Díaz Lujan y col. 2008; Ladd y col. 2005; Macri y Wurbel 2006; Molina y col. 2006; Suárez y col. 2004). Ratificando esto, crías sometidas a manipulación temprana obtuvieron mejor desempeño en algunas pruebas cognitivas, menores niveles de ansiedad y menor respuesta endócrina a un estresor moderado, que las ratas no manipuladas (Kosten y col. 2012; Meerlo y col. 1999).

El efecto de la SMT es dependiente de la prueba que se utilice para evaluarlo y además está influenciado por muchos factores, entre los más importantes se encuentran la duración de la separación (corta vs. prolongada), la frecuencia (aguda vs. crónica), la edad a la que ocurre la separación y la forma de separar las crías (aisladas vs. mantenidas con la camada / ambiente nuevo vs. mantenidas en el nido) (Daskalakis y col. 2013; Kosten y col. 2012).

Teniendo en cuenta esto se formuló la hipótesis de la plasticidad predictiva adaptativa (*match / mismatch*). Ésta plantea que, los organismos en desarrollo responden a circunstancias ambientales (por ejemplo el cuidado materno), cambiando ciertos aspectos de su homeostasis (como ser la regulación del eje HHA), a fin de producir un fenotipo que este altamente adaptado a su ambiente actual y futuro (Claessens y col. 2011). Es decir que los individuos desarrollan sus fenotipos basados en la información que asumen a partir de su ambiente

CRH = hormona liberadora de corticotrofina || LG = lamido y aseo (*licking/grooming*)
SMT = separación materna temprana || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal

temprano y por lo tanto, el fenotipo estará adaptado al ambiente esperado para la vida futura (*match*) (Nederhof y Schmidt 2012). Cuando ocurre un desajuste (*mismatch*) entre el ambiente temprano y tardío, se produce un aumento del riesgo de desarrollar enfermedades en el adulto (Claessens y col. 2011). Por lo tanto, el resultado de las experiencias tempranas sobre parámetros relacionados al estrés es dependiente del contexto de la vida adulta (Bagot y col. 2009; Champagne y col. 2008).

Este modelo considera que las experiencias adversas tempranas desencadenan procesos adaptativos, que pueden traducirse en un individuo mejor adaptado a ambientes adversos en la vida tardía (Nederhof y Schmidt 2012). Sin embargo, para que la exposición a desafíos determine un afrontamiento activo (“inoculación de estrés”), el ambiente debe ser moderadamente estresante, ya que la exposición temprana a estrés severo aumenta la incidencia de desórdenes emocionales y de ansiedad en el adulto. Por el contrario, una exposición temprana a estrés moderado resulta en una subsecuente resiliencia antes que en aumento de la vulnerabilidad (Daskalakis y col. 2013).

Por último, existe variabilidad genética entre los individuos, que debe considerarse contextualmente. Es decir, la vulnerabilidad en un ambiente puede en realidad constituir un beneficio adaptativo en otro ambiente (Belsky y Beaver 2011). De acuerdo con Belsky y Pluess, existirían genes o alelos específicos que predispondrían a un individuo a ser más susceptible a influencias ambientales. Estos individuos con alta sensibilidad a la programación tendrían mayor habilidad para adaptar su fenotipo en respuesta a características ambientales y así incrementar su aptitud bajo condiciones

similares en el futuro. Es de destacar que, estos genes que determinan la susceptibilidad de un individuo a aspectos negativos del ambiente, también determinan la susceptibilidad a aspectos positivos del ambiente (Belsky y Pluess 2009) (fig. 3). Según esta hipótesis, individuos con una alta sensibilidad a la programación deberían sufrir ante un desajuste (*mismatch*) entre el ambiente temprano y adulto pero a la vez, beneficiarse a partir de una coincidencia (*match*),

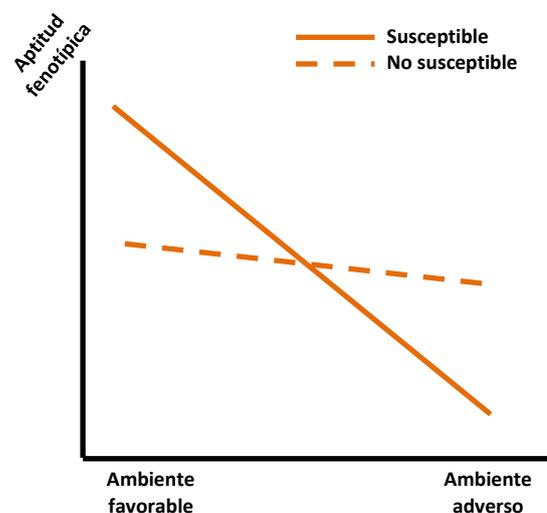


Fig. 3. Diferencias en la capacidad adaptativa de individuos con diferente susceptibilidad genética a las influencias ambientales

incluso si ambos ambientes son adversos. Es decir que responderían de acuerdo a lo predicho por la teoría del “*match / mismatch*”. Mientras que, en individuos con menos sensibilidad y adaptabilidad al contexto ambiental, ambientes temprano y adulto adversos podría resultar en un continuo desgaste y consecuentemente en el desarrollo de enfermedades. Entonces, estos individuos responderían de acuerdo con la teoría del estrés acumulativo (Nederhof y Schmidt 2012).

Además, la expresión de genes y proteínas particulares, que determinan la respuesta biológica, es afectada por la herencia genética, pero también por la influencia ambiental, la cual puede modular la expresión génica, por mecanismos epigenéticos (Weaver y col. 2004). Esto determinará distintos grados de sensibilidad al estrés y de vulnerabilidad a enfermedades relacionadas con el estrés (Claessens y col. 2011). Entonces, para incluir el factor genético, se desarrolló el concepto de tres golpes de vulnerabilidad y resiliencia (fig. 4).

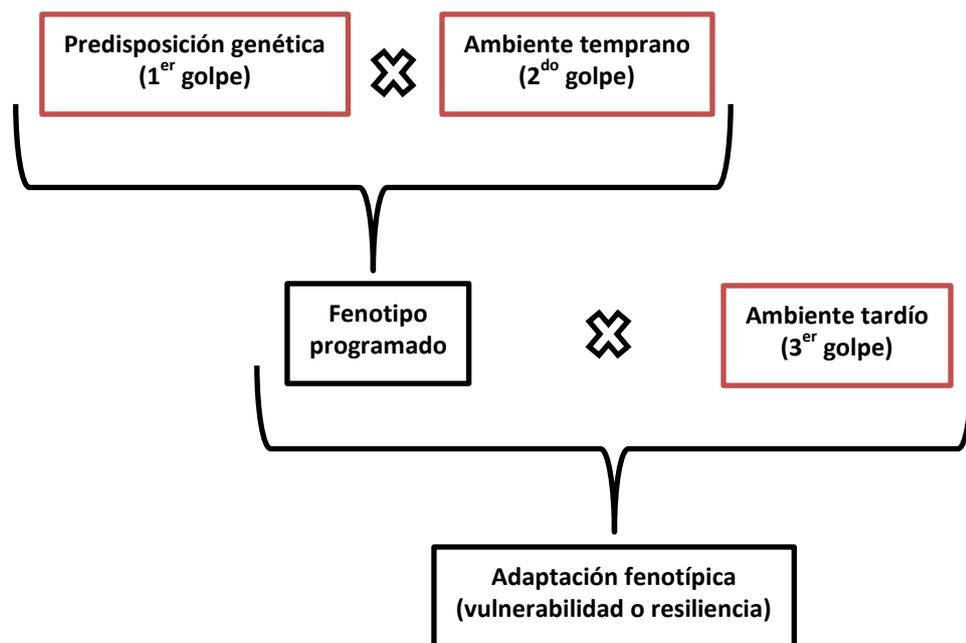


Fig. 4. Hipótesis de los 3 golpes. Los factores genéticos interactúan con el ambiente temprano programando fenotipos con diferente susceptibilidad al estrés de la vida adulta. La interacción entre el fenotipo programado y el ambiente de la vida adulta resultará en la vulnerabilidad o resiliencia de los individuos a enfermedades. Modificado de Daskalakis y col. 2013.

Este concepto postula que la interacción de factores genéticos (1er golpe) con el ambiente temprano (2do golpe), produce durante el desarrollo cerebral, alteraciones en la regulación endocrina y modificaciones epigenéticas que programan los patrones de expresión génica, los cuales llevan al desarrollo de un fenotipo. Determinado fenotipo programado, cuando es

expuesto al ambiente de la vida adulta (3er golpe) puede verse comprometido en cuanto a sus funciones mentales y por lo tanto aumentar el riesgo de síntomas psiquiátricos (vulnerabilidad). Pero, sería de esperar que, si el mismo individuo es expuesto a otro tipo de ambiente, sea resistente a disfunciones mentales (resiliencia) (Daskalakis y col. 2013).

1.7. ANTIDEPRESIVO: TIANEPTINA

La tianeptina (Stablon de Laboratorios Servier) es un antidepresivo que, aunque posee una estructura similar a los tricíclicos (TCAs) (fig. 5), difiere de éstos en sus propiedades farmacológicas y neuroquímicas (McEwen y col. 2010). En la clínica ha demostrado una eficacia, en el tratamiento de la depresión, al menos equivalente a la de los SSRIs (Kasper y Olie 2002; Lepine y col. 2001; Novotny y Faltus 2002), aunque es mejor tolerada y posee menos efectos secundarios que los TCAs (Ridout y Hindmarch 2001) y los SSRIs (Atmaca y col. 2003; Lepine y col. 2001). Adicionalmente, este antidepresivo alivia los síntomas de ansiedad que a menudo están asociados con la depresión (Lepine y col. 2001; Novotny y Faltus 2002).

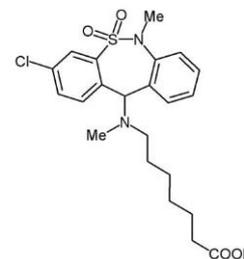


Fig. 5. Estructura química de tianeptina:
Sal sódica de ácido heptanoico [3-cloro-6-metil-5,5-deoxi-6,11-dehidro-(c,f)-dibenzo-(1,2-tiazepina)-11-(yl) amino]-7

Sin embargo, el mecanismo de acción que subyace sus efectos terapéuticos no está claro. A diferencia de otros TCAs, tianeptina no inhibe la recaptura de 5-HT ni de NA en el sistema nervioso central (McEwen y col. 2010). De hecho, disminuye los niveles extracelulares de 5-HT, por lo que se ha sugerido que activa su recaptura (Datla y Curzon 1993; Fattaccini y col. 1990; Whitton y col. 1991), aunque indirectamente, ya que tiene baja afinidad por el transportador de 5-HT (McEwen y col. 2010). Otros investigadores, sin embargo, han puesto en duda esto, ya que no encontraron alteraciones producidas por tianeptina en el sistema 5-HTérgico (Malagié y col. 2000).

Por otro lado, se ha propuesto que el mecanismo de acción de tianeptina involucra la normalización del tono GLUérgico en la amígdala y el hipocampo. Esto se basa en que en la BLA de ratas, el estrés aumenta la liberación de glutamato (GLU), mientras que tianeptina normaliza las concentraciones de ese NT (Reznikov y col. 2007). Además, en CA3 de hipocampo, tianeptina previno el aumento selectivo de la corriente mediada por el receptor NMDA. Esto indicaría, que este antidepresivo afecta la trasmisión GLUérgica, probablemente, a través de la modificación del estado de fosforilación de los receptores inotrópicos de GLU (Kole y col. 2002). También se ha demostrado que tianeptina produce

SSRIs = inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina || 5-HT = serotonina || NA = noradrenalina
5-HTérgico = serotoninérgico || GLUérgico/a = glutamatérgico/a || BLA = amígdala basolateral || NT = neurotransmisor
NMDA = N-metil-D-aspartato

cambios en la fosforilación de CREB y de la subunidad 1 del receptor AMPA (GluR1), tanto en hipocampo como en corteza frontal (Svenningsson y col. 2007).

Sin embargo, en otros estudios, tianeptina no tuvo efectos sobre la corriente iónica inducida por GLU. En cambio, inhibió las corrientes inducidas por 5-HT, GABA y glicina. Dado que tianeptina parece afectar principalmente al autoreceptor inhibitor 5-HT_{1A}, y que GABA es un potente inhibidor de las neuronas del rafe dorsal, la acción final de tianeptina sería el aumento de la excitabilidad de las neuronas 5-HTérgicas del rafe dorsal, lo que a su vez podría traducirse en el aumento de la recaptura de 5-HT, observado por investigadores en trabajos previos (Y. J. Kim y col. 2002).

A pesar de la controversia sobre su mecanismo de acción, tianeptina ha demostrado tener eficacia en modelos animales (Kelly y Leonard 1994; McEwen y col. 2010). En estudios realizados con *Tupaia belangeri*, tianeptina previno la disminución, inducida por estrés psicosocial, de los niveles de metabolitos cerebrales, volumen hipocampal y proliferación celular en el GD del hipocampo (Czéh y col. 2001) y también tuvo un efecto anti-apoptótico en el GD y en la corteza temporal, probablemente actuando sobre células gliales (Lucassen y col. 2004). Además, en ratas, el estrés y los GC disminuyeron la arborización dendrítica en CA3, mientras que tianeptina revirtió esos cambios (Watanabe y col. 1992).

También se ha encontrado que tianeptina incrementa, en hipocampo y amígdala, la expresión de factores neuroplásticos, tales como BDNF, NGF y CREB, los cuales se encuentran disminuidos en modelos animales de estrés (Alfonso y col. 2006; Reagan y col. 2007). Por lo tanto, es probable que este antidepresivo dispare una cascada de adaptaciones celulares que, a través de la estimulación de la neuroplasticidad central, finalmente lleven a su eficacia antidepresiva (McEwen y col. 2010).

Además, tianeptina revierte el bloqueó de la potenciación a largo plazo (LTP) inducidos por estrés, en hipocampo y en las sinapsis hipocampo–CPF. En cambio, este antidepresivo no afecta la activación, inducida por estrés, de LTP en la BLA. Esto significa que, tianeptina puede revertir los efectos adversos del estrés sobre el procesamiento hipocampal, sin afectar negativamente la función sináptica amigdalina (Rocher y col. 2004; Shakesby y col. 2002; Vouimba y col. 2006).

CREB = proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc || **GLU** = glutamato || **5-HT** = serotonina
AMPA = ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico || **GABA** = ácido gama-aminobutírico
5-HT_{1A} = receptor 1A de serotonina || **5-HTérgicas** = serotoninérgicas || **GD** = giro dentado || **GC** = glucocorticoides
BDNF = factor neurotrófico derivado del cerebro || **NGF** = factor de crecimiento nervioso || **CPF** = corteza prefrontal

Por otro lado, el tratamiento, tanto crónico como agudo, con tianeptina atenúa, aunque no revierte, el aumento de CORT, ACTH y expresión Fos en el NPV, inducido por la inyección i.p. de lipopolisacaridos o estrés por inmovilización (Castanon y col. 2003; Delbende y col. 1991). Adicionalmente, en animales adultos que fueron previamente separados de la madre como neonatos, el tratamiento crónico con tianeptina, aminora el aumento de adrenalina (A) y NA plasmática, inducido por ECV (Trujillo y col. 2009). En otro trabajo se encontró que esta droga amortigua el aumento, producido por ECV, de los niveles de ARNm de CRH en dBNST y también disminuye, tanto en las ratas estresadas como en las basales, el ARNm de CRH en vBNST y en el CeA (S. J. Kim y col. 2006). Estos resultados demuestran que tianeptina atenúa la respuesta del eje HHA al estrés.

También, se ha encontrado un efecto ansiolítico de tianeptina, evaluado en *plus maze* (Trujillo y col. 2009; Venzala y col. 2012; Zoladz y col. 2013), en el test de interacción social (*social interaction*), en el test de supresión de la alimentación por un ambiente nuevo (*novelty suppression of feeding*) (Venzala y col. 2012) y en el test de miedo condicionado (*fear conditioning*) (Burghardt y col. 2004; Zoladz y col. 2013). Además, en modelos animales de depresión, tianeptina ha mostrado efectos favorables sobre la función cognitiva y la memoria. Así, el estrés de inmovilización y el estrés debido a un predador, produjeron el deterioro de memoria espacial (dependiente de hipocampo) evaluada tanto en el laberinto en Y, como en el *Morris Water Maze*. Mientras que, tianeptina pudo revertir los déficits de memoria, mejorando el desempeño de los animales en esas pruebas conductuales (Campbell y col. 2008; Conrad y col. 1996).

CORT = corticosterona || **ACTH** = hormona adrenocorticotrofa || **NPV** = núcleo paraventricular || **i.p.** = intraperitoneal
NA = noradrenalina || **ECV** = estrés crónico variable || **ARNm** = ácido desoxirribonucleico mensajero
CRH = hormona liberadora de corticotrofina || **dBNST** = región dorsal del núcleo bed de la estría terminal
vBNST = región ventral del núcleo bed de la estría terminal || **CeA** = núcleo central de la amígdala
HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

En esta tesis nos proponemos estudiar, en un modelo animal de depresión, si la separación materna temprana provoca mayor vulnerabilidad a la depresión en la etapa adulta. Dada la complejidad de la etiología de la depresión, se plantea su análisis a través de las alteraciones a nivel del sustrato neurobiológico y sus consecuencias conductuales. Para ello, se analiza si la separación materna afecta la inmunoreactividad de las neuronas que expresan receptores de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR), y el balance MR/GR en hipocampo, núcleo paraventricular y amígdala, evaluando su relación con los índices de ansiedad, en animales adultos sometidos a estrés crónico variable. Se analiza también la inmunoreactividad a Fos para conocer si se modificó la actividad neuronal en los núcleos antes mencionados y también en núcleo accumbens, corteza prefrontal y área tegmental ventral (circuito de recompensa), y si esto se correlaciona con el comportamiento hedónico. Finalmente, nos proponemos evaluar si el tratamiento crónico con el antidepresivo tianeptina previene o revierte los posibles cambios neurobiológicos y conductuales provocados por los tratamientos de estrés y separación materna.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A-** Evaluar si, en ratas adultas, el modelo de depresión (estrés crónico variable) produce cambios en:
- A₁)** el número de neuronas inmunoreactivas a GR, a MR y/o en el balance MR/GR en el hipocampo dorsal, el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) y los núcleos central (CeA) y medial (MeA) amigdalinos.
 - A₂)** la actividad neuronal (c-Fos) de las estructuras arriba mencionadas y también de las siguientes estructuras del circuito de recompensa mesocorticolímbico: área tegmental ventral (ATV), núcleo accumbens (NAc) y corteza prefrontal medial (CPFm).
 - A₃)** la conducta de ansiedad y el comportamiento hedónico.
- B-** Determinar si el tratamiento con tianeptina revierte los posibles cambios, producidos por el modelo de depresión, en las variables analizadas a nivel central y conductual.

- C-** Estudiar si, en ratas adultas, la separación materna temprana modifica:
- C₁)** el número de neuronas inmnoreactivas a GR, a MR y/o el balance MR/GR en el hipocampo dorsal, el NPV y los núcleos CeA y MeA.
 - C₂)** la actividad neuronal (c-Fos) en las estructuras anteriores y también en ATV, NAc y CPFm.
 - C₃)** la conducta de ansiedad y el comportamiento hedónico.
- D-** Verificar si, en las estructuras centrales y en las conductas analizadas, tianeptina revierte los posibles cambios producidos por la separación materna temprana.
- E-** Valorar si la separación materna temprana produce susceptibilidad o resiliencia a las alteraciones, inducidas por el modelo de depresión en los animales adultos, sobre:
- E₁)** el número de neuronas inmunoreactivas a GR, a MR y/o el balance MR/GR en el hipocampo dorsal, el NPV y los núcleos CeA y MeA.
 - E₂)** la actividad neuronal (c-Fos) de las estructuras arriba mencionadas y también en ATV, NAc y CPFm.
 - E₃)** la conducta de ansiedad y el comportamiento hedónico.
- F-** Determinar si el tratamiento con tianeptina revierte los posibles cambios, producidos por la interacción entre la separación materna temprana y el modelo de depresión, en las variables analizadas a nivel central y conductual.
- G-** Como un indicador de estrés, se determinaron los niveles de corticosterona plasmática en todos los grupos experimentales.

GR = receptor de glucocorticoides || **MR** = receptor de mineralocorticoides || **NPV** = núcleo paraventricular
CeA = núcleo central de la amígdala || **MeA** = núcleo medial de la amígdala || **ATV** = área tegmental ventral
NAc = núcleo accumbens || **CPFm** = corteza prefrontal medial

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Se utilizaron 120 ratas macho derivadas de la cepa Wistar (peso final: 250 – 300g), provenientes de 30 camadas diferentes. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales constantes de temperatura ($21^{\circ} \pm 1^{\circ}$) y ciclo luz - oscuridad de 12 h (encendido de las luces a las 7:00 h), con agua y comida *ad-libitum* excepto cuando el tratamiento o las pruebas conductuales no lo permitieron.

Inicialmente, dos o tres hembras fueron colocadas en presencia de un macho no emparentado y sexualmente activo. Estos grupos se mantuvieron por 15-18 días y luego cada hembra fue alojada individualmente en una caja de polietileno de 45x30x20 cm. De cada uno de estos grupos, al menos una hembra fue asignada aleatoriamente para cada una de las condiciones de crianzas: criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM). Las hembras preñadas fueron revisadas 2 veces al día (a la mañana y a la tarde) para determinar el día del nacimiento, el cual fue designado como día postnatal (DPN) 0. El día siguiente (DPN 1) las camadas fueron reducidas hasta un número de 8 crías (4 machos y 4 hembras cuando fue posible), sacrificándose los animales que superaron ese número.

Se utilizaron 16 camadas CM (n=64) y 14 SM (n=56). En ambos grupos, el destete de los animales se realizó el DPN 22. Luego del destete solo las ratas machos de cada camada fueron utilizadas, permaneciendo juntas hasta el DPN 50 y siendo manipuladas diariamente por el mismo investigador con el objeto de evitar el estrés al aplicarle los tratamientos. A los 50 días de edad las ratas macho de cada camada (CM o SM) fueron subdivididas al azar en 4 grupos: (sin estrés-vehículo; sin estrés-tianeptina; con estrés-vehículo; con estrés-tianeptina) quedando conformados así los 8 grupos experimentales que se describen en la tabla 1. De esta forma cada grupo experimental estuvo conformado por individuos provenientes de diferentes camadas (no hermanos). Cada uno de los grupos CM estuvo formado por un total de 16 individuos y cada uno de los grupos SM, por 14. A partir del DPN 50 los animales fueron alojados en grupos de a 4, dentro de cajas de polietileno de 60x40x20 cm, y permanecieron así hasta el final del experimento.

Tabla 1: Grupos experimentales

• Criadas con la madre (CM)	• Separadas de la madre (SM)
(A) Sin ECV	(C) Sin ECV
1- CM+V: Ratas criadas con la madre, sin estrés y tratadas con vehículo (grupo control)	5- SM+V: Ratas separadas de la madre, sin estrés y tratadas con vehículo.
2- CM+T: Ratas criadas con la madre, sin estrés y tratadas con tianeptina	6- SM+T: Ratas separadas de la madre, sin estrés y tratadas con tianeptina.
(B) ECV	(D) ECV
3- CM+E+V: Ratas criadas con la madre, sometidas a estrés crónico variable y tratadas con vehículo	7- SM+E+V: Ratas separadas de la madre, sometidas a estrés crónico variable y tratadas con vehículo.
4- CM+E+T: Ratas criadas con la madre, sometidas a estrés crónico variable y tratadas con tianeptina	8- SM+E+T: Ratas separadas de la madre, sometidas a estrés crónico variable y tratadas con tianeptina.

Abreviaciones: ECV: estrés crónico variable

En resumen, se aplicó un diseño factorial (2 x 2 x 2), con los siguientes factores: “Separación Materna” (SM o CM), “Estrés Crónico Variable” (con estrés o sin estrés) y “Droga” (tianeptina o vehículo). De cada grupo experimental, un subconjunto de animales fue asignado para determinación de corticosterona (n=48) y otro subconjunto para inmunohistoquímica (n=40). En este último subconjunto se determinó la expresión de Fos, GR y MR en los núcleos CeA y MeA, en el NPV del hipotálamo (región parvocelular) y en las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorsal. Además se evaluó la inmunoreactividad a Fos en el ATV, NAc y en las áreas cingulada 1 (Cg1), prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) de la CPFm. Además, todos los animales (n=120) fueron evaluados en los test conductuales para obtener los índices de ansiedad, por medio del laberinto en cruz elevada (*elevated plus maze*), y el estado hedónico, por medio del test de consumo y preferencia por la sacarosa (fig. 6). Dado que algunos animales no produjeron resultados (por ejemplo por goteo de la botella en el test de consumo de sacarosa, o por la presencia de ruido

SM = separados de la madre || CM = criados con madre || GR = receptor de glucocorticoides
 MR = receptor de mineralocorticoides || CeA = núcleo central de la amígdala || MeA = núcleo medial de la amígdala
 NPV = núcleo paraventricular || GD = giro dentado || ATV = área tegmental ventral || NAc = núcleo accumbens
 CPFm = corteza prefrontal medial

o disturbio durante el *plus maze*, etc.) el número final de animales por grupo, para cada medición, se indica en el gráfico correspondiente.

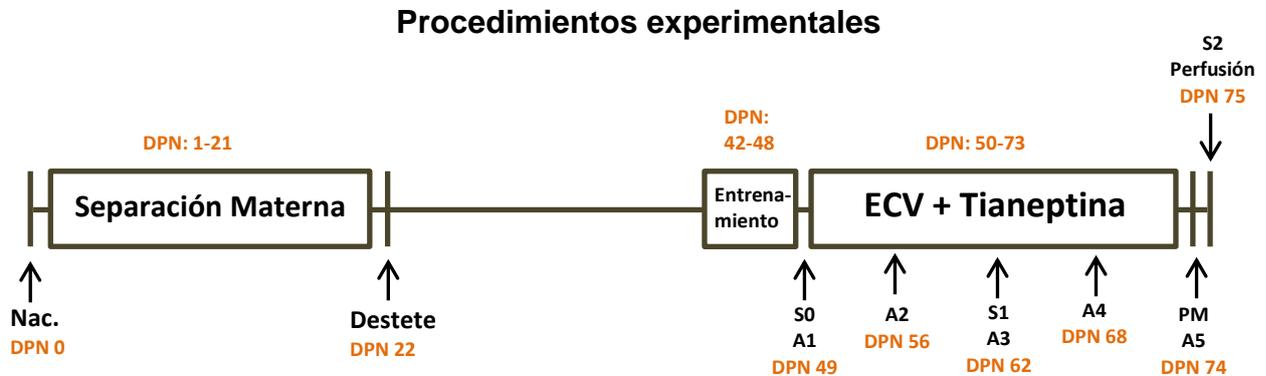


Fig. 6. Procedimientos experimentales. Abreviaciones: Nac.: Nacimiento; DPN: día postnatal; Entrenamiento: entrenamiento previo al test de anhедonia; ECV: estrés crónico variable; S0-2: extracciones de sangre basal, 1 y 2, respectivamente; A1-5: sesiones 1-5, respectivamente, del test de anhедonia; PM: *plus maze*. Ver texto para más detalles.

3.2. SEPARACIÓN MATERNA

Las crías de las camadas SM fueron diariamente separadas de su madre durante 4,5 h, desde el DPN 1 al DPN 21 (Ogawa y col. 1994). La separación consistió en sacar la madre de su caja y colocarla sola en otra caja, en la misma sala. Todas las crías de la camada permanecieron juntas, en la misma caja de crianza hasta el final del periodo de separación. Después de 4,5 h la madre fue regresada a su caja junto con sus crías. La separación se realizó entre las 8:30 y las 13:00 h. Las crías de las camadas CM permanecieron en la caja de crianza junto a su madre y sólo fueron perturbadas para la limpieza rutinaria.

3.3. MODELO DE DEPRESIÓN

En los grupos en que correspondía (grupos con estrés), los animales fueron sometidos a un estrés crónico variable, aleatorio e impredecible, en el cual el estresor varía en tipo, intensidad y duración. Este protocolo se extendió por 24 días (desde el DPN 50 hasta el DPN 73), con los siguientes *estresores*: ruido durante 4 h producido por una alarma de 85 dB (repetido 6 veces durante el protocolo); anestesia etérea hasta pérdida de reflejos (repetido 5 veces);

SM = separados de la madre || DPN = día postnatal || CM = criados con madre

inmovilización por 1 h en cilindros metálicos de 6 cm de diámetro (4 veces); dos inyecciones de solución salina isotónica espaciadas en 4 h (3 veces) y privación de alimento por 24 h (3 veces). Además hubo días sin estrés o descansos (3 veces) (Suárez y col. 1996). Los tipos de estresores, el día y hora en el cual fueron aplicados se eligieron aleatoriamente, excepto para el día 24. En este caso el ruido fue usado como el último estresor previo a las pruebas conductuales.

3.4. ANTIDEPRESIVO

La tianeptina, de **Laboratorios Servier** (nombre comercial *Stablon*), fue inyectada diariamente por vía i.p., en una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal, ya utilizada por otros investigadores (Castanon y col. 2003; Datla y Curzon 1993; Reznikov y col. 2007; Venzala y col. 2012), para lo cual fue disuelta en solución salina al 0,9%, en un volumen de 0,5 ml por inyección. El vehículo (solución salina isotónica), se administró a los grupos correspondientes por la misma vía (i.p.) y en igual volumen (0,5 ml) que la droga. Este tratamiento comenzó en el DPN 50 y se continuó durante 24 días, simultáneamente con el protocolo de estrés.

3.5. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA

3.5.1. Extracción de sangre: A cada animal se le tomaron 3 muestras de sangre. Un día antes de comenzar el protocolo de estrés y/o el tratamiento con la droga o vehículo (DPN 49), se tomó una muestra (basal). Luego de 12 días de comenzado los tratamientos (DPN 62) se realizó otra extracción (tiempo 1) y por último, se les sacó sangre a los animales antes del sacrificio, el DPN 75 (tiempo 2). La extracción de sangre se realizó entre las 8 y las 10 h. El procedimiento consistió en colocar los animales de a uno, sobre una bolsa de goma con agua tibia, para producir un efecto vasodilatador, siendo el animal sostenido gentil pero firmemente por un investigador, a la vez que otro realizaba la extracción de sangre por punción de la vena lateral caudal, utilizando una aguja de 25 G x 5/8. La sangre fue colocada en tubos de microcentrífuga (eppendorfs) previamente heparinizados, que luego fueron centrifugados a 3000 r.p.m. durante 30 min. El sobrenadante fue recuperado con una jeringa Hamilton de

i.p. = intraperitoneal || DPN = día postnatal

50µl. El plasma así obtenido fue conservado a -20°C hasta la valoración de la hormona corticosterona. En cada extracción se obtuvieron entre 100 y 300 µl de sangre.

Por una dificultad metodológica, los niveles de corticosterona plasmática en los grupos criados con la madre, tratados con vehículos con y sin estrés, fueron determinados en un laboratorio diferente al resto de los grupos.

3.5.2. Grupos CM+V y CM+E+V: La estimación de la concentración de corticosterona plasmática se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Río Cuarto por la técnica de radioinmunoensayo (RIA), utilizando los siguientes reactivos específicos: Tampón fosfato 0,01M; pH 8,2; conteniendo 0,9% NaCl y 0,1% de gelatina; corticosterona tritiada con una actividad específica de 70-80 Ci/mmol; anticuerpo contra corticosterona obtenida en conejo (Bioclin, UK); y corticosterona sintética (Sigma-Aldrich) como patrón. El día del análisis se confeccionó una curva patrón utilizando una solución tampón de RIA y Corticosterona en distintas diluciones. Se utilizaron además, tubos cero (tampón, hormona marcada y anticuerpo) y tubo de uniones no específicas (NSB) (tampón y hormona marcada). A continuación se tomaron alícuotas de anticuerpo y se disolvieron en el tampón de RIA en la proporción determinada por la valoración del anticuerpo, colocando 100 ul en cada tubo de RIA (excepto los de uniones no específicas). Luego se utilizó una solución de trabajo disolviendo la hormona marcada en un tampón de RIA que contiene siempre 8000cpm/100ul de tampón. Después de 24 horas se preparó una suspensión de carbón activado (1%) que se agregó a cada tubo y posteriormente fueron centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Una vez concluida la centrifugación se decantó el sobrenadante en los viales de centelleo, se agregó líquido de centelleo y se determinó la radiactividad en un contador beta. Se determinó el porcentaje de unión según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{cpm de la muestra o estándar} - \text{cpm del tubo NSB}}{\text{cpm tubo cero} - \text{cpm del tubo NSB}}$$

Para cada una de las muestras se calculó el porcentaje de unión y se extrapoló en la curva patrón a fin de obtener el valor correspondiente a la concentración de corticosterona.

3.5.3. En los demás grupos: la estimación de la concentración de corticosterona plasmática se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica Humana de la Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires). La extracción de la muestra se realizó con diclorometano (DCM) (5 µl de muestra + 45 µl de tampón fosfato). Se hicieron 2 extracciones con 300 µl de

CM = criados con madre || V = tratados con vehículo || E = con estrés crónico || NaCl = cloruro de sodio
cpm: cuentas por minuto

DCM cada vez. Una vez evaporado el solvente por calor, se re-suspendieron los esteroides en 100 µl de tampón fosfato (PB) y toda la muestra se utilizó para un tubo de RIA. Para cada muestra se hicieron 2 extracciones en paralelo. El punto más bajo de la curva con el que se obtuvo desplazamiento fue en 31 pg de corticosterona.

3.6. ÍNDICES DE ANHEDONIA

Este test constó de 5 sesiones. La primera sesión se realizó el DPN 49. Luego se efectuó una sesión cada 6 días (en los DPN 56, 62, 68, 74) siendo la última el mismo día del test conductual de ansiedad. En cada sesión se colocó una rata por caja con dos tubos de vidrio graduado durante 3 h (de 14 a 17 h), uno con agua y otro con una solución de sacarosa al 1%. Ambos tubos contuvieron más cantidad de líquido de lo que pueden beber los animales. Se tomaron 2 medidas del estado hedónico: 1- Consumo específico de sacarosa (cantidad de solución de sacarosa consumida por gramo de peso corporal) y 2- Preferencia por la sacarosa (sacarosa consumida x 100 / total de líquido consumido). Con el fin de aplicar correctamente esta prueba se entrenó a los animales, durante la semana previa a la primera sesión, a beber 3 h por día (Zimmerberg y Brett 1992; Zurita y col. 1996), ofreciéndole para esto 2 botellas, una con agua y otra con una solución de sacarosa al 1%, idéntica a la utilizada en el momento de realizar el test conductual. La posición de las botellas se alteró diariamente. Este régimen de consumo de líquido se mantuvo hasta el final del experimento.

3.7. ÍNDICES DE ANSIEDAD

24 horas después del último *estresor* (DPN 74) se obtuvieron los índices de ansiedad a través del test laberinto en cruz elevada (*elevated plus maze test*). La misma se realizó entre las 10 y las 12 h; los animales fueron transportados a la sala experimental 2 h antes para permitir la adaptación al nuevo ambiente. El aparato utilizado para esta prueba conductual (fig. 7) consiste en una plataforma con forma de cruz, elevada 50 cm del piso. Dos de los brazos (50 x 10 cm), enfrentados entre sí tienen, a ambos lados, paredes de 40 cm de altura (brazos cerrados), mientras que los otros 2 brazos no tienen paredes (brazos abiertos). Este test de ansiedad está basado en el compromiso entre la típica conducta exploratoria de los roedores y el temor natural que sienten a los espacios abiertos y elevados, prefiriendo

DCM = diclorometano || RIA = radioinmunoensayo || DPN = día postnatal

permanecer en los brazos cerrados (Pellow y col. 1985). Al inicio de la prueba, cada rata fue colocada en el área central (10 x 10 cm) del aparato, mirando hacia un brazo cerrado y se le permitió explorar libremente el laberinto durante 5 minutos. La conducta de los animales fue filmada para luego obtener los siguientes parámetros: número de entradas a los brazos abiertos; número de entradas a los brazos cerrados; y tiempo de permanencia en los brazos abiertos. A partir de ellos se calcularon 2 índices de ansiedad: 1- *porcentaje de entradas en brazos abiertos* (EBA) y 2- *tiempo de permanencia en los brazos abiertos* (PBA). Un aumento de estos valores indica un menor nivel o índice de ansiedad. Por otro lado, el número total de entradas fue utilizado como un índice de locomoción (Dawson y Tricklebank 1995). Se consideró como una entrada cuando ambas patas delanteras de la rata estuvieron dentro del brazo. Entre cada medición con el animal, el aparato fue limpiado con etanol al 20% para eliminar los rastros de olor.

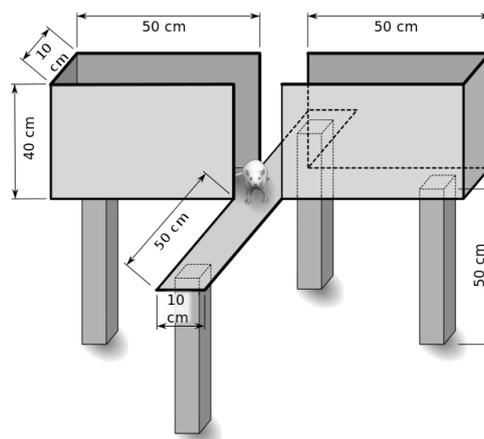


Fig. 7. Aparato de laberinto en cruz elevada

3.8. INMUNOHISTOQUÍMICA

3.8.1. Obtención de los cerebros: La perfusión y fijación de los animales se llevó a cabo el día siguiente al de la prueba de ansiedad, el DPN 75, entre las 9 y las 12 h. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral al 6% (9 ml/Kg de peso corporal) y se canuló la aorta ascendente transcárdialmente, con una aguja conectada a una bomba de perfusión. Se dejó pasar 60 ml de solución salina para reemplazar la sangre y luego se pasaron 150 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M con 0,2% de solución saturada de ácido pícrico en etanol). Posteriormente se procedió a la extracción de los cerebros, los cuales fueron sumergidos en la solución de fijación durante 24 h y luego traspasados a una solución de sacarosa al 20% en PB 0,1 M para su conservación a 4°C, hasta el momento del seccionado.

3.8.2. Obtención de los cortes: Con la guía de un atlas (Paxinos y Watson 2007) y utilizando un micrótopo de congelación, se realizaron cortes coronales de 40µm que contuvieran las estructuras de interés, dividiéndolos en 3 grupos (Fos, GR y MR).

DPN = día postnatal || PB = tampón fosfato || GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de mineralocorticoides

3.8.3. Inmunomarcación: Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena, sumergiendo los cortes flotantes (*free floating*) en una solución de metanol al 10% y H₂O₂ al 10%. Luego, los cortes fueron lavados 3 veces durante 5 min en PB 0,01 M y se bloquearon las uniones inespecíficas con 10% de suero normal de caballo (NHS) en PB 0,1 M.

Los cortes de los 3 grupos antes mencionados se incubaron durante 48 h a 4°C en una solución de PB 0,1 M conteniendo 2% de NHS, 0,3% de Tritón X-100 y uno de los siguientes anticuerpos primarios de acuerdo al grupo (Fos, GR o MR) correspondiente: anticuerpo policlonal de conejo anti-Fos (*rabbit anti-Fos*; Ab-5, Oncogene Science) (dilución 1:10000), anticuerpo policlonal de conejo anti-GR (*rabbit anti-GR*; E-20, sc-1003, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1:250) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-MR (*mouse anti-MR*; 1-18 1D5) (dilución 1:500), este último donado por el Dr. Gomez-Sanchez (Facultad de Endocrinología, Centro Médico de la Universidad de Mississippi) (Gomez-Sanchez y col. 2006).

Luego, los cortes fueron enjuagados 3 veces durante 5 min en PB 0,01 M e incubados durante 1,5 h a temperatura ambiente y en agitación, en una solución de PB 0,1 M con 2% de NHS, 0,15% de Tritón X-100 y el anticuerpo secundario biotilado correspondiente: anticuerpo de cabra anti-conejo (*goat anti-rabbit*; Jackson) (dilución 1:1000), para GR y para Fos; o anticuerpo de cabra anti-ratón (*goat anti-mouse*) (dilución 1:300), para MR. Los cortes fueron lavados 3 veces en PB 0,01 M. Finalmente la reacción se amplificó y reveló utilizando el complejo Avidin-Biotin-Peroxidasa (ABC Elite kit, Laboratorios Vector) y empleando 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) (0,05% p/v) como cromógeno.

3.8.4. Montaje: Las secciones con inmunomarcación Fos, GR o MR fueron montadas utilizando gelatina de Albrecht (gelatina 1,5% en alcohol 40%), secadas a temperatura ambiente por 24 h, desengrasadas sumergiéndolas en Xileno por 1,5 h y cubiertas con el medio de montaje DPX (Fluka, Buchs, Suiza).

3.8.5. Visualización: Posteriormente, el tejido fue analizado empleando un microscopio de campo claro (BX 41 Olympus) acoplado a una cámara de fotos digital de alta resolución (Olympus Corporation, Tokio, Japón), utilizando una magnificación de 100x (10x del objetivo x 10x del ocular). Las imágenes obtenidas fueron enviadas a una computadora dotada de un programa digitalizador de imágenes (*QCapture 2.90.1 / QCamDriver DLL v. 2.0.5*).

H₂O₂ = peróxido de hidrógeno || PB = tampón fosfato || GR = receptor de glucocorticoides
MR = receptor de mineralocorticoides

3.8.6. Cuantificación: Por último, las áreas de interés fueron delimitadas siguiendo el atlas de Paxinos y Watson (2007). De esta forma se cuantificaron las neuronas positivas para Fos, GR y MR en el NPV del hipotálamo (bregma: -1,08 a -1,56 mm), el hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD) (bregma: -2,76 a -3,60 mm) y los núcleos CeA y MeA (bregma: -2,16 a -2,76 mm). Además, se contaron las neuronas Fos positivas en CPFm (Cg1, PrL e IL) (bregma: 3,72 a 2,52 mm), NAc (bregma: 2,52 a 1,80 mm) y ATV (bregma -5,16 a -5,40 mm). La cuantificación de células se llevó a cabo por un método semiautomático, utilizando el programa *Fiji* (<http://fiji.sc/Fiji>). Se analizaron entre 4-7 secciones por rata, dependiendo del tamaño de la estructura estudiada.

3.9. MÉTODO ESTADÍSTICO

3.9.1. Corticosterona plasmática: Los valores de corticosterona determinados por laboratorios diferentes fueron incomparables, razón por la cual el análisis estadístico se hizo por separado. Para los grupos CM-V y CM-E-V, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas a 2 vías, con 1 factor independiente (*Estrés*) y un factor de medidas repetidas (*Tiempo*) con 3 niveles: *basal*, *tiempo 1*, *tiempo 2*. A continuación se realizó el test a *posteriori* de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD Fisher) con un nivel de significación de 0,05 ($\alpha = 0,05$). Mientras que para los grupos separados de la madre se utilizó un ANOVA de medidas repetidas a 3 vías, con los factores independientes *Estrés* y *Droga*, y el factor de medidas repetidas *Tiempo* con 3 niveles. Para el análisis estadístico se utilizó el programa *Statistica 7.0* (Stat Soft Inc., <http://www.statsoft.com>).

3.9.2. Índices de anhedonia: se realizó un ANOVA de medidas repetidas a 4 vías. En este diseño se consideraron 3 factores independientes (*Separación*, *Estrés* y *Droga*) y un factor de medidas repetidas (*Tiempo*) con 5 niveles: sesión 1, sesión 2, sesión 3, sesión 4 y sesión 5. A continuación se realizó el test a *posteriori* LSD Fisher con $\alpha = 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa *Statistica 7.0*.

3.9.3. Índices de ansiedad: Se aplicó la prueba de ANOVA a tres vías (*Separación*, *Estrés* y *Droga*), seguido del test a *posteriori* LSD Fisher con $\alpha = 0,05$. En el caso del índice *Porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos*, la variable fue transformada a

GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de mineralocorticoides || NPV = núcleo paraventricular
 GD = giro dentado || CeA = núcleo central de la amígdala || MeA = núcleo medial de la amígdala
 CPFm = corteza prefrontal medial || Cg = cingulada || PrL = prelímbica || IL = infralímbica || NAc = núcleo accumbens
 ATV = área tegmental ventral || CM = criados con madre || V = tratados con vehículo || E = con estrés crónico

“rango” por no presentar una distribución normal. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa *InfoStat*, v. 2014 (FCA – U.N.C., <http://www.infostat.com.ar>).

3.9.4. Neuronas inmunoreactivas a GR, MR y Fos: Los resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando un modelo lineal de efectos mixtos con 3 factores fijos (*Separación, Estrés y Droga*) y un factor aleatorio (*Individuo*), seguido del test a *posteriori* LSD Fisher con $\alpha = 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa *InfoStat*, v. 2014.

4. RESULTADOS

4.1. CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

Se determinó la concentración de corticosterona plasmática, en los grupos criados con madre, con y sin estrés, tratados con vehículo (fig. 8 -A-). Por otro lado se analizaron los grupos criados con madre, con y sin estrés, tratados con tianeptina y los separados de la madre, con y sin estrés, tratados con vehículo o con tianeptina (fig. 8 -B-). Se midieron los niveles de la hormona antes, durante y al final del protocolo de estrés (“basal”, “tiempo 1” y “tiempo 2”, respectivamente).

En el caso de los grupos criados con la madre, tratados con vehículo, con o sin estrés (fig. 8 -A-), se encontró una interacción significativa *Tiempo*Estrés* [$F_{(2,18)}=6,09$; $p=0,0096$]. El test *a posteriori* mostró que en el grupo no estresado, los niveles de corticosterona no cambian significativamente a lo largo del tiempo. Mientras que, en el grupo con estrés, los niveles de esta hormona aumentaron en los tiempos 1 y 2, respecto del tiempo basal y también respecto del grupo sin estrés. Además hubo un efecto significativo del factor principal *Estrés* [$F_{(1,18)}=37,11$; $p=0,0002$]. Siendo el efecto del protocolo de estrés usado, un aumento de la corticosterona plasmática en estos animales (CM con vehículo).

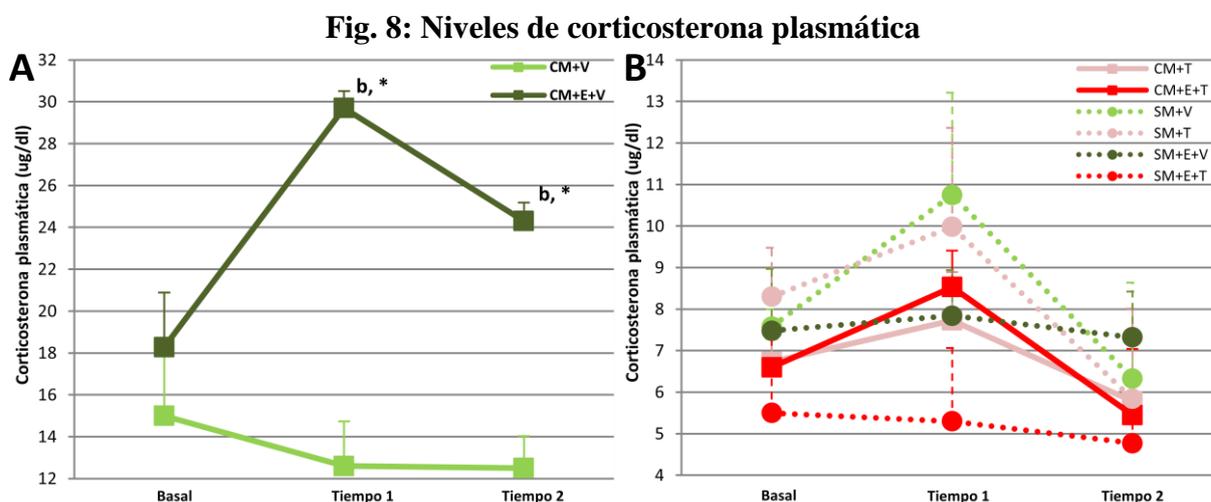


Fig. 8. Medias de los niveles de corticosterona plasmática. Panel A: Ratas criadas con la madre (CM), tratadas con vehículo (V), sin estrés (verde claro) (n=5) y con estrés (E) (verde oscuro) (n=6). Panel B: Ratas criadas con la madre (CM), tratadas con tianeptina (T), sin estrés (línea continua rosa) (n=4) y con estrés (línea continua roja) (n=4), ratas separadas de la madre (SM), sin estrés, tratadas con vehículo (línea punteada, verde clara) (n=4) o tianeptina (línea punteada rosa) (n=5) y ratas separadas de la madre, con estrés, tratadas con vehículo (línea punteada verde oscura) (n=5) o tianeptina (línea punteada roja) (n=3). (a) Indica diferencias significativas ($p<0,05$) vs. grupo sin estrés, en igual tiempo. (*) Indica diferencias significativas ($p<0,05$) vs. el tiempo basal del mismo grupo experimental.

Al analizar el resto de los grupos (fig. 8 -B-), no se encontraron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos y tampoco en los diferentes tiempos considerados.

La determinación de corticosterona en los grupos CM+V y CM+E+V fue realizada por un laboratorio diferente que en los demás grupos, por lo que no se pudieron comparar con ellos directamente. Debido a esto, para poder evaluar el efecto de la separación materna sobre los niveles de corticosterona plasmática, se consideró únicamente el tiempo basal (DPN 49), es decir antes de comenzar los tratamientos de estrés y/o droga (DPN 50-73) pero después de realizado el tratamiento de separación materna (DPN 1-21). Se realizó un ANAVA a 1 vía considerando sólo el factor *Separación*, excluyendo del análisis los grupos CM+V y CM+E+V. Al realizar este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos separados y los criados con la madre [$F_{(1,23)}=0,56$; $p=0,4607$]. Los niveles basales de corticosterona plasmática fueron $6,66 \pm 0,27$ $\mu\text{g/dl}$ (media \pm E.E.) para los animales criados con la madre (considerando conjuntamente los grupos CM+T y CM+E+T) y $7,39 \pm 0,65$ $\mu\text{g/dl}$ para los animales separados de la madre (considerando conjuntamente los 4 grupos SM).

4.2. CONDUCTA

4.2.1. Índices de ansiedad

Se realizó el test conductual *Plus Maze* a fin de determinar los índices de ansiedad de los animales (fig. 9). Los índices de ansiedad calculados fueron: 1- Porcentaje de permanencia en brazos abiertos (PBA) y 2- Porcentaje de entradas en brazos abiertos (EBA). Además, se consideraron las entradas totales (ET) como un índice de locomoción.

Fig. 9: Test de ansiedad - *Plus Maze* -

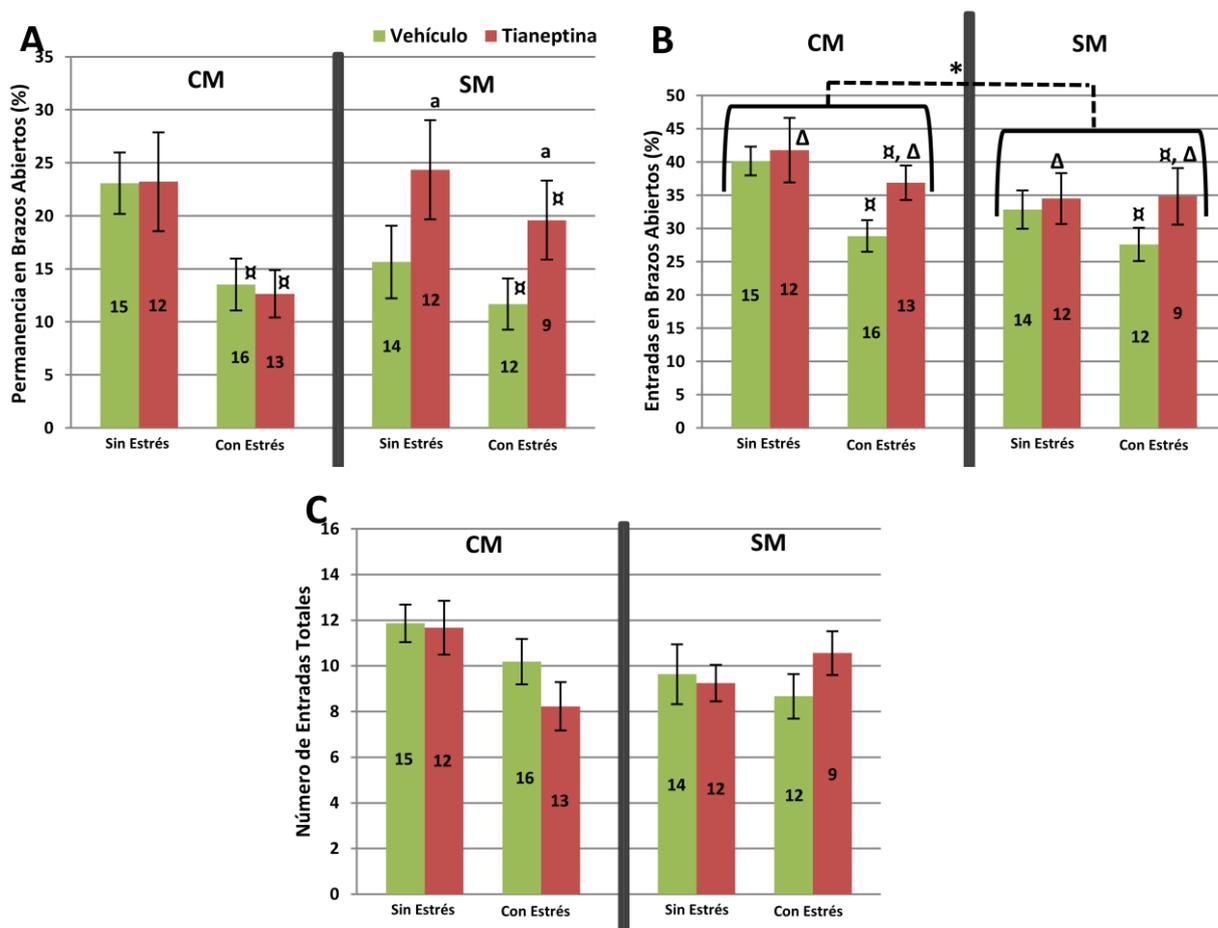


Fig. 9. Índices de Ansiedad. Porcentajes de permanencia (%PBA, Panel A) y entradas (%EBA, Panel B) en brazos abiertos y número total de entradas en brazos abiertos y cerrados (Panel C) en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. Para los %PBA y %EBA se encontró un efecto significativo del factor *Estrés*. (x) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos sin estrés. Además para el %PBA se encontró una interacción significativa *Separación* Droga*. (a) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo con vehículo respectivo. Para el %EBA se encontraron también efectos significativos del factor *Separación* y del factor *Droga*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada. (Δ) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos con vehículo.

En cuanto al porcentaje de PBA se encontró una interacción *Separación* Droga* significativa [$F_{(1,95)}=4,29$; $p=0,0410$]. Como puede verse en la figura 9 (A), en los grupos separados de la madre, el tratamiento con tianeptina aumentó el porcentaje de PBA, indicando un menor nivel de ansiedad respecto de los animales tratados con vehículo. Además, hubo un efecto significativo del factor *Estrés* ($F_{(1,95)}=6,85$; $p=0,0103$), observándose que los grupos estresados permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos respecto de los no estresados.

En el índice de porcentaje de EBA, se observó un efecto significativo de los 3 factores principales: *Separación* [$F_{(1,95)}=3,94$; $p=0,0500$], *Estrés* [$F_{(1,95)}=5,48$; $p=0,0213$] y *Droga* [$F_{(1,95)}=4,25$; $p=0,0420$], no habiéndose encontrado en este caso interacciones entre los factores en estudio. Con el test *a posteriori* LSD Fisher, se determinó que las ratas separadas de la madre entraron menos a los brazos abiertos que las criadas con la madre, demostrando así mayor conducta de ansiedad; de igual manera los animales estresados presentaron un menor porcentaje de EBA que los no estresados. En cambio, tianeptina mostró un efecto ansiolítico al aumentar el porcentaje de EBA respecto de los animales tratados con vehículo (fig. 9 -B-).

Por último, en las entradas totales (fig. 9 -C-), no hubo diferencias entre ninguno de los grupos.

4.2.2. Índices de anhedonia

A partir del test de anhedonia realizado se calcularon los índices de preferencia por la sacarosa y consumo específico de sacarosa (fig. 10). Las medidas de consumo y preferencia por la sacarosa fueron evaluadas el día antes de comenzar el tratamiento de estrés (sesión 1) y luego cada 6 días durante el protocolo de estrés (sesiones 2-5), siendo la última sesión realizada el día siguiente al último *estresor* aplicado.

Fig. 10: Índices de anhedonia

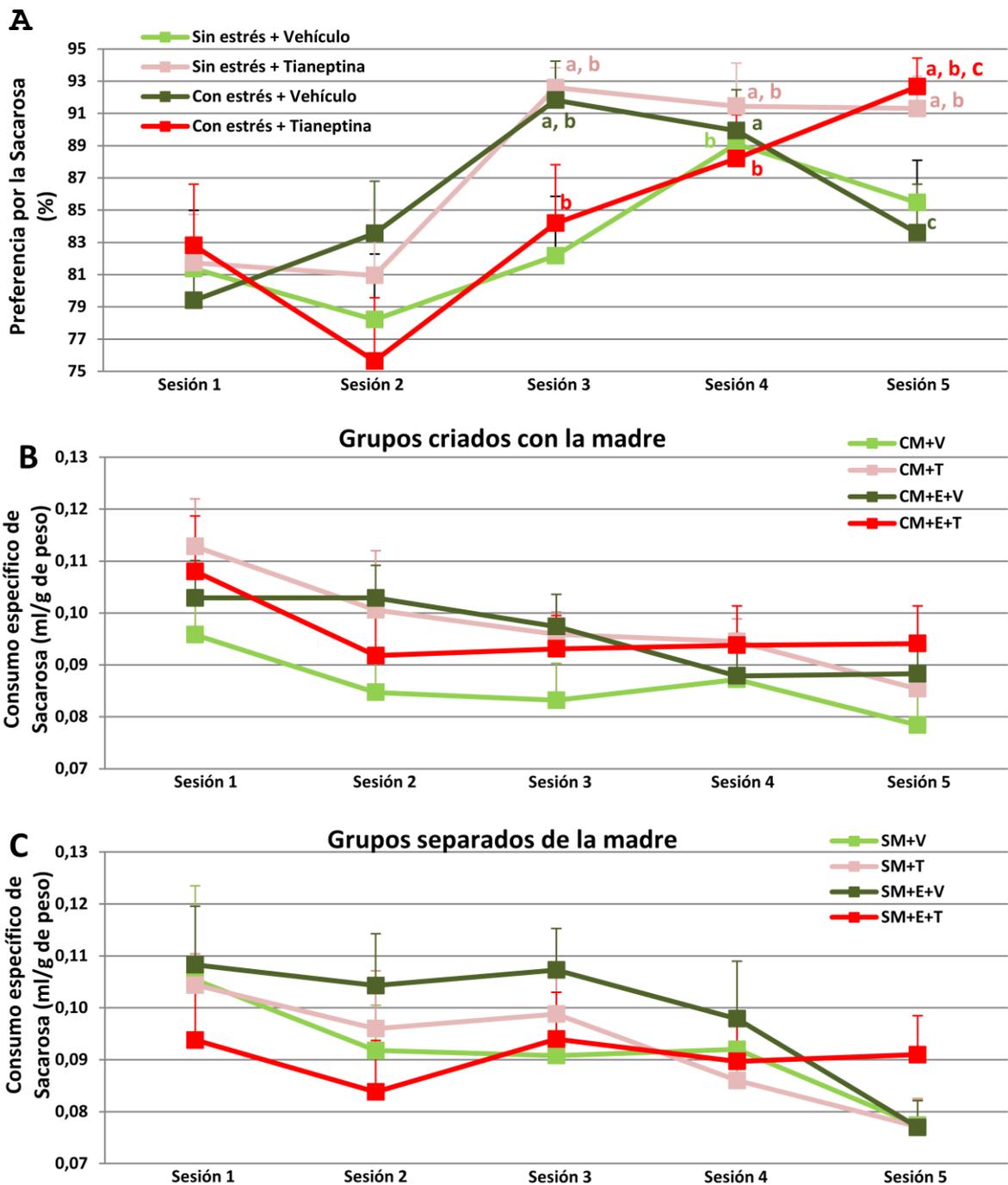


Fig. 10. Preferencia por la sacarosa en ratas sin estrés y con estrés, tratados con vehículo o tianeptina (Panel A). Consumo específico de sacarosa en ratas criadas con la madre (CM) (Panel B) o separadas de la madre (SM) (Panel C), sin estrés y con estrés (E), tratados con vehículo (V) o tianeptina (T). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Para la preferencia por la sacarosa se encontró una interacción significativa *Tiempo*Estrés* Droga*. (a) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. sesión 1 del mismo grupo experimental. (b) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. sesión 2 del mismo grupo experimental. (c) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. sesión 3 del mismo grupo experimental.

En cuanto al índice de preferencia por la sacarosa, se encontró una interacción significativa entre *Tiempo*Estrés*Droga* [$F_{(4,344)}=2,59$; $p=0,0367$]. El test a *posteriori* no encontró diferencias significativas entre los distintos tratamientos pero si entre diferentes sesiones, dentro de cada tratamiento. A los fines de simplificar la representación de estos datos y dado que el factor *Separación* no tuvo efectos significativos, en la figura 10 (A) se grafican los animales CM y SM conjuntamente. En dicha figura se observa que los animales no estresados, tratados con vehículo aumentan su preferencia por la sacarosa en la sesión 4 respecto de la 2, pero luego en la última sesión el índice de preferencia no se distingue de ninguno de los otros valores. Mientras que, los grupos no estresados y tratados con tianeptina tienen mayor preferencia por la solución dulce en las últimas 3 sesiones del test con respecto a las dos primeras. Por otra parte, los animales estresados tratados con vehículo presentan una mayor preferencia por la sacarosa en la tercera sesión, respecto de las 2 primeras, para luego disminuir esta preferencia levemente en la cuarta sesión, en la cual dicho índice sólo es mayor que el de la sesión 1; finalmente en la sesión 5 los animales disminuyen significativamente su preferencia por la sacarosa respecto de la sesión 3. A su vez, los grupos estresados y tratados con tianeptina mostraron una mayor preferencia por la sacarosa en las sesiones 3 y 4 respecto de la sesión 2. Además, en estos animales la preferencia por la solución dulce sigue aumentando y en la última sesión, este índice es mayor que en las 3 primeras sesiones.

Por último, también se encontró un efecto significativo del factor de medidas repetidas *Tiempo* [$F_{(4,344)}=10,13$; $p<0,0001$], sobre el índice de preferencia por la sacarosa. En este caso el test a *posteriori* mostró que la preferencia de los animales por la solución dulce, en general, aumenta en las últimas 3 sesiones, respecto a las 2 primeras.

El índice de consumo específico de sacarosa no fue afectado por ninguno de los factores en estudio (fig. 10 -B- y -C-).

4.3. NÚCLEO PARAVENTRICULAR

4.3.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a GR

Se determinó el número de neuronas ir-GR en el núcleo paraventricular del hipotálamo (fig. 11). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos en estudio.

Fig. 11: Inmunoreactividad a GR en núcleo paraventricular

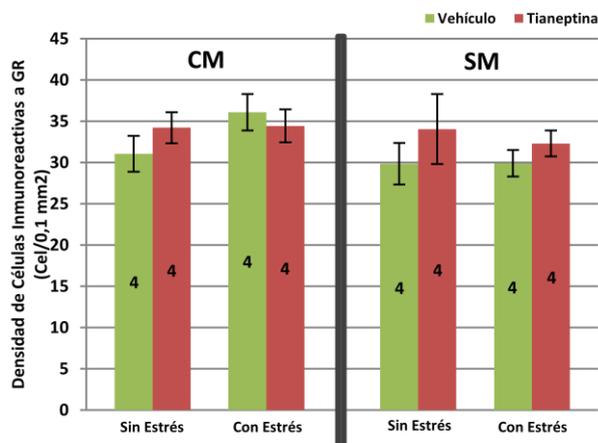


Fig. 11. Densidad de células inmunoreactivas a GR en el núcleo paraventricular hipotalámico en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratadas con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo.

4.3.2. Determinación de neuronas inmunoreactivas a MR

Se determinó el número de neuronas ir-MR en el núcleo paraventricular del hipotálamo (fig. 12). Se encontró una interacción entre los factores *Separación***Droga* [$F_{(1,24)}=12,10$; $p=0,0019$]. Con el test a *posteriori* LSD Fisher puede verse que, los animales SM tratados con tianeptina mostraron mayores niveles de células MR-positivas comparado con sus respectivos controles CM. Mientras que, este antidepressivo produjo una disminución de neuronas MR-positivas en los grupos CM, comparados con sus vehículo respectivo.

Fig. 12: Inmunoreactividad a MR en núcleo paraventricular

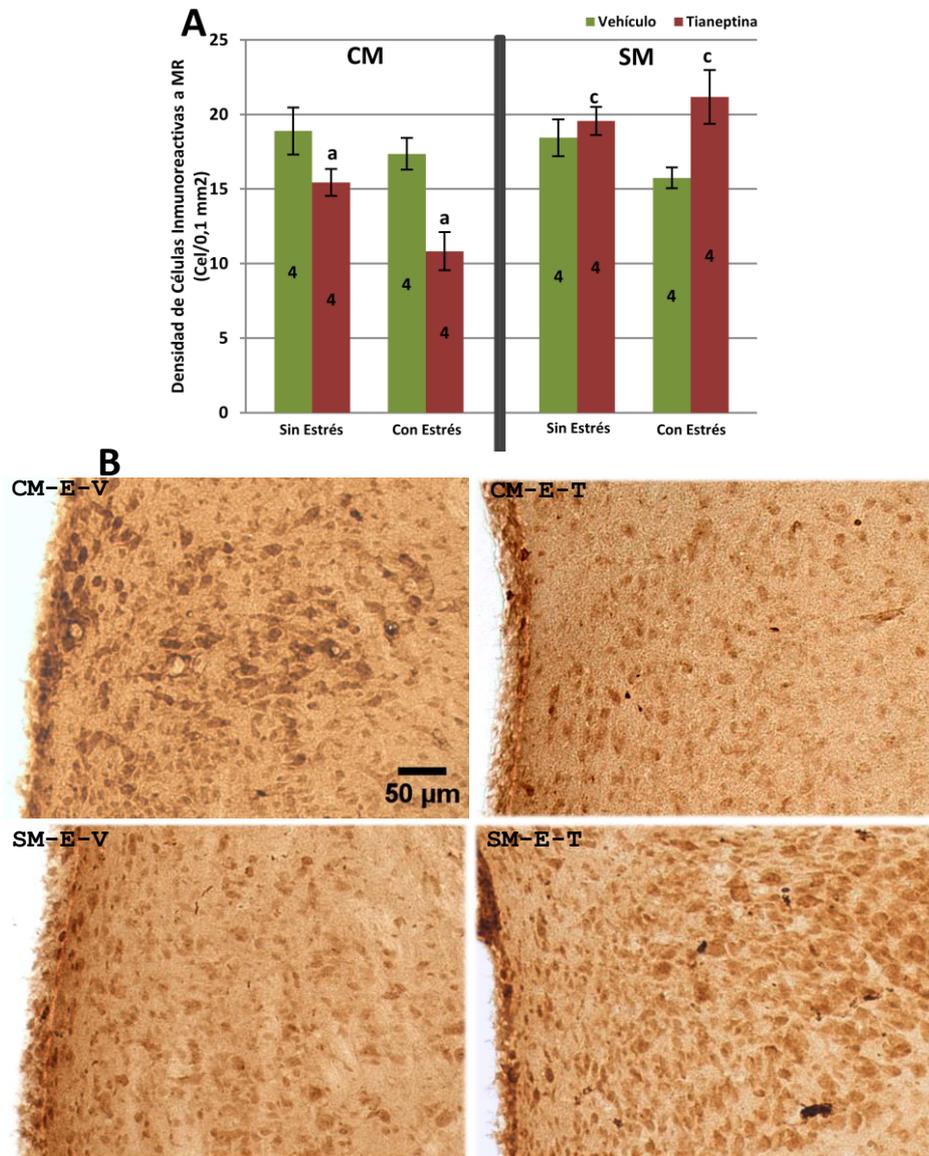


Fig. 12. ARRIBA (panel A): Densidad de células inmunoreactivas a MR en el núcleo paraventricular hipotalámico en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. Se encontró una interacción significativa *Separación* Droga*. (a) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo con vehículo respectivo. (c) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo CM respectivo ABAJO (panel B): Fotografías representativas de las neuronas ir-MR en el núcleo paraventricular del hipotálamo, en los grupos criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); criados con la madre, con estrés, tratados con tianeptina (CM-E-T); separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V); separados de la madre, con estrés, tratados con tianeptina (SM-E-T).

4.3.3. Balance MR/GR

Se calculó la relación entre neuronas ir-MR e ir-GR en el núcleo paraventricular del hipotálamo (fig. 13). Se observó un efecto significativo del factor *Separación* [$F_{(1,24)}=10,03$; $p=0,0042$], siendo el efecto general de la separación materna, aumentar el balance MR/GR.

Fig. 13: Balance MR/GR en núcleo paraventricular

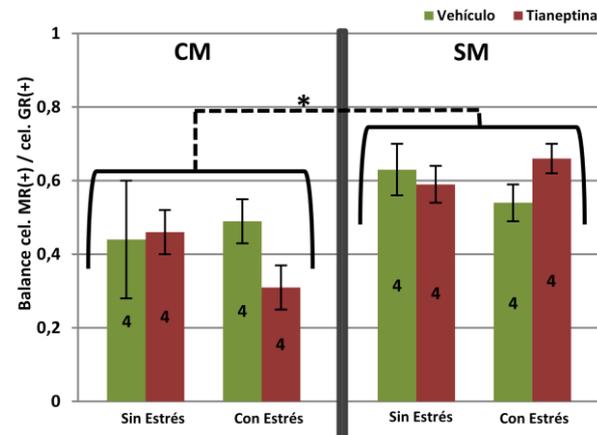


Fig 13. Balance entre células inmunoreactivas a MR y a GR en el núcleo paraventricular hipotalámico en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. Se encontró un efecto significativo del factor *Separación*. (*) Indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada.

4.3.4. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos

Se determinó el número de neuronas ir-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo (fig. 14). Se observó un efecto significativo del factor *Separación* [$F_{(1,26)}=7,15$; $p=0,0128$], observándose que los grupos SM tienen mayor actividad Fos que los CM. También se encontró un efecto significativo del factor *Estrés* [$F_{(1,26)}=4,48$; $p=0,0440$], presentando los animales estresados, mayor ir-Fos que los no estresados.

Fig. 14: Inmunoreactividad a Fos en núcleo paraventricular

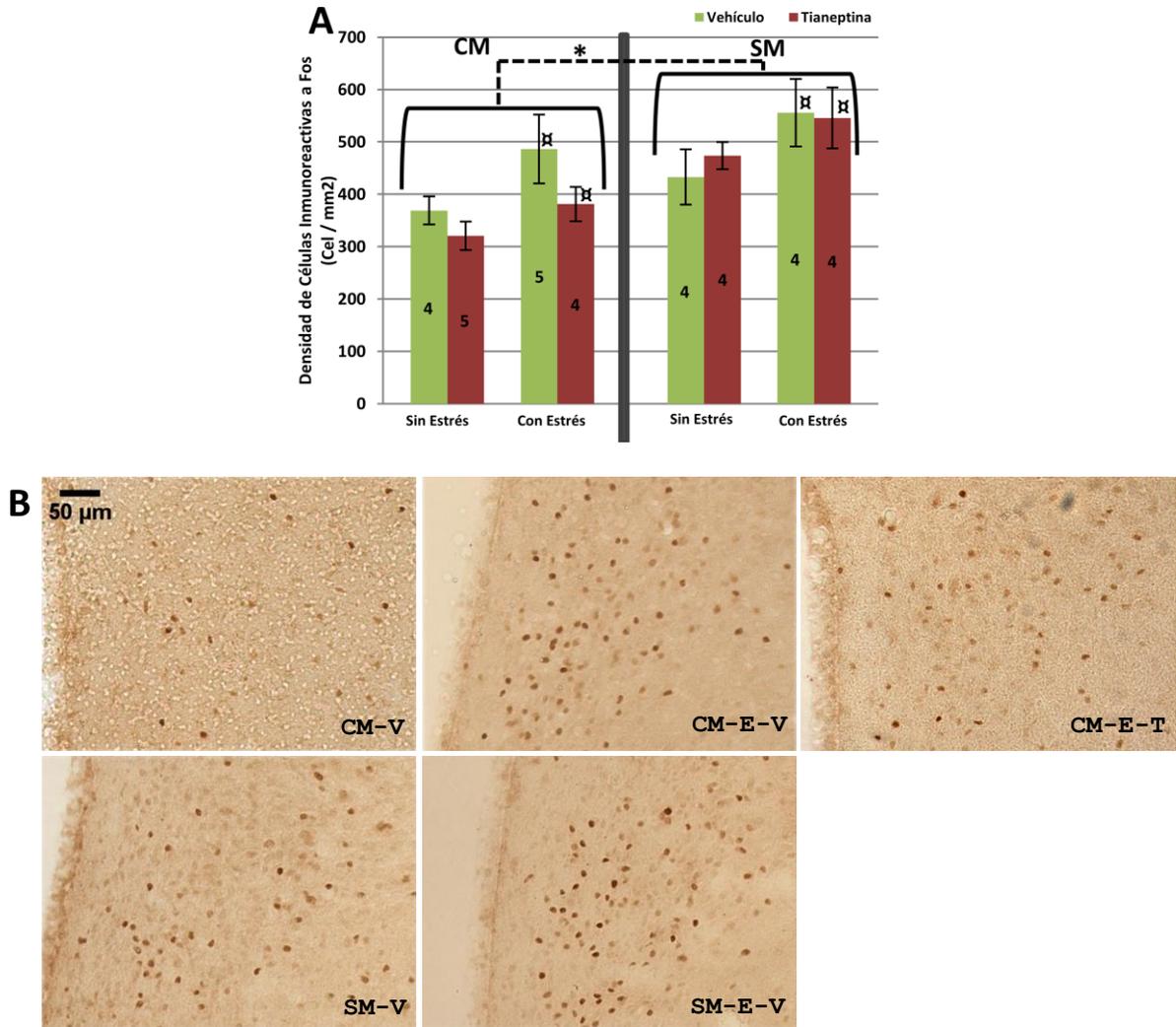


Fig 14. ARRIBA (panel A): Densidad de células inmunoreactivas a Fos en el núcleo paraventricular hipotalámico en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. Se encontraron efectos significativos del factor *Separación* y del factor *Estrés*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada. (x) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos sin estrés. ABAJO (panel B): Fotografías representativas de las neuronas ir-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo, en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); criados con la madre, con estrés, tratados con tianeptina (CM-E-T), separados de la madre, tratados con vehículo (SM-V); y separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V).

4.4. HIPOCAMPO DORSAL

4.4.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a GR

Se determinó el número de neuronas inmunoreactivas a GR en las capas CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorsal (fig. 15 y fig. 16).

Fig. 15: Inmunoreactividad a GR en hipocampo dorsal

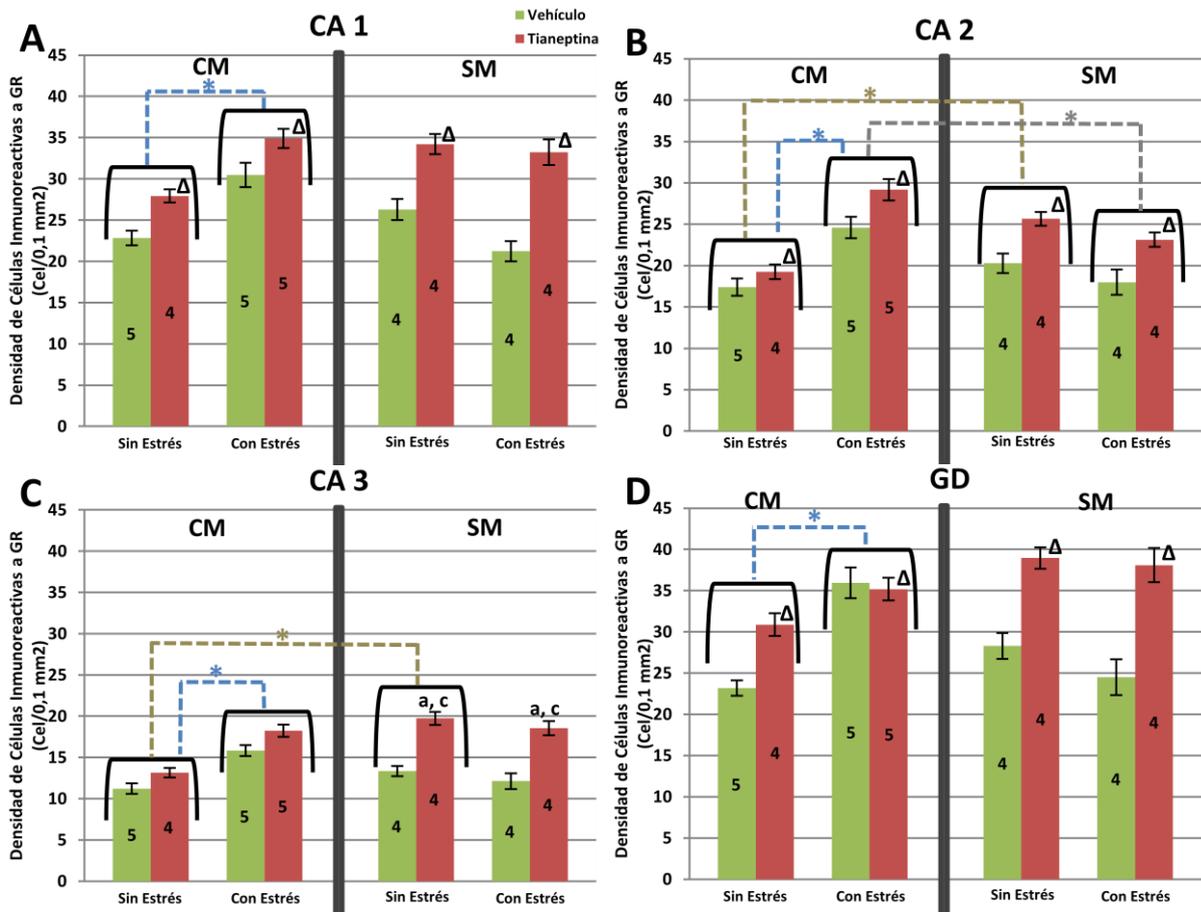


Fig. 15. Densidad de células inmunoreactivas a GR en las capas CA1 (panel A), CA2 (panel B), CA3 (panel C) y Giro Dentado (GD, panel D) del hipocampo dorsal en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En todas las capas se encontró una interacción significativa *Separación***Estrés*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada. En CA3 se encontró una interacción significativa *Separación***Droga*. (a) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo con vehículo respectivo. (c) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo CM respectivo. En las capas CA1, CA2 y GD se encontró un efecto significativo del factor *Droga*. (Δ) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos con vehículo.

En la capa CA1 (fig. 15 -A- y fig. 16 -A-), se encontró una interacción significativa entre *Separación***Estrés* [$F_{(1,27)} = 7,82$; $p = 0,0094$]. El test a *posteriori* LSD Fisher mostró que, en las ratas criadas con la madre, el estrés produjo un aumento de las células GR-positivas. En cambio en las ratas separadas de la madre este efecto del estrés no se observó. Además, hubo

un efecto significativo del factor *Droga* [$F_{(1,27)} = 15,74$; $p = 0,0005$], en donde el tratamiento con tianeptina aumento las células inmunoreactivas a GR (ir-GR).

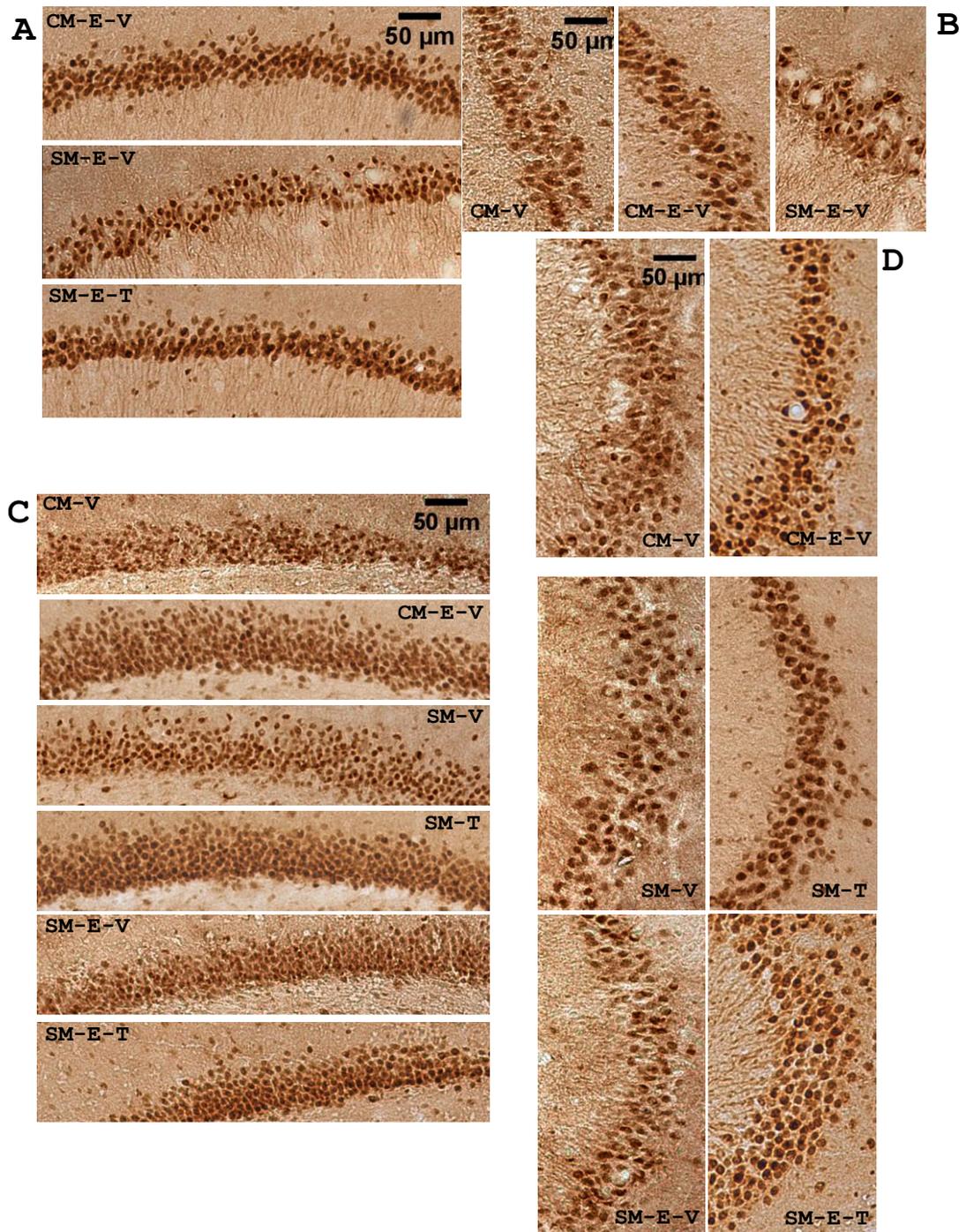


Fig. 16. Fotografías representativas de las neuronas ir-GR en las áreas CA1 (panel A), CA2 (panel B), giro dentado (panel C) y CA3 (panel D) del hipocampo dorsal en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); separados de la madre, tratados con vehículo (SM-V); separados de la madre, tratados con tianeptina (SM-T); separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V); y separados de la madre, con estrés, tratados con tianeptina (SM-E-T).

En la región CA2 (fig. 15 -B- y fig. 16 -B-), fue significativa la interacción *Separación*Estrés* [$F_{(1,27)}= 17,87$; $p=0,0002$]. En este caso, al igual que ocurre en el área CA1, el estrés produjo un aumento de las células ir-GR en las ratas criadas con la madre. Pero además, en CA2, la separación produjo una disminución de las células GR-positivas en los grupos estresados, mientras que, por el contrario, en los grupos no estresados, la separación aumentó esas células comparado con su control. Adicionalmente, se observó un efecto significativo del factor *Estrés* [$F_{(1,27)}=5,09$; $p=0,0323$], mostrando los grupos estresados mayores niveles de neuronas GR-positivas respecto de los no estresados. El factor *Droga* también mostró un efecto significativo [$F_{(1,27)}= 10,62$ $p= 0,0030$]; el test a *posteriori* demostró que el antidepresivo tiene como efecto general al aumentar las células ir-GR en esta región hipocampal.

En la capa CA3 (fig. 15 -C- y fig. 16 -D-) fue significativa la interacción *Separación*Estrés* [$F_{(1,27)} =9,20$; $p=0,0053$]. En este caso, se encontró que los animales sometidos a los tratamientos de estrés o de separación presentaron un aumento de ir-GR respecto de animales criados con la madre, sin estrés. También se encontró una interacción significativa *Separación*Droga* [$F_{(1,27)}=4,31$; $p=0,0476$]. El test a *posteriori* indicó que los animales SM, tratados con tianeptina presentaron mayores niveles de células GR-positivas respecto de todos los otros grupos. Finalmente, se encontró un efecto significativo del factor *Droga* [$F_{(1,27)} =19,80$; $p=0,0001$], observándose que el tratamiento con el antidepresivo aumentó las neuronas GR-positivas.

Por último en el giro dentado (fig. 15 -D- y fig. 16 -C-), al igual que en las otras 3 capas, se encontró una interacción significativa *Separación*Estrés* [$F_{(1,27)} =4,81$; $p=0,0371$]. En esta área, el estrés produjo un aumento de la inmunoreactividad a GR en los grupos criados con la madre. También se observó un efecto significativo del factor *Droga* [$F_{(1,27)}=9,78$; $p=0,0042$]. Al igual que en las otras capas del hipocampo dorsal, tianeptina aumentó la ir-GR respecto de los grupos tratados con vehículo

4.4.2 Determinación de neuronas inmunoreactivas a MR

Se determinó el número de neuronas inmunoreactivas a MR en las áreas CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorsal (fig. 17 y fig. 18).

En el área CA1 no hubo efectos significativos de ninguno de los factores o interacciones analizadas (fig. 17 -A-).

En el área CA2 (fig. 17 -B- y fig. 18 -A-) se encontró una interacción significativa entre *Separación*Estrés* [$F_{(1,24)} = 4,65$; $p = 0,0413$]. Se observó un aumento de células inmunoreactivas a MR (ir-MR) en los animales criados con la madre y estresados comparados tanto con los CM, sin estrés como con los SM, con estrés.

Fig. 17: Inmunoreactividad a MR en hipocampo dorsal

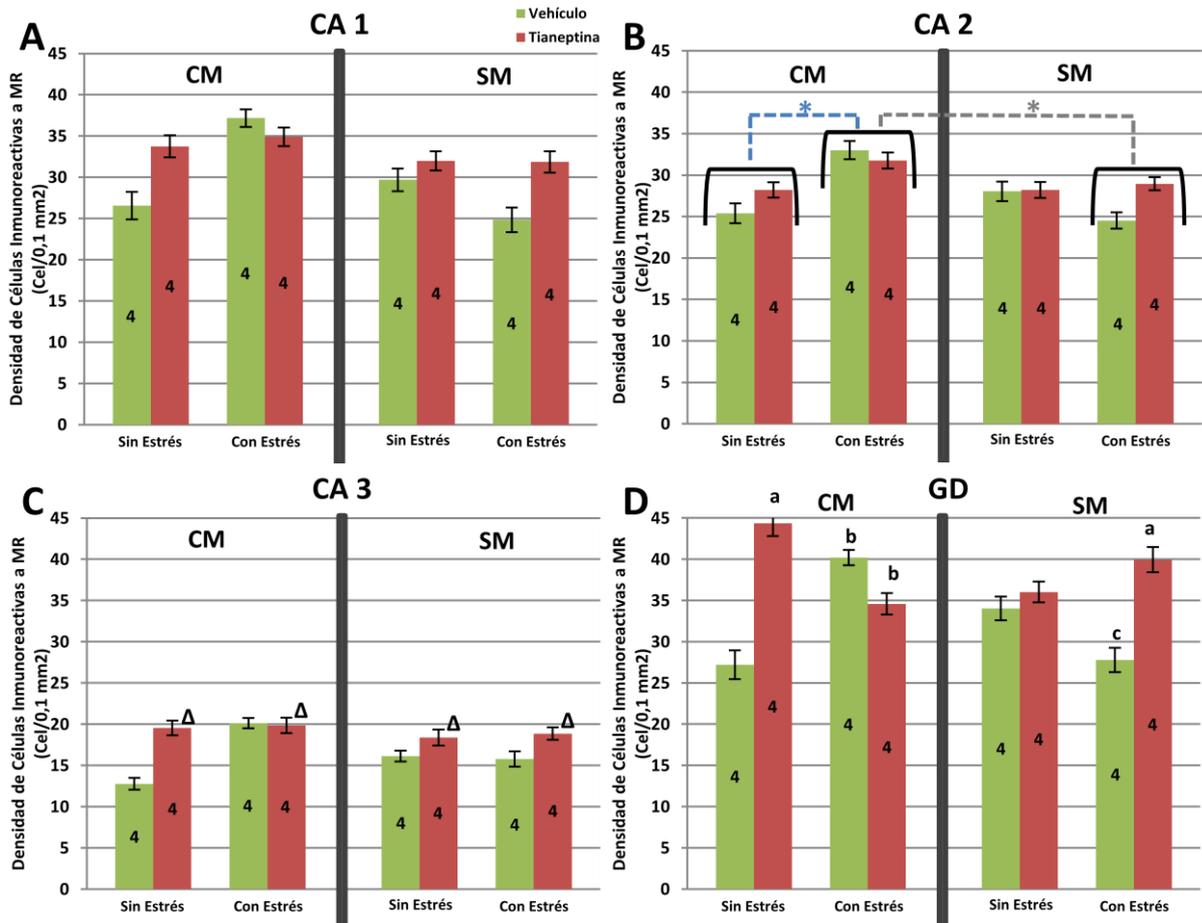


Fig. 17. Densidad de células inmunoreactivas a MR en las capas CA1 (panel A), CA2 (panel B), CA3 (panel C) y Giro Dentado (GD, panel D) del hipocampo dorsal en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En CA2 se encontró una interacción significativa *Separación*Estrés*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada. En CA3 se encontró un efecto significativo del factor *Droga*. (Δ) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos con vehículo. En GD se encontró una interacción triple significativa *Separación*Estrés*Droga*. (a) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo con vehículo respectivo. (b) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo sin estrés respectivo. (c) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo CM respectivo.

En CA3 (fig. 17 -C- y fig. 18 -B-) se observó un efecto significativo del factor *Droga* [$F_{(1,24)} = 5,42$; $p = 0,0286$]. El test a *posteriori* mostró que tianeptina aumentó la ir-MR respecto de los animales tratados con vehículo.

Por último en el giro dentado (fig. 17 -D- y fig. 18 -C-) fue significativa la interacción triple: *Separación*Estrés*Droga* [$F_{(1,24)} = 14,31$; $p = 0,0009$]. En este caso se observa que en ratas CM tratadas con vehículo, el estrés produjo un aumento de células MR-positivas. Por el contrario en los animales CM pero tratados con tianeptina, el estrés disminuye esas células. Además considerando los grupos estresados y con vehículo, los animales que fueron separados de la madre presentaron menores niveles de ir-MR que el grupo CM respectivo. Por otro lado, el tratamiento con el antidepresivo produjo un aumento de células MR-positivas, respecto del grupo vehículo correspondiente, tanto en los animales CM sin estrés como en los SM con estrés. Finalmente, se encontró un efecto significativo del factor *Droga* [$F_{(1,24)} = 8,96$; $p = 0,0063$], en donde el efecto general de la administración de tianeptina fue el aumento de la ir-MR.

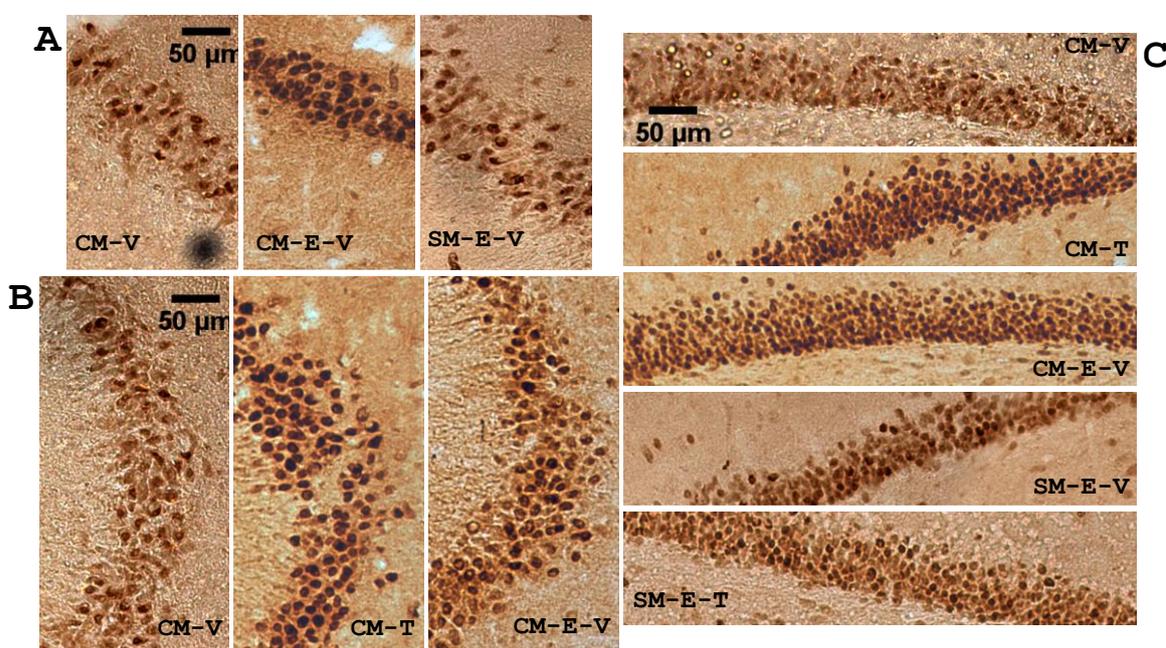


Fig. 18. Fotografías representativas de las neuronas ir-MR en las áreas CA2 (panel A), CA3 (panel B) y giro dentado (panel C) del hipocampo dorsal en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); criados con la madre, tratados con tianeptina (CM-T), criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V); y separados de la madre, con estrés, tratados con tianeptina (SM-E-T).

4.4.3. Balance MR/GR

Se calculó la relación entre neuronas ir-MR e ir-GR en las áreas CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorsal (fig. 19).

En las áreas CA1 (fig. 19 -A-) y CA2 (fig. 19 -B-) no se encontraron efectos significativos de ninguno de los factores analizados.

En el área CA3 (fig. 19 -C-) se encontró una interacción significativa *Separación* Droga* [$F_{(1,24)}= 4,30$; $p=0,0491$], observándose que en los animales tratados con tianeptina, la separación materna produjo una disminución del balance MR/GR.

En el giro dentado (fig. 19 -D-) fue significativa la interacción triple entre *Separación*Estrés*Droga* [$F_{(1,24)}=5,72$; $p=0,0250$]. El test a *posteriori* LSD Fisher indicó que la separación materna disminuyó el balance MR/GR en los animales no estresados y tratados con tianeptina.

Fig. 19: Balance MR/GR en hipocampo dorsal

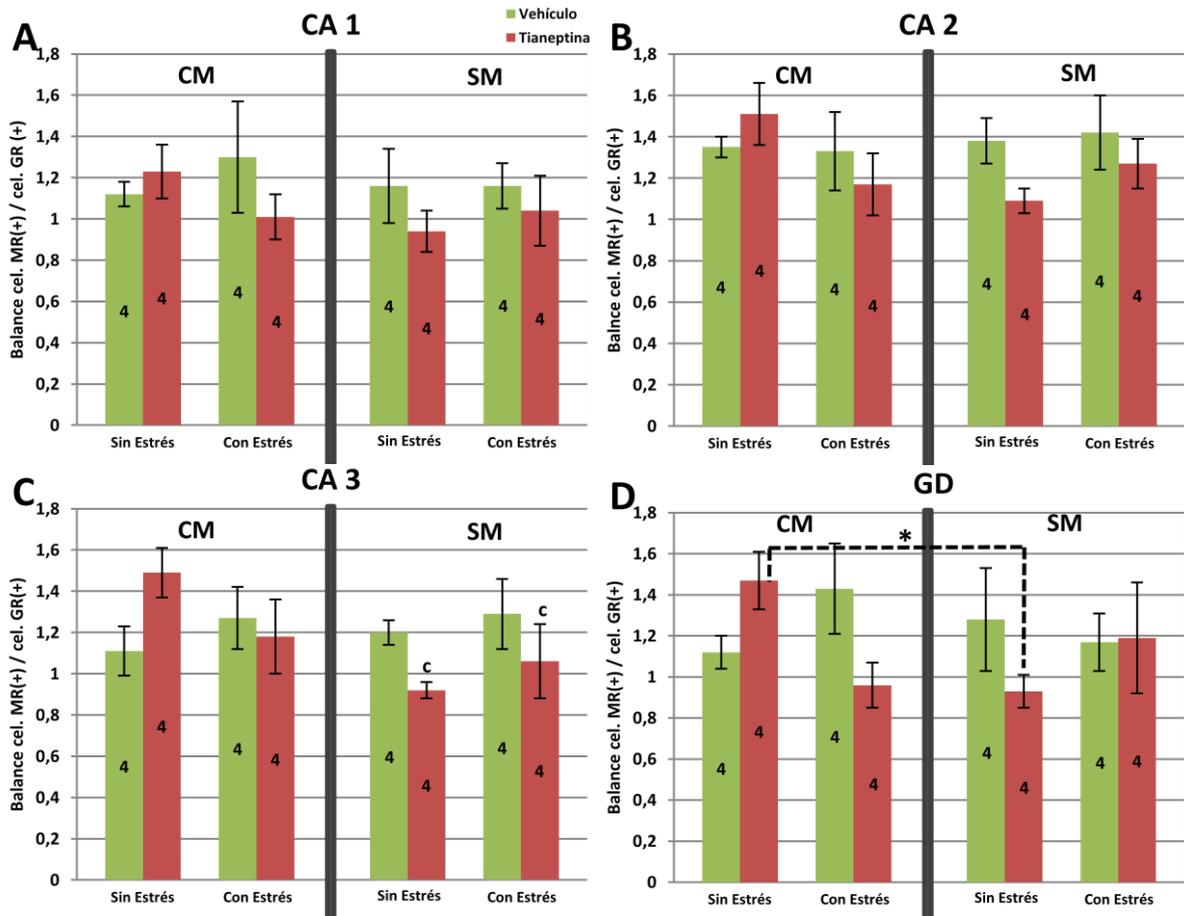


Fig 19. Balance entre células inmunoreactivas a MR y a GR en las capas CA1 (panel A), CA2 (panel B) , CA3 (panel C) y Giro Dentado (GD, panel D) del hipocampo dorsal en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En CA3 se encontró una interacción significativa *Separación*Droga*. (c) Indica diferencias significativas ($p<0,05$) vs. grupo CM respectivo. En GD se encontró una interacción triple significativa *Separación*Estrés*Droga*. (*) Indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada.

4.4.4. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos

Se determinó el número de neuronas inmunoreactivas a Fos en las áreas CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorsal (fig. 20 y fig. 21).

En el área CA1 (fig. 20 -A- y fig. 21 -A-) hubo un efecto significativo del factor *Separación* [$F_{(1,25)}=5,18$; $p=0,0316$], observándose que los grupos SM tienen mayor actividad Fos que los CM. Además se encontró un efecto significativo del factor *Estrés* [$F_{(1,25)}=4,36$; $p=0,0472$], presentando los animales estresados menor ir-Fos que los no estresados.

Fig. 20: Inmunoreactividad a Fos en hipocampo dorsal

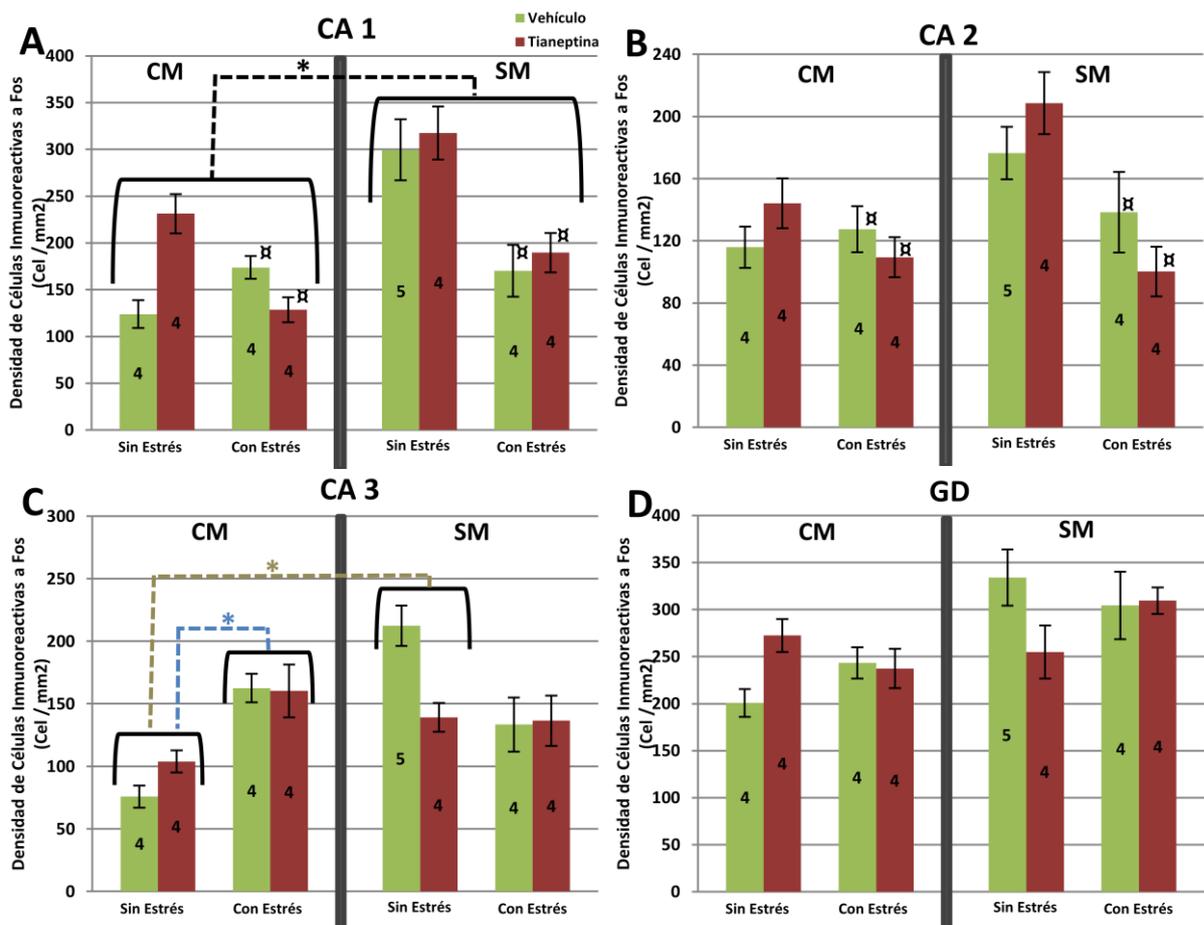


Fig. 20. Densidad de células inmunoreactivas a Fos en las capas CA1 (panel A), CA2 (panel B), CA3 (panel C) y Giro Dentado (GD, panel D) del hipocampo dorsal en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En CA1 se encontró un efecto significativo del factor *Separación*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada. En CA1 y en CA2 se encontró un efecto significativo del factor *Estrés*. (‡) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos sin estrés. En CA3 se encontró una interacción significativa *Separación***Estrés*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada.

En el área CA2 (fig. 20 -B- y fig. 21 -B-) también se observó un efecto significativo del factor *Estrés* [$F_{(1,25)}=4,53$; $p=0,0434$]. Al igual que en CA1, los grupos estresados disminuyeron su actividad neuronal en esta área.

En el área CA3 (fig. 20 -C- y fig. 21 -C-) se encontró una interacción entre *Separación***Estrés* [$F_{(1,25)}=6,04$; $p=0,0213$], observándose que, en los animales sometidos a los diferentes protocolos la ir-Fos fue mayor que la del grupo control (CM, no estresados).

Por último en el giro dentado (fig. 20 -D-) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los factores estudiados.

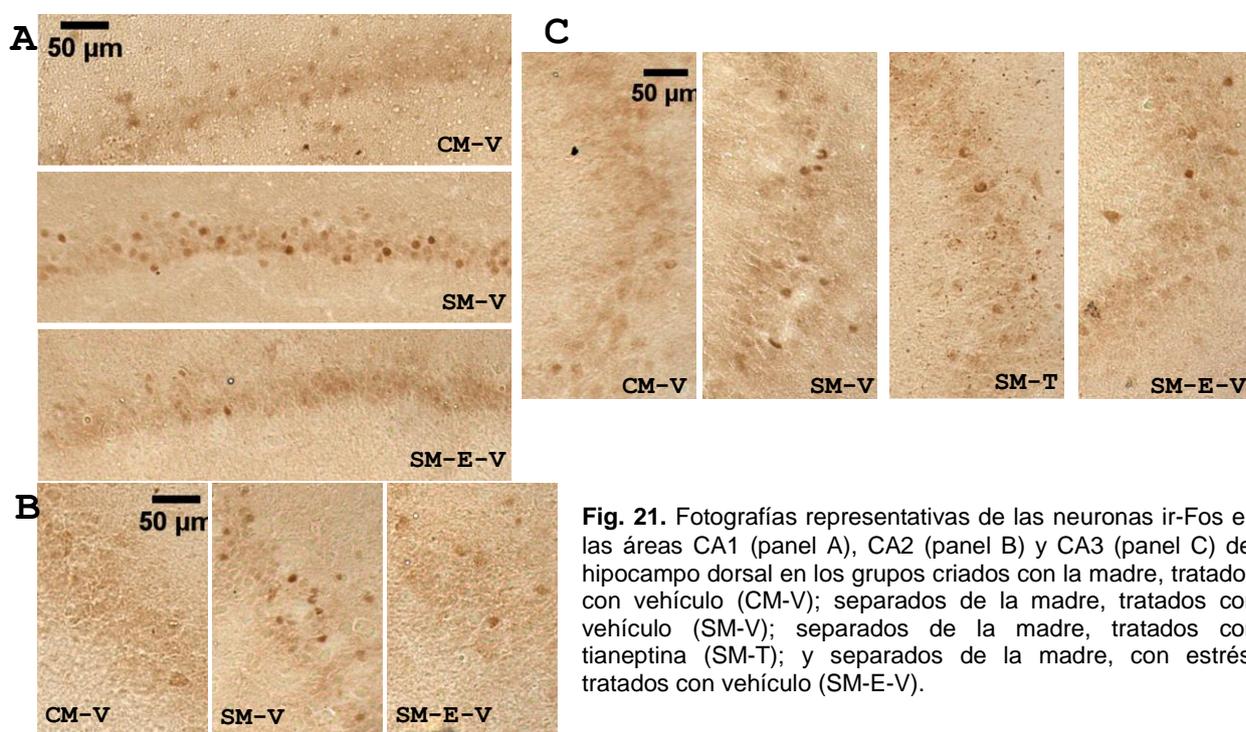


Fig. 21. Fotografías representativas de las neuronas ir-Fos en las áreas CA1 (panel A), CA2 (panel B) y CA3 (panel C) del hipocampo dorsal en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); separados de la madre, tratados con vehículo (SM-V); separados de la madre, tratados con tianeptina (SM-T); y separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V).

4.5. AMÍGDALA

4.5.1 Determinación de neuronas inmunoreactivas a GR

Se determinó el número de neuronas ir-GR en los núcleos MeA y CeA de la amígdala (fig. 22).

Fig. 22: Inmunoreactividad a GR en amígdala

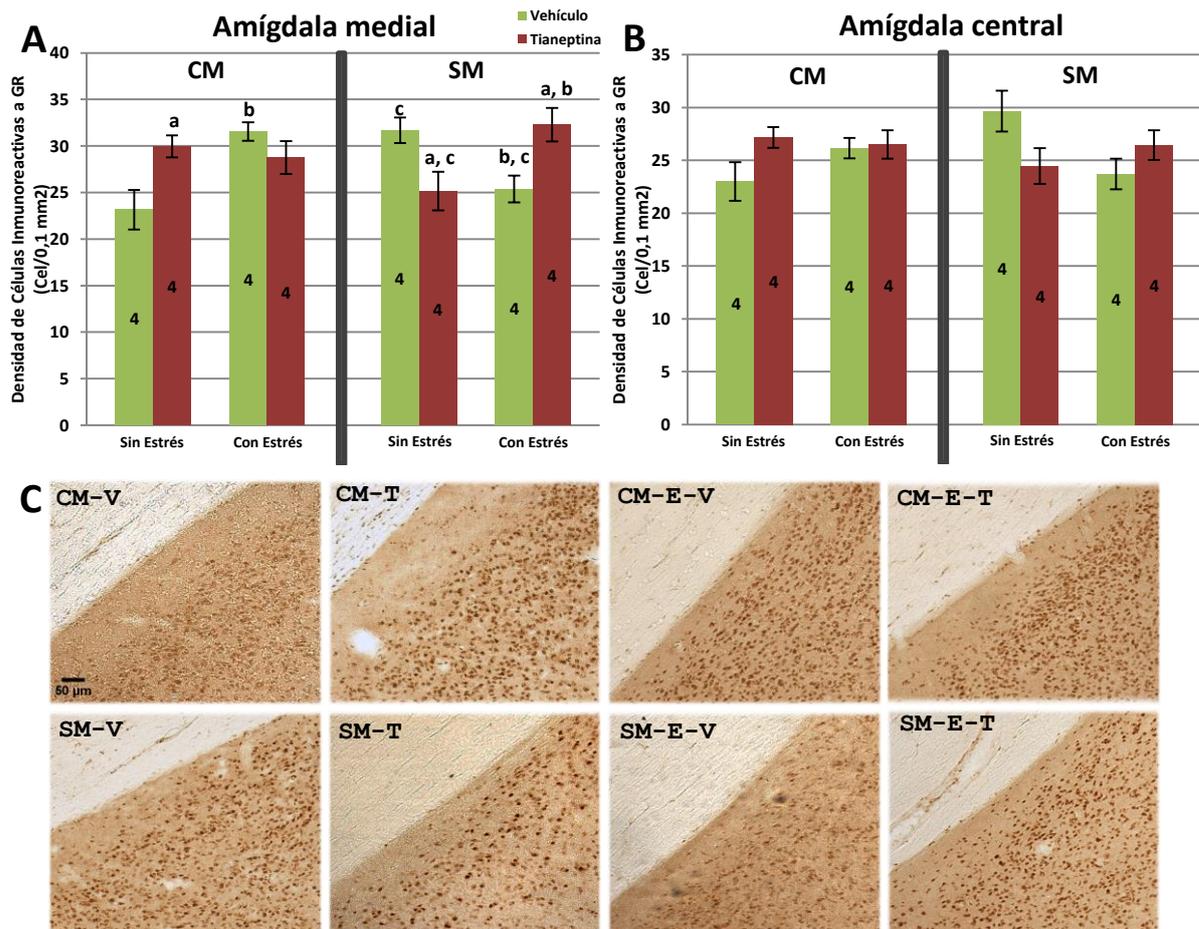


Fig. 22. ARRIBA (paneles A y B): Densidad de células inmunoreactivas a GR en los núcleos medial (panel A) y central (panel B) de la amígdala en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En la amígdala medial se encontró una interacción triple significativa *Separación*Estrés*Droga*. (a) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo con vehículo respectivo. (b) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo sin estrés respectivo. (c) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. grupo CM respectivo. ABAJO (panel C): Fotografías representativas de las neuronas ir-GR en el núcleo medial de la amígdala, en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); criados con la madre, tratados con tianeptina (CM-T); criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); criados con la madre, con estrés, tratados con tianeptina (CM-E-T), separados de la madre, tratados con vehículo (SM-V); separados de la madre, tratados con tianeptina (SM-T); separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V); y separados de la madre, con estrés, tratados con tianeptina (SM-E-T).

En el núcleo MeA (fig. 22 -A- y -C.) se encontró una interacción significativa entre *Separación*Estrés*Droga* [$F_{(1,24)}=5,94$; $p=0,0226$]. En la figura 22 (A) se observa que, en las ratas con vehículo, tanto el estrés (en los grupos CM) como la separación (en los grupos no estresados) produjeron un aumento de las células ir-GR; este mismo efecto del estrés se observa en los animales SM con tianeptina. En cambio el grupo SM, con estrés y vehículo presentó menor cantidad de células GR-positivas comparado tanto con el grupo no estresado respectivo como con el grupo CM correspondiente. Por último, el antidepresivo produjo un aumento de ir-GR tanto en las ratas CM sin estrés como en las SM con estrés, respecto del grupo tratado con vehículo correspondiente. Mientras que, por el contrario, en los animales SM no estresados el efecto del tratamiento con la droga fue la de disminuir las neuronas GR-positivas.

En el núcleo CeA (fig. 22 -B-), no se encontraron diferencias significativas con ninguno de los factores estudiados.

4.5.2. Determinación de neuronas inmunoreactivas a MR

Se determinó el número de neuronas ir-MR en los núcleos MeA y CeA de la amígdala (fig. 23). En estos núcleos, no se encontraron diferencias en la cantidad de neuronas ir-MR, bajo ninguno de los tratamientos aplicados.

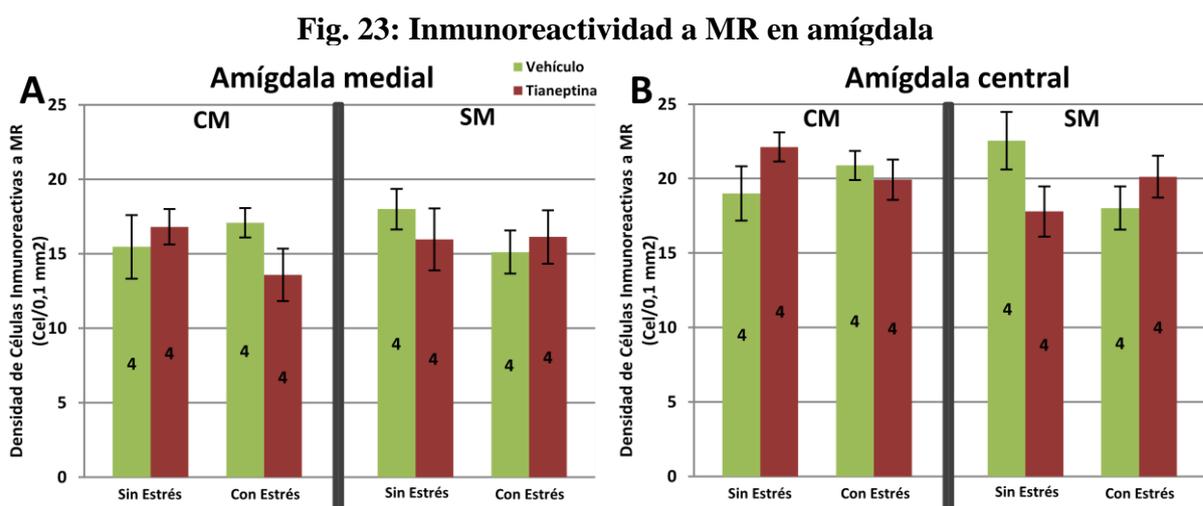


Fig. 23. Densidad de células inmunoreactivas a MR en los núcleos medial (panel A) y central (panel B) de la amígdala en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo.

4.5.3. Balance MR/GR

En los núcleos MeA y CeA de la amígdala, se calculó la relación entre neuronas ir-MR e ir-GR (fig. 24). No se encontraron diferencias significativas en el balance MR/GR en ninguno de los núcleos amigdalinos estudiados.

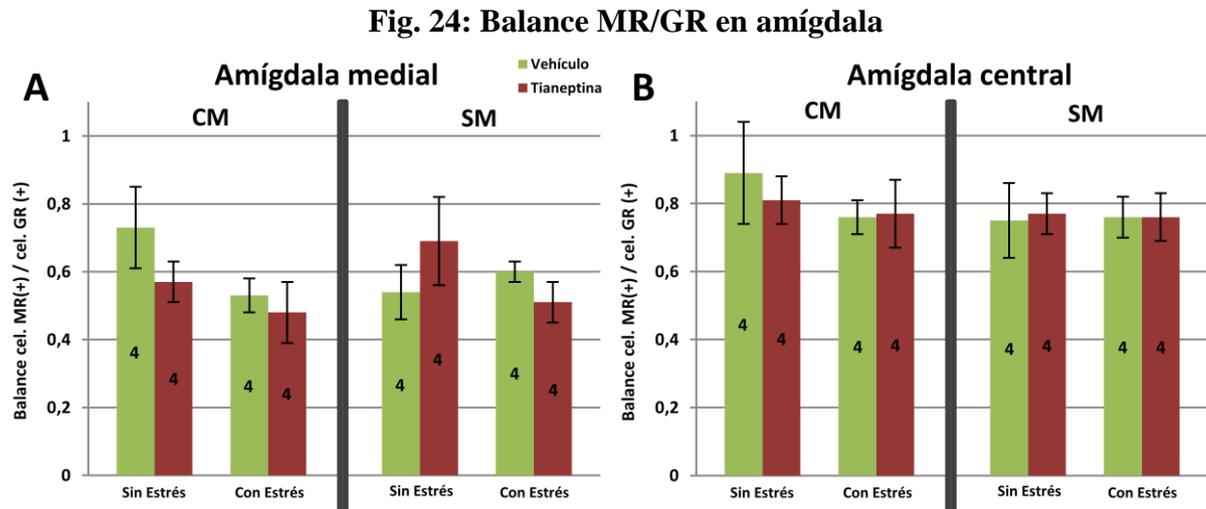


Fig. 24. Balance entre células inmunoreactivas a MR y a GR en los núcleos medial (panel A) y central (panel B) de la amígdala en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo.

4.5.4. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos

Se determinó el número de neuronas ir-Fos en los núcleos MeA y CeA de la amígdala (fig. 25). En la MeA hubo un efecto significativo del factor *Separación* [$F_{(1,26)}=5,20$; $p=0,0310$]. Como puede verse en la figura 25 (-A- y -C-), los animales separados de la madre mostraron mayor reactividad a Fos que los criados con la madre.

Por otra parte, en la CeA (fig. 25 -B-) no se encontraron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos.

Fig. 25: Inmunoreactividad a Fos en amígdala

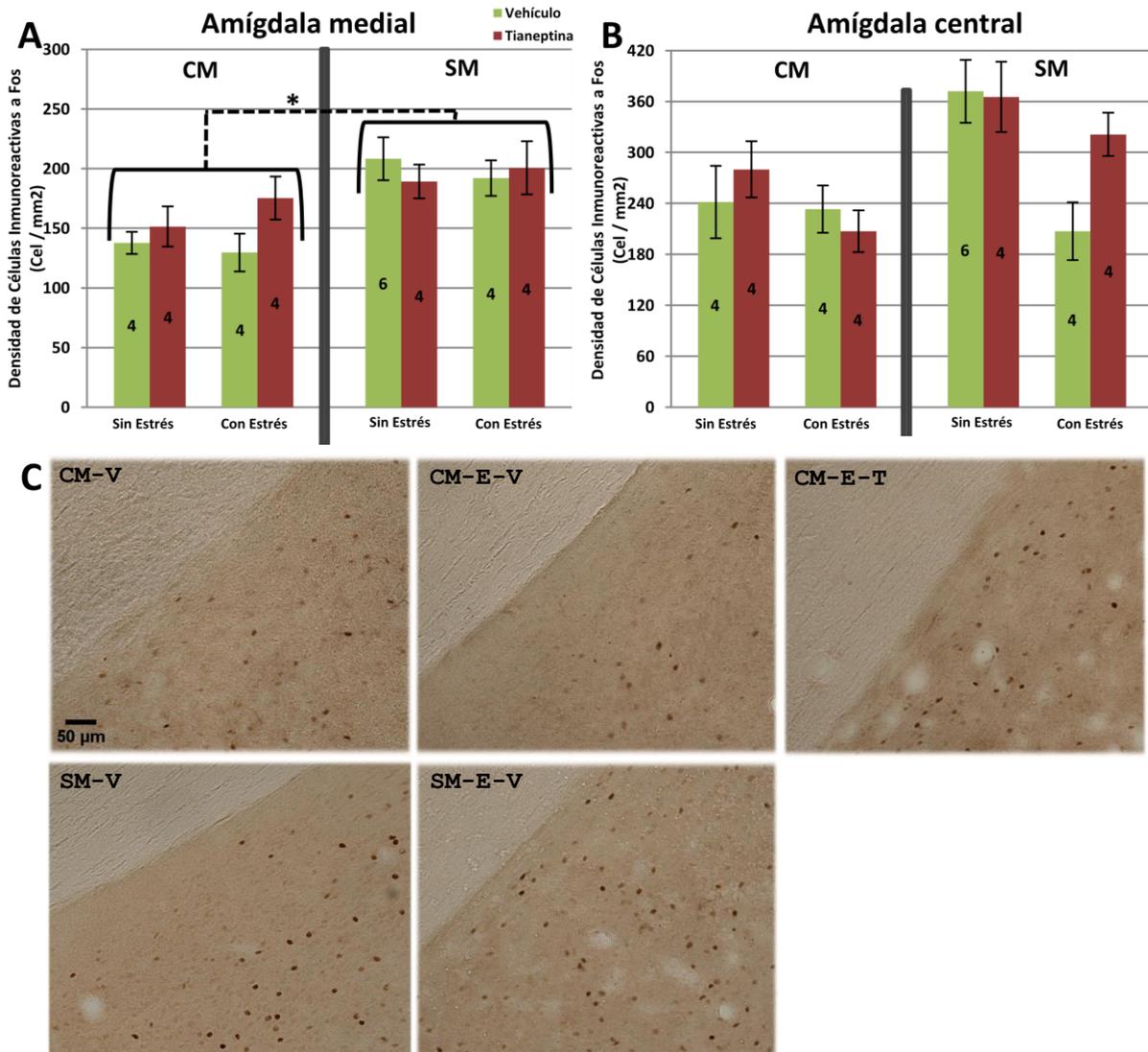


Fig. 25. ARRIBA (paneles A y B): Densidad de células inmunoreactivas a Fos en los núcleos medial (panel A) y central (panel B) de la amígdala en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En la amígdala medial se encontró un efecto significativo del factor *Separación*. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos señalados con la línea punteada. ABAJO (panel C): Fotografías representativas de las neuronas ir-Fos en el núcleo medial de la amígdala, en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); criados con la madre, con estrés, tratados con tianeptina (CM-E-T); separados de la madre, tratados con vehículo (SM-V); y separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V).

4.6. CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL

4.6.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos

Se determinó el número de neuronas ir-Fos en las áreas Cg1, PrL e IL de la CPFm (fig. 26). En la cortezas Cg1 y PrL se encontró un efecto significativo del factor *Estrés* [$F_{(1,26)}=6,08$; $p=0,0206$ y $F_{(1,26)}=9,13$; $p=0,0056$, respectivamente]. En ambas áreas (fig. 26 - A- y -B-), los animales estresados mostraron menor densidad de neuronas ir-Fos respecto de los grupos no estresados.

En la corteza IL no hubo diferencias significativas en la reactividad a Fos con ninguno de los tratamientos realizados.

Fig. 26: Inmunoreactividad a Fos en corteza prefrontal

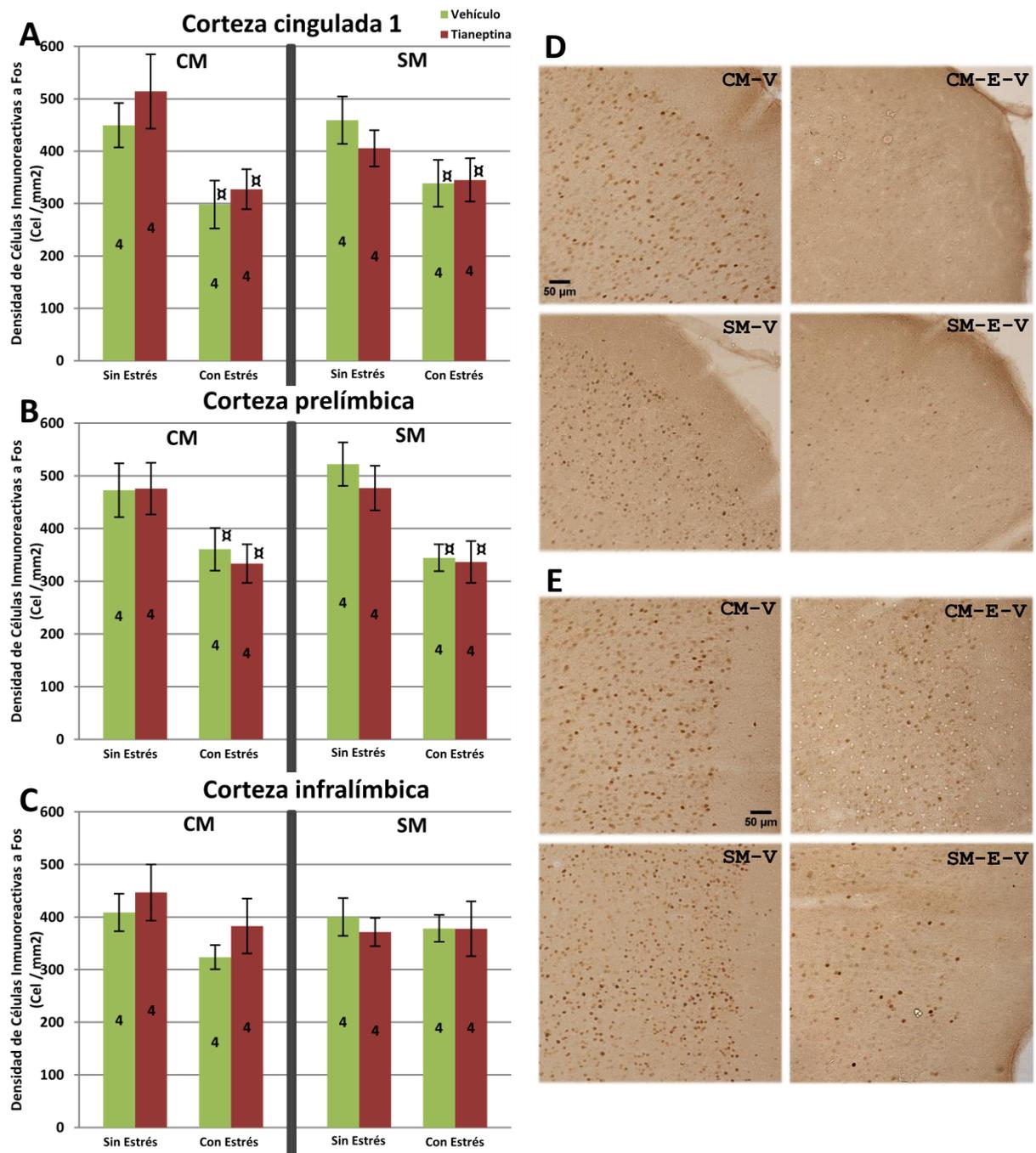


Fig. 26. IZQUIERDA (paneles A-C): Densidad de células inmunoreactivas a Fos en las áreas cingulada 1 (panel A), prelímbica (panel B) e infralímbica (panel C) de la corteza prefrontal medial en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. En las cortezas cingulada 1 y prelímbica se encontró un efecto significativo del factor *Estrés*. (x) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos sin estrés. DERECHA (paneles D y E): Fotografías representativas de las neuronas ir-Fos en las áreas cingulada 1 (panel D) y prelímbica (panel E) de la corteza prefrontal medial en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); criados con la madre, con estrés, tratados con vehículo (CM-E-V); separados de la madre, tratados con vehículo (SM-V); y separados de la madre, con estrés, tratados con vehículo (SM-E-V).

4.7. NÚCLEO ACCUMBENS

4.7.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos

Se determinó el número de neuronas ir-Fos en el NAc (fig. 27). No se encontraron efectos sobre éste núcleo con ninguno de los tratamientos realizados.

Fig. 27: Inmunoreactividad a Fos en núcleo accumbens

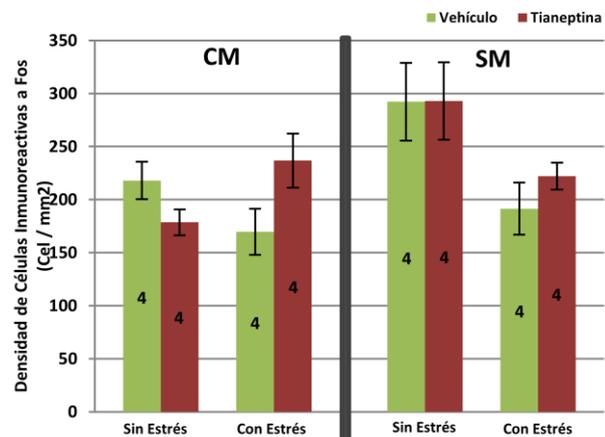


Fig. 27. Densidad de células inmunoreactivas a Fos en el núcleo accumbens en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo.

4.8. ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

4.8.1. Determinación de neuronas inmunoreactivas a Fos

Se determinó el número de neuronas ir-Fos en el ATV (fig. 28). Se encontró un efecto significativo del tratamiento *Droga* [$F_{(1,26)}=4,88$; $p=0,0363$]. El test a *posteriori* LSD Fisher mostró que tianeptina disminuyó la actividad neuronal en el ATV.

Fig. 28: Inmunoreactividad a Fos en área tegmental ventral

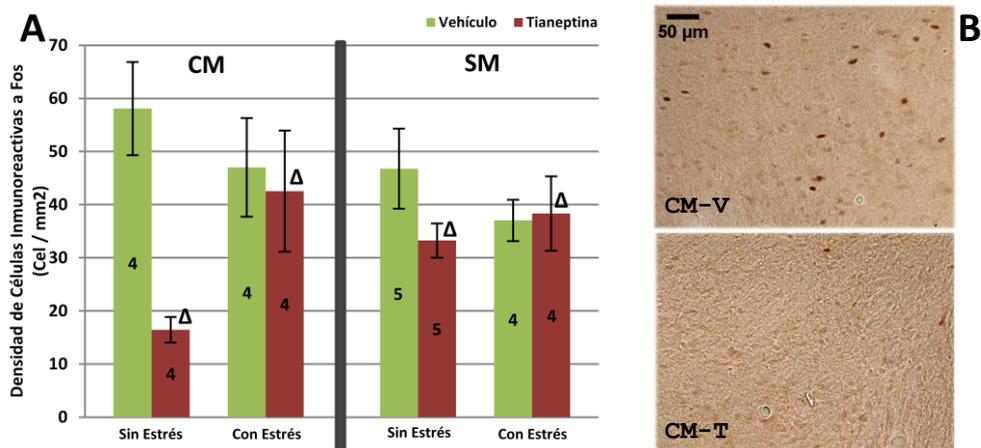


Fig. 28. IZQUIERDA (panel A): Densidad de células inmunoreactivas a Fos en el área tegmental ventral en ratas criadas con la madre (CM) y separadas de la madre (SM), con y sin estrés, tratados con vehículo (barras verdes) o tianeptina (barras rojas). Los resultados se expresan como medias \pm EE. Los números dentro de las barras representan la cantidad de animales del grupo. Se encontró un efecto significativo del factor *Droga*. (Δ) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) vs. los grupos con vehículo. DERECHA (panel B): Fotografías representativas de las neuronas ir-Fos en el área tegmental ventral, en los grupos criados con la madre, tratados con vehículo (CM-V); y criados con la madre, tratados con tianeptina (CM-T).

5. DISCUSIÓN

5.1. CORTICOSTERONA

Como era esperable, la aplicación del protocolo de estrés crónico, aumentó los niveles de CORT plasmática, en los animales CM tratados con vehículo, respecto del grupo no estresado (fig. 8 -A-). Probablemente este aumento se relacione con el incremento producido por el ECV en la actividad neuronal del NPV (fig. 14), dado que esta hormona es el producto final del eje HHA. Este efecto también fue observado por otros investigadores, luego de la aplicación de un estrés agudo de inmovilización (Ma y Morilak 2004).

Además, en el grupo CM con estrés, los niveles de CORT plasmática aumentaron en los tiempos 1 (12 días de estrés) y 2 (24 días de estrés), respecto del tiempo basal (antes de comenzar el estrés) (fig. 8 -A-). Por lo tanto, el estrés aumentó los niveles de CORT tanto al compararlo con el grupo no estresado como al compararlo con los niveles basales del mismo grupo. Estos resultados confirman datos previos de nuestro laboratorio, en donde el ECV aumentó los niveles de CORT plasmática, en ratas Wistar machos (Suárez y col. 1996) y hembras (Suárez y col. 1999). En concordancia con estos resultados, otros investigadores reportaron que en ratas Sprague Dawley, tanto el estrés crónico variable aplicado durante 15 días (Lopez y col. 1998), como el estrés agudo por exposición a una plataforma elevada e inestable (Caudal y col. 2014), indujeron un aumento de corticosterona plasmática.

En cambio, a pesar de la mayor ir-Fos en el NPV, no se encontraron niveles aumentados de CORT plasmática en los animales separados. La comparación directa entre todos los grupos SM con los grupos CM+V y CM+E+V no fue posible debido a dificultades metodológicas que nos impidieron analizarlas estadísticamente (ver materiales y métodos), sin embargo, teniendo en cuenta que la extracción de sangre en el tiempo basal fue realizada antes de comenzar el ECV y la administración de tianeptina o vehículo, nos fue posible realizar una ANAVA a 1 vía considerando sólo el factor *Separación* (excluyendo del análisis los grupos CM+V y CM+E+V, cuya determinación de corticosterona fue realizada por un laboratorio diferente). Al realizar este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos separados (considerando conjuntamente los 4 grupos SM) y los criados con la madre (considerando conjuntamente los grupos CM+T y CM+E+T). De igual modo, ratas Long Evans separadas de la madre entre los días postnatales 2 a 14, por 180 min diarios, no modificaron sus niveles basales de ACTH y CORT, sin embargo, al ser expuestas a un estrés

CORT = corticosterona || **CM** = criados con madre || **ECV** = estrés crónico variable || **NPV** = núcleo paraventricular
HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **ir-** = inmunoreactividad a || **V** = tratados con vehículo || **E** = con estrés crónico
ANAVA = análisis de la varianza || **SM** = separados de la madre || **T** = tratados con tianeptina
ACTH = hormona adrenocorticotrofa

agudo de soplo de aire (*air puff startle*), la elevación de estas hormonas fue mayor al aumento ocurrido tanto en el grupo control como en las ratas separadas por 15 min diarios (*handled*) (Ladd y col. 2005; Lippmann y col. 2007). De esta manera, aunque en condiciones basales no haya un aumento de CORT, el eje HHA en los animales separados de la madre, parece estar sensibilizado a estresores agudos enfrentados en la adultez.

Debido a la determinación de los niveles de CORT realizada en dos laboratorios diferentes, ya comentado anteriormente, sólo fue posible analizar los efectos de tianeptina en los grupos separados de la madre. En este caso, el antidepresivo no tuvo efecto sobre los niveles de CORT plasmática (fig. 8 -B-). Sin embargo, es posible que la exposición a un estrés agudo produzca, en los animales tratados con el antidepresivo (los cuales mostraron incremento de la ir-GR en hipocampo), una respuesta menos intensa o una terminación más rápida de la respuesta. Futuros estudios podrían analizar esta posibilidad, exponiendo a los animales a un estrés agudo antes de tomar las muestras de sangre, para así evaluar la reactividad del eje HHA al estrés agudo en los animales separados de la madre, tratados o no tratados con tianeptina.

Por último, al analizar los grupos SM, no se observó efecto del estrés en los valores de esta hormona. En nuestro estudio, en los animales CM, el estrés produjo un notable aumento de CORT plasmática (fig. 8 -A-), mientras que en los animales SM, el tratamiento de ECV no aumentó los niveles plasmáticos de esta hormona. Como puede observarse en la fig. 8 (B), en los grupo separados y estresados, no hay diferencias en los valores de CORT en los tiempos 1 y 2, respecto al tiempo basal (antes de comenzar el ECV) o respecto de los grupos sin estrés, en igual tiempo. Así, aunque el análisis estadístico no pudo realizarse sobre todo el diseño y por lo tanto se debe ser precavido con las conclusiones, nuestros resultados sugerirían que los animales enfrentados en la adultez, a condiciones estresantes tienen una menor reactividad del eje HHA, si fueron separados de la madre como neonatos.

CORT = corticosterona || **HHA** = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **ir-** = inmunoreactividad a
GR = receptor de glucocorticoides || **SM** = separados de la madre || **CM** = criados con madre || **ECV** = estrés crónico variable

5.2. CONDUCTA

5.2.1. Índices de ansiedad

En nuestro trabajo, el estrés tuvo un efecto ansiogénico al disminuir los porcentajes de PBA y de EBA (fig. 9 -A- y -B-) respecto de los grupos no estresados. En trabajos previos de nuestro laboratorio, ya se había observado o bien un aumento de la ansiedad en ratas expuestas a ECV (Cotella 2009), o bien una tendencia, la cual no alcanzó significancia estadística, probablemente porque en este caso los datos obtenidos presentaban una variabilidad elevada, por lo que podría ser posible que existieran diferencias entre grupos que no fueron detectadas (Trujillo y col. 2009). Se ha observado que, basándose en el %EBA y %PBA evaluado en *plus maze*, las ratas macho Wistar pueden ser divididas en 2 subgrupos según sus niveles de ansiedad, altos o bajos, lo que explicaría la alta variabilidad encontrada en estos índices (Ho y col. 2002). En cambio, el mayor número de animales considerados en el presente trabajo permitió encontrar diferencias entre ambos grupos. Otros investigadores también observaron un aumento de la ansiedad en ratas Wistar, como consecuencia del estrés agudo (Han y col. 2014). Por último, no hubo diferencias en las entradas totales (fig. 9 -C-), indicando que el estrés crónico no altera la locomoción o actividad motora de los animales.

Por otro lado, los animales separados de la madre entraron menos en los brazos abiertos del *plus maze* en comparación al grupo criado con la madre (Fig. 9 -B-), indicando un mayor índice de ansiedad. Similares resultados fueron obtenidos por Troakes y cols. en donde la separación materna disminuyó el porcentaje de EBA (Troakes y Ingram 2009). Mientras que Aisa y cols. también observaron un aumento de ansiedad en animales SM, encontrándose una disminución en el porcentaje de PBA de ratas separadas tempranamente de la madre (Aisa y col. 2007). Un aumento de ansiedad similar, evaluado en *plus maze*, fue encontrado luego de la exposición de ratones a separación materna por 6 h diarias durante las primeras 2 semanas de vida seguida de la aplicación de estrés crónico variable durante 4 semanas (Doron y col. 2014).

Además, las diferencias en la exploración del laberinto, encontrada en el grupo de ratas SM, no puede explicarse por alteraciones locomotrices ya que el número total de entradas, usado como índice de locomoción, no fue afectado por este tratamiento (fig. 9 -C-). En cambio, la mayor actividad neuronal en la MeA pueden contribuir a explicar el aumento de ansiedad observado en el grupo SM respecto del CM. Con respecto a esto, mientras que la

PBA = permanencia en brazos abiertos || **EBA** = entradas en brazos abiertos || **ECV** = estrés crónico variable
SM = separados de la madre || **MeA** = núcleo medial de la amígdala

función de la amígdala ha sido asociada a la conducta de ansiedad (Binelli y col. 2014; Lehner y col. 2009), el efecto ansiolítico de tianeptina ha sido relacionado con el bloqueo por parte de esta droga de la hipertrofia dendrítica inducida por el estrés crónico por inmovilización, en la BLA (Pillai y col. 2012). De igual modo, Lehner y cols. encontraron que animales con alta ansiedad presentaron, en la BLA, un aumento de la inmunomarcación a Fos, a GR y también de la co-localización Fos/GR, respecto de los individuos menos ansiosos (Lehner y col. 2009).

En cambio, el antidepresivo tianeptina tuvo un efecto ansiolítico, ya que produjo un aumento del porcentaje de EBA respecto de los grupos tratados con vehículo (fig. 9 -B-), y también aumentó el porcentaje de tiempo de PBA en los animales separados de la madre (fig. 9 -A-). Este efecto ansiolítico de este antidepresivo, es consistente con otros trabajos en donde tianeptina mostró un efecto ansiolítico en animales expuestos a estrés prenatal (Szymanska y col. 2009) y estrés crónico por inmovilización (Pillai y col. 2012). Además, Venzala y cols. observaron que ratones sometidos a un estrés crónico por *social defeat* presentaron mayor ansiedad evaluada en *plus maze*, mientras que la administración durante 30 días de tianeptina revirtió este efecto inducido por estrés (Venzala y col. 2012). Similarmente, un efecto ansiolítico de tianeptina (administrada durante 31 días) fue encontrado en ratas sometidas a estrés psicosocial (Zoladz y col. 2013). Corroborando estos resultados, estudios clínicos han mostrado que tianeptina es efectiva en la reducción de la ansiedad en pacientes con depresión (Lepine y col. 2001; Novotny y Faltus 2002).

5.2.2. Índices de anhedonia

En cuanto al test de anhedonia aplicado, en el índice de consumo específico de sacarosa (CS; ml de solución de sacarosa consumida, dividido el peso del animal) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos con ninguno de los tratamientos, ni tampoco efecto significativo del factor *Tiempo* (fig. 10 -B- y -C-).

Al analizar el índice de preferencia por a sacarosa (PS; ml de solución de sacarosa consumida, dividido ml total de líquido consumido), se encontró una interacción significativa entre *Tiempo*Estrés*Droga*, en cambio la separación materna no afectó a este índice (fig. 10 -A-). En los grupos con estrés y tratados con vehículo se encontró un aumento de preferencia en las sesiones 3 y 4 respecto de la medida basal (sesión 1, antes de comenzar el ECV) pero en la última sesión esta preferencia cae, mostrando una preferencia menor que en la sesión 3

SM = separados de la madre || CM = criados con madre || BLA = amígdala basolateral || GR = receptor de glucocorticoides
ECV = estrés crónico variable

(fig. 10 -A-). Se ha sugerido que el consumo de alimentos apetecibles en ratas tendría un efecto protector ya que, en animales expuestos a estrés, el consumo de alimentos apetecibles resulta en una inhibición de la respuesta de estrés, con disminución de los niveles de ACTH y de CORT (Pecoraro y col. 2004). Resultados similares fueron observados por Willner y Col. en donde, el ECV provocó un aumento inicial de consumo de sacarosa, seguido de una disminución hasta caer a valores menores que los del grupo control (Willner y col. 1991). Sin embargo, en nuestro trabajo las diferencias se observaron respecto a los valores basales (en la sesión 1) dentro del mismo grupo estresado, pero no respecto de los otros grupos. En cambio, los animales estresados y tratados con tianeptina, en la última sesión presentan los valores más altos de preferencia por la solución dulce, siendo significativamente mayores que en las tres primeras sesiones.

Contrario a nuestras expectativas, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos, ni en cuanto a la PS ni en el CS (fig. 10). Sin embargo, la validación del test de preferencia y consumo por la sacarosa como medida de anhedonia es motivo de controversia, obteniéndose resultados muy variados en los distintos laboratorios (J. M. Weiss 1997; Willner 1997). Esta falta de reproductibilidad puede deberse en primer lugar a diferencias metodológicas incluyendo, entre otras, el tipos de estresores usados, duración de protocolo de estrés, sexo de los animales, horario en que se realiza el test, especies y/o cepas utilizadas y utilización de diferentes concentraciones de sacarosa.

Una diferencia destacable entre nuestro protocolo y la de muchos laboratorios que realizan este test, es que en nuestro estudio, los animales fueron mantenidos en grupos, mientras que comúnmente se los mantiene aislados individualmente para mayor facilidad de aplicación del test. Dado que el aislamiento social es un potente estresor que ha demostrado alterar la conducta de los animales en numerosas pruebas conductuales (Venzala y col. 2012), esto podría ser un factor de confusión. De hecho se ha observado que animales mantenidos individualmente, disminuyen su consumo de sacarosa cuando son posteriormente expuestos a ECV (D'Aquila y col. 1994) o estrés crónico por *social defeat* (Venzala y col. 2012), mientras que los mantenidos en grupos sociales no modifican la cantidad de sacarosa consumida como respuesta al estrés en estos mismos trabajos.

Además, el protocolo menos intenso usado en comparación con otros en donde los *estresores* son presentados 2 veces al día durante 3 semanas (Baker y col. 2006; Grippo y col.

ACTH = hormona adrenocorticotrofa || CORT = corticosterona || ECV = estrés crónico variable
PS = preferencia por la sacarosa || ECV = estrés crónico variable

2006) o incluso durante 8-12 semanas (Tye y col. 2013) podría ser una razón para la falta de efecto de nuestro protocolo de ECV sobre las medidas de PS y CS. Sin embargo, dada la controversia generada sobre la validez de este test, no es posible asegurar que un protocolo más severo de ECV pueda tener un impacto significativo sobre la PS y CS o si, en cambio, la anhedonia fue inducida en nuestro modelo pero no detectada debido a que el test en sí mismo no es suficientemente sensible. Notablemente, en ratas macho Sprague Dawley, el ECV aplicado durante 4 semanas no disminuyó la preferencia por la sacarosa, sin embargo produjo un aumento de la inmovilidad en el *forced swim test*, una prueba altamente validada como medida de desesperanza, demostrando así que, el ECV puede inducir en los animales conductas depresivas aunque no se observe disminución en la PS (Chang y Grace 2014).

Por último, no hubo efecto de la separación materna (fig. 10). Resultados semejantes, en donde no se alteró la preferencia por una solución de sacarosa al 1%, fueron obtenidos en ratas Wistar, tanto machos como hembras, cuya madre fue retirada 3 h diarias durante las 2 primeras semanas de vida, permaneciendo toda la camada junta en la caja de crianza (R. A. Hill y col. 2014). En cambio, en un protocolo en donde las crías fueron colocadas todas juntas en un ambiente nobel, pero similar en todo lo demás, se encontró una disminución del consumo de sacarosa (Aisa y col. 2007). Estos resultados opuestos reafirman, como ya fue discutido anteriormente, la falta de reproductibilidad de este test de anhedonia, obteniéndose datos muy variados de acuerdo a diferencias metodológicas en la realización del test en sí mismo o en el tratamiento aplicado a los animales.

ECV = estrés crónico variable || PS = preferencia por la sacarosa || CS = consumo específico de sacarosa

5.3. NÚCLEO PARAVENTRICULAR

El tratamiento de separación materna, al igual que el de ECV, aumentó la ir-Fos en el NPV del hipotálamo (fig. 14) indicando una mayor actividad del eje HHA. Cabe destacar que estos dos tratamientos afectan independientemente la actividad neuronal de este núcleo, ya que no se observó interacción entre ellos. La mayor actividad neuronal del NPV también fue observada por otros investigadores, luego de la aplicación de un estrés agudo de inmovilización (Ma y Morilak 2004). Además, la separación individual de crías BHR (*Borderline Hypertensive rats*) durante 3 h diarias las dos primeras semanas de vida, produjo un aumento de la ir-Fos en NPV, CeA y BNST (Sanders y Anticevic 2007).

La mayor actividad del NPV podría significar una elevación en la secreción de CRH y AVP en condiciones basales. Confirmando esto, Aisa y cols. demostraron que la separación materna produce un aumento de CRH en el NPV, evaluado por hibridación *in situ* (Aisa y col. 2007). Mientras que, Ladd y cols., observaron un aumento del ARNm de CRH en el NPV tanto en animales adultos sometidos a estrés crónico por 14 días, como en los separados de la madre (180 min diarios durante las 2 primeras semanas de vida). Además, en el grupo separado de la madre, la exposición a un estrés agudo de *air puff startle* provocó un aumento de los niveles plasmáticos de CORT y ACTH, sin embargo este aumento no se produjo en las ratas separadas y sometidas posteriormente a ECV (Ladd y col. 2005).

Sería esperable que la mayor actividad neuronal del NPV se traduzca en un aumento de la CORT plasmática, sin embargo esto no ocurrió en los animales separados (fig. 8 -B-). Es posible que estas ratas tengan una menor sensibilidad hipofisaria al CRH o menor sensibilidad adrenal al ACTH. Dado que en el presente trabajo no medimos ACTH, no podemos distinguir entre estas dos posibilidades. Anteriormente, Renard y cols. encontraron que en ratas macho sometidas a ECV, aquellas que fueron previamente expuestas a separación materna tuvieron menores niveles de CORT plasmática, sin embargo la ACTH fue similar en ambos grupos, por lo que una menor sensibilidad adrenal a la ACTH sería factible. En cambio en ratas hembras separadas de la madre, se encontró menor cantidad de ACTH en las que fueron expuestas a estrés, mientras que la CORT no tuvo variaciones significativas, indicando una mayor sensibilidad adrenal en las hembras sujetas a ambos tratamientos (Renard y col. 2007).

ECV = estrés crónico variable || NPV = núcleo paraventricular || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal
ir- = inmunoreactividad a || CeA = núcleo central de la amígdala || BNST = núcleo bed de la estría terminal
CRH = hormona liberadora de corticotrofina || AVP = arginina vasopresina || ARNm = ácido desoxirribonucleico mensajero
CORT = corticosterona || ACTH = hormona adrenocorticotrofa

Otra explicación posible para los resultados actuales, es que la mayor actividad neuronal del NPV no este restringido sólo a las células secretoras de CRH, y por lo tanto no implique una mayor secreción de esta hormona. En relación a esto, en nuestro laboratorio se ha evaluado la actividad neuronal de la porción parvocelular medial del NPV hipotalámico (PaMP), cuyas neuronas liberan en respuesta al estrés, CRH y AVP en la eminencia media. Los resultados obtenidos en ese trabajo previo, indicaron que la actividad neuronal del PaMP no es alterada ni por estrés, ni por separación, ni por la combinación de ambos tratamientos (Renard y col. 2010). Teniendo en cuenta estos resultados podemos hipotetizar que la mayor actividad en el NPV de los grupos SM, obtenida en nuestro estudio, podría deberse a un aumento de actividad de neuronas no secretoras de CRH, o bien a que estén activadas las células neurosecretoras pero no liberen en su terminal axónica las hormonas en cuestión, CRH y AVP. Sin embargo, futuros estudios serán necesarios para determinar la razón de la sobreexpresión Fos en el NPV, sin aumento concomitante de CORT plasmática en los grupos separados de la madre.

En nuestro trabajo no se encontraron, en el NPV, efectos significativos del estrés sobre el número de neuronas inmunoreactivas a GR o MR (figs. 11 y 12). No es posible descartar por medio de este análisis la posibilidad de que a pesar de no haber cambios en el número de neuronas que expresan estos receptores, pudiera estar alterada la cantidad total de receptores. Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman resultados previos de nuestro laboratorio, en donde el ECV no alteró el número de neuronas ir-GR en la porción parvocelular medial del núcleo paraventricular hipotalámico en ratas criadas con la madre, tanto machos como hembras (Renard y col. 2010). Contrariamente, en otro trabajo se encontró que en ratas Sprague Dawley, machos y hembras, el número de neuronas que co-expresaron Fos-GR aumentó por efecto de un estrés agudo (30 min de inmovilización por estaqueamiento) pero no hubo diferencias respecto del control cuando ese estrés se aplicó en forma crónica por 14 días consecutivos (Zavala y col. 2011). Por lo tanto, es posible que los GR de este núcleo no sean afectados por el estrés crónico pero si por el agudo. En este último caso, el aumento de estos receptores en el NPV favorecería la regulación del eje HHA por retroalimentación negativa.

NPV = núcleo paraventricular || CRH = hormona liberadora de corticotrofina || AVP = arginina vasopresina
SM = separados de la madre || CORT = corticosterona || GR = receptor de glucocorticoides
MR = receptor de mineralocorticoides || ECV = estrés crónico variable || ir- = inmunoreactividad a
HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal

La separación materna aumentó el balance de receptores MR/GR en el núcleo paraventricular (fig. 13). Esto sugeriría una predisposición a la depresión teniendo en cuenta que, en el NPV obtenido por autopsias en pacientes depresivos, se encontraron mayores niveles de ARNm de MR, mientras que el GR no fue alterado, indicando que este desorden estaría relacionado con un desbalance MR/GR en el NPV hipotalámico (Wang y col. 2008).

Por otro lado, en las ratas criadas con la madre, el tratamiento con el antidepresivo tianeptina disminuyó las neuronas ir-MR en el NPV, respecto de los animales con vehículo (fig. 12), mientras que en los separados de la madre, no hay diferencias entre los tratados con droga o vehículo; por lo que, esta droga actuaría diferencialmente dependiendo de las experiencias tempranas del individuo. Adicionalmente, entre los grupos tratados con tianeptina, las ratas separadas de la madre mostraron mayores niveles de ir-MR que las criadas con la madre.

MR = receptor de mineralocorticoides || **GR** = receptor de glucocorticoides || **NPV** = núcleo paraventricular
ARNm = ácido desoxirribonucleico mensajero || **ir-** = inmunoreactividad a

5.4. HIPOCAMPO

Al analizar la inmunoreactividad a GR, se encontró, en todas las capas del hipocampo dorsal, una interacción entre los tratamientos de separación materna y estrés (fig. 15). Dicha interacción también se encontró para la ir-MR en CA2 (fig. 17 -B-). Así, en los animales criados con la madre, el estrés produjo un aumento de células inmunoreactivas a GR (en todas las capas) y a MR (en CA2), mientras que, en los separados de la madre, no se modificaron significativamente los niveles de estos receptores luego de la exposición a estrés crónico. Además, en los animales CM con vehículo, el estrés aumentó los niveles de ir-MR en el giro dentado (fig. 17 -D-). Similarmente, Mizoguchi y col. encontraron en ratas Wistar, que el estrés por inmersión (2 h por día, a 21°C) durante 4 semanas, aumentó en hipocampo, los niveles de GR nuclear y de ARNm de GR, mientras que disminuyó los niveles de GR citosólico (Mizoguchi y col. 2003), indicando una mayor translocación del receptor hacia el núcleo. En tanto que, en ratas macho Sprague-Dawley también se observó un aumento de MR y de GR nucleares luego de 60 min de exposición a un estrés agudo (Caudal 2014). En cambio, en otros estudios, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de GR en hipocampo tanto en ratas Wistar sometidas a estrés por aislamiento social (durante 6 semanas) (Elakovic y col. 2011) como en ratas Sprague-Dawley sometidas a ECV por 28 días (López 1998). En estos trabajos si se observó una disminución, inducida por estrés, de la unión de dexametasona a MR y de los niveles de ARNm de MR, disminuyendo, por lo tanto, el balance MR/GR (Elakovic y col. 2011; Lopez y col. 1998). Cabe destacar que en estos estudios no se distinguió entre fracciones nucleares y citoplasmáticas.

Por otro lado, en ratas Wistar macho, un estrés agudo produjo una notable disminución de ir-MR e ir-GR, como también de la expresión de MR y GR medida por *western blotting*. La disminución de MR fue más marcada por lo que también disminuyó el balance MR/GR (Zhe y col. 2008). Las diferencias con nuestros resultados, podrían deberse principalmente a la utilización de un modelo de estrés diferente. En cambio, en el hipocampo de primates expuestos a estrés social (6 sesiones de aislamiento de 3 semanas de duración cada una), no se produjeron cambios en los niveles de expresión de MR, mientras que hubo una disminución de la expresión de GR aunque sólo en CA1 (Patel y col. 2008).

Teniendo en cuenta los diferentes resultados expuestos anteriormente, en relación al efecto del estrés sobre los GR y MR, es posible pensar que el tipo de estrés y de animal utilizado

GR = receptor de glucocorticoides || ir- = inmunoreactividad a || MR = receptor de mineralocorticoides
CM = criados con madre || ARNm = ácido desoxirribonucleico mensajero || ECV = estrés crónico variable

influyen sobre la expresión de esos receptores. Además, también es importante la experiencia previa del individuo, como lo demuestran nuestros resultados.

Es interesante que otros autores reportan una expresión de GR mínima en la capa CA3 hipocampal (de Kloet y col. 2005; Ferrini y col. 1999; Han y col. 2005; Mizoguchi y col. 2003), mientras que, tanto en el presente trabajo (fig. 15 -C-) como en otros previos de nuestro laboratorio (Cotella y col. 2014; Renard y col. 2010; Vivinetto y col. 2013), se han encontrado neuronas inmunoreactivas a GR en esta región, aunque en menor densidad que en las otras capas del hipocampo, e incluso, su expresión fue sensible a los efectos de los factores en estudio. Otros investigadores también encontraron, en CA3, inmunoreactividad a GR (Lehner y col. 2009) o ARNm de GR (Lopez y col. 1998). Mientras que, Sarabdjitsingh y cols obtuvieron que el 44 ± 4 % de las células de esta región expresan GR, aunque ellos consideran ese porcentaje como “muy bajos niveles de GR detectados en CA3” (Sarabdjitsingh y col. 2009). Es destacable que en nuestro trabajo la densidad de neuronas ir-GR en CA3 fue considerablemente menor que en las otras capas. Para ilustrar esto, en el grupo control, se obtuvieron en CA3 $11,21 \pm 0,64$ células ir-GR por cada $0,1 \text{ mm}^2$ de tejido, mientras que en las otras capas los valores fueron: $22,82 \pm 0,9$ células en CA1; $17,40 \pm 1,04$ en CA2; y $23,18 \pm 0,93$ en GD.

El aumento de las neuronas GR- y MR- positivas en el hipocampo, producido como consecuencia de eventos estresantes, podrían indicar un mecanismo adaptativo de estos animales dado que, el incremento de estos receptores permitiría una disminución de la respuesta neuroendocrina al estrés. Sin embargo, esto no se corrobora con los niveles plasmáticos de CORT obtenidos, en donde los animales estresados presentaron mayores niveles de esta hormona (fig. 8 -A-). Es posible que el incremento, inducido por estrés, de ir-GR e ir-MR encontradas en este trabajo pueda deberse a una mayor translocación del receptor hacia el núcleo, luego de la unión con la corticosterona, la cual se encuentra aumentada. Además, las ratas sometidas a ECV mostraron menor actividad neuronal en CA1 y CA2 (fig. 20 -A- y -B-), respecto de las no estresadas, lo que contribuiría a una activación del eje HHA. Sin embargo, en CA3 el estrés aumenta la ir-Fos pero sólo en los animales CM (fig. 20 -C-).

De manera interesante, van Haarst y col. han sugerido que los GR hipocampales tendrían una acción desinhibitoria del eje HHA. Esto se basa en el hallazgo de que la inyección del antagonista de GR, RU38486 en el ventrículo lateral de ratas Wistar macho aumentó los

GR = receptor de glucocorticoides || ARNm = ácido desoxirribonucleico mensajero || ir- = inmunoreactividad a
GD = giro dentado || MR = receptor de mineralocorticoides || CORT = corticosterona || ECV = estrés crónico variable
HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || CM = criados con madre

niveles de ACTH y CORT plasmática, mientras que la inyección del mismo antagonista en el hipocampo si bien no modificó los niveles de CORT, disminuyó los niveles de ACTH sugiriendo la posibilidad de que los GR extrahipocampales sean los que ejerzan la regulación del eje HHA por retroalimentación negativa, mientras que los receptores GR hipocampales podrían tener una acción desinhibitoria. En este mismo trabajo se observó que la inyección del antagonista de MR RU28318 aumentó los niveles de ACTH y corticosterona tanto cuando fue inyectado intraventricular como intrahipocampalmente, indicando que los receptores MR hipocampales si participarían en la inhibición del eje HHA junto con los GR extrahipocampales (van Haarst y col. 1997).

Por otro lado, la separación materna incrementó, en los animales no estresados, la densidad de neuronas inmunoreactivas a GR en las áreas CA2 y CA3 del hipocampo dorsal (fig. 15 -B- y -C-). Por lo tanto, la separación materna, favorecería la retroalimentación negativa del eje HHA, cuando el nivel de estrés durante la vida adulta es bajo. Mientras que, por el contrario, en los animales estresados, la separación disminuyó, en CA2, la ir-GR y la ir-MR (figs. 15 -B- y 17 -B-) y también disminuyó las células MR-positivas en el GD, en los animales estresados y tratados con vehículo (fig. 17 -D-). En este caso, en los animales separados y estresados en la adultez, se dificultaría la modulación del eje HHA, al tener menos receptores GR y MR hipocampales. Esto coincide parcialmente con resultados previos de nuestro laboratorio, en donde la separación materna, disminuyó las neuronas MR-positivas en CA2, en animales sometidos a ECV; pero no tuvo efecto sobre la ir-MR de los animales no estresados (Cotella y col. 2014). Sin embargo, en ese trabajo y en otros previos (Ladd y col. 2005; Renard y col. 2010), la separación no tuvo efecto sobre la ir-GR hipocampal. Las diferencias podrían deberse a la utilización de tianeptina en nuestro trabajo, la cual demostró afectar la ir-GR en el hipocampo.

Además, la separación materna temprana produjo un aumento general de la ir-Fos en CA1, y también un aumento de la misma en CA3 pero sólo en los animales no estresados (figs. 20 -A- y -C-). La mayor actividad neuronal hallada en el hipocampo de las ratas separadas de la madre tendría una influencia inhibitoria sobre el eje HHA. Posiblemente este sea un efecto compensatorio, oponiéndose a la mayor actividad del NPV presente en estos animales (fig. 14). Viltart y Cols. observaron que en ratas machos Sprague-Dawley el estrés prenatal provocó un aumento de la ir-Fos en el hipocampo pero también en el *locus coeruleus*, núcleo

ACTH = hormona adrenocorticotrofa || CORT = corticosterona || GR = receptor de glucocorticoides
HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || MR = receptor de mineralocorticoides || ir- = inmunoreactividad a
GD = giro dentado || ECV = estrés crónico variable || NPV = núcleo paraventricular

noradrenérgico excitador del eje HHA (Viltart y col. 2006). De acuerdo a esto, es posible que en los animales SM, el aumento de actividad de otras estructuras excitadoras del eje HHA, como por ejemplo el *locus coeruleus*, podrían, conjuntamente con la activación de la amígdala (observada en nuestro trabajo en los animales SM; fig. 25 -A-), contribuir a producir la sobre-activación encontrada en el NPV de estos animales.

Analizando los efectos del antidepresivo utilizado, se observa que tianeptina aumentó en general, las células ir-GR en las regiones CA1, CA2 y GD del hipocampo dorsal (fig. 15 -A-, -B- y -D-), mientras que en CA3 también aumentó dicha inmunoreactividad pero sólo en los animales separados de la madre (fig. 15 -C-). Además, esta droga también afectó los receptores MR. A este respecto se encontró que los animales tratados con el antidepresivo tienen, en general, mayor inmunoreactividad en CA3, que los tratados con vehículo (fig. 17 -C-); mientras que en el GD (fig. 17 -D-) la droga aumenta las neuronas ir-MR en los grupos CM sin estrés y SM con estrés. Al ejercer el hipocampo una retroalimentación negativa del eje HHA, el aumento de células GR- y MR-positivas contribuiría a disminuir la respuesta de estrés, al facilitar la retroalimentación negativa que ejercen los glucocorticoides sobre hipocampo; por lo tanto el efecto de tianeptina tendería a una disminución de la actividad de este eje HHA. Por el contrario, en ratas Sprague Dawley adultas, el estrés prenatal aumentó los niveles de GR hipocampal, lo cual se relacionó con altos niveles de ansiedad en estos individuos. Este aumento de GR hipocampal fue normalizado por el tratamiento durante 3 semanas con tianeptina (Szymanska y col. 2009). Por lo tanto el efecto de este antidepresivo no parece ser un aumento o disminución de GR hipocampal *per se*, sino que su efecto depende del contexto en que se aplique el tratamiento. Esto también es avalado por el hecho que, en nuestro trabajo, tianeptina aumentó la ir-MR en el GD del hipocampo en algunos grupos (en CM sin estrés y en SM con estrés), pero no tuvo efecto en los otros grupos (en CM con estrés y en SM sin estrés). Por lo que, en este caso, la droga actuaría diferencialmente dependiendo de las experiencias del individuo.

La regulación de los niveles de GR en el hipocampo por los antidepresivos parece ser un proceso complejo, encontrándose efectos opuestos luego del tratamiento con diferentes antidepresivos. Esto puede ilustrarse con un estudio en donde se evaluó la acción de diferentes antidepresivos sobre la expresión de ARNm de GR, medida por hibridación *in situ*. En el mismo se encontró que bupiriona (agonista parcial 5-HT_{1A}) y fluoxetina (inhibidor selectivo

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || SM = separados de la madre || NPV = núcleo paraventricular
ir- = inmunoreactividad a || GR = receptor de glucocorticoides || GD = giro dentado || MR = receptor de mineralocorticoides
CM = criados con madre || ARNm = ácido desoxirribonucleico mensajero || 5-HT_{1A} = receptor 1A de serotonina

de la recaptura de 5-HT) disminuyeron la expresión de GR, mientras que 8-OH-DPAT (agonista completo 5-HT_{1A}) y moclobemida (inhibidor reversible de la MAO-A) lo aumentaron (Bjartmar y col. 2000). Es destacable que bupirona y 8-OH-DPAT, los cuales comparten el mecanismo de acción primario (ya que ambos son agonistas parcial o completo, respectivamente, del receptor de serotonina 5-HT_{1A}), tengan efectos opuestos sobre la expresión de GR en el hipocampo, sugiriendo que dicho efecto no se relaciona directamente con el mecanismo de acción primario (agudo) de estas drogas.

Muchos antidepresivos han demostrado regular los receptores de gluco- y mineralocorticoides en distintas regiones cerebrales. Así, en el hipocampo, el tratamiento con los antidepresivos tricíclicos imipramina y amitriptilina, como también la terapia de electroshock, aumentaron ambos receptores, GR y MR; adicionalmente los niveles de GR hipocampales fueron aumentados por otro tricíclico, desipramina y también por fluoxetina (un inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT), ketamisina (antagonista competitivo del receptor 5-HT₂) y litio (Brady y col. 1991; Lai y col. 2003; Peiffer y col. 1991; Przegalinski y Budziszewska 1993; Przegalinski y col. 1993; Yau y col. 1995). Además, tanto en el hipotálamo como en la amígdala, los tratamientos con imipramina y con litio aumentaron los niveles de GR, mientras que desipramina aumentó estos receptores en el hipotálamo (Peiffer y col. 1991). Teniendo en cuenta estos datos, es posible que la activación de la retroalimentación negativa del eje HHA, a través del aumento de los GR y MR hipocampales e hipotalámicos sea un mecanismo común a muchas clases de antidepresivos.

Además, otros mecanismos de acción podrían ser responsables de los efectos de tianeptina. Por ejemplo, en cultivos de células no neuronales, como fibroblastos, el tratamiento durante 5 días con tianeptina, inhibió el efecto sobre la transcripción genética mediada por GR, de altas concentraciones de CORT (Budziszewska y col. 2000). Por otro lado, tianeptina, al igual que otros antidepresivos, revirtió la disminución de BDNF en amígdala e hipocampo, inducida tanto por estrés de inestabilidad social (Nowacka y col. 2014) como por separación materna (Della y col. 2013), aumentando en consecuencia los niveles de ese factor. El BDNF es importante para la formación de sinapsis, la plasticidad neuronal y la regulación de la transmisión glutamatérgica. Por lo tanto, el aumento de este factor, producido por tianeptina, puede ser responsable, en parte, de sus efectos positivos sobre la plasticidad sináptica

5-HT = serotonina || **GR** = receptor de glucocorticoides || **8-OH-DPAT** = 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin
5-HT_{1A} = receptor 1A de serotonina || **MAO-A** = monoamino oxidasa A || **MR** = receptor de mineralocorticoides
5-HT₂ = receptor 2 de serotonina || **HHA** = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **CORT** = corticosterona
BDNF = factor neurotrófico derivado del cerebro

(Vouimba y col. 2006), la sobrevida celular (Lucassen y col. 2004) y la neurogénesis, como también del bloqueo de la atrofia dendrítica en el hipocampo observadas luego del tratamiento con tianeptina (Czéh y col. 2001; Fuchs y col. 2002; W. Liu y col. 2011; Magariños y col. 1999). Además, tianeptina ha demostrado propiedades inmunomoduladoras al bloquear la activación del eje HHA inducida por lipopolisacáridos (Castanon y col. 2003).

En nuestro modelo, el aumento, producido por tianeptina, de neuronas MR-positivas en CA3 y en el GD (en los animales CM sin estrés y SM con estrés), podría asociarse con la efectividad de esta droga, observada por otros investigadores, en la reducción de la apoptosis, inducida por estrés (Lucassen y col. 2004). Se ha propuesto que la acción beneficiosa de bajas dosis de GC sobre la sobrevida celular, sería mediada, en parte por los MR, mientras que las altas concentraciones requeridas para la activación de los GR, ejercerían efectos deletéreos (Le Menuet y Lombes 2014). Además, los MR también favorecerían los procesos de neurogénesis y diferenciación celular. Sin embargo, debido a que la mayoría de las células progenitoras de las neuronas no expresan GR ni MR, probablemente los GC influyen indirectamente la habilidad de estas células de proliferar (Cameron y col. 1993).

En síntesis, en el hipocampo, tanto en lo que respecta a GR, MR o Fos, (figs. 15, 17 y 20), se encontró una interacción entre los factores *Separación*Estrés* en, al menos, alguna de sus áreas, observándose que, cuando existe esta interacción, el estrés aumenta las células GR- y MR-positivas y la actividad neuronal sólo en los animales CM, pero no en los SM. Es decir, que la separación materna provoca en estos individuos, cambios duraderos en la reactividad al estrés en el hipocampo. Así, nuestros resultados confirman que eventos estresantes en la vida temprana producen cambios en los neurocircuitos que controlan la respuesta de estrés, especialmente en hipocampo y amígdala. Estos cambios son persistentes en el adulto, encontrándose en éste, alterada la sensibilidad del eje HHA al estrés (Daskalakis y col. 2013; Weaver y col. 2004). En los animales criados con la madre, el aumento de GR y MR hipocampales producido como consecuencia de eventos estresantes podría ayudar a disminuir la respuesta de estrés iniciada, dado que ésta es una estructura inhibitoria, que facilita la retroalimentación negativa del eje HHA (de Kloet 2013). En cambio, entre los animales a los que se les aplicó el protocolo de ECV, los separados de la madre mostraron, en CA2, menores niveles de ir-GR e ir-MR respecto de los criados con la madre, sugiriendo que la separación

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **MR** = receptor de mineralocorticoides || **GD** = giro dentado || **CM** = criados con madre
SM = separados de la madre || **GC** = glucocorticoides || **GR** = receptor de glucocorticoides || **ECV** = estrés crónico variable
ir- = inmunoreactividad a

materna podría dificultar la retroalimentación negativa del eje HHA ante un ambiente estresante en la vida adulta.

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal

5.5. AMÍGDALA

En la amígdala medial se encontró que los niveles de ir-GR dependen de la interacción entre separación materna, estrés crónico en el adulto y tratamiento con el antidepresivo. En la figura 22 (A) se observa que, en los animales tratados con vehículo, la aplicación del protocolo de estrés produce un aumento de las células ir-GR en los animales CM, pero una disminución de la misma en los SM. Teniendo en cuenta que la amígdala ejerce una regulación excitatoria sobre el eje HHA, nuestros resultados indicarían una sobreactividad de dicho eje cuando los animales criados con la madre son sometidos a estrés en la edad adulta. En cambio, Han y col. no observaron cambios ni en GR ni en MR, 7 y 14 días después de someter a ratas Wistar a estrés agudo, pero si hubo una disminución de ambos receptores, un día después del estrés (Han y col. 2014). Sin embargo, en dicho trabajo no se distinguieron las subdivisiones dentro de la amígdala, siendo que, como es sabido, la amígdala no es una estructura homogénea e incluso pertenece a diferentes sistemas funcionales (Swanson y Petrovich 1998). En tanto que, en nuestro modelo, la disminución producida por el ECV, observada en los animales SM con vehículo, podría atenuar la activación de la MeA por la CORT.

Sin embargo, a pesar del aumento de neuronas GR-positivas, la actividad neuronal de la amígdala medial no se vio incrementada debido al estrés (fig. 25 -A-). En cambio, en otros trabajos el estrés agudo por inmovilización en ratas Sprague-Dawley y Wistar-Kyoto (Ma y Morilak 2004) y el estrés social en ratas Long-Evans (Nikulina y col. 2004) aumentaron la expresión Fos en el núcleo medial de la amígdala. Es probable que las diferencias se deban a la utilización de otros tipos de estrés.

Por otro lado, tampoco encontramos cambios en el balance MR/GR en este núcleo amigdalino (fig. 24 -A-). Se ha propuesto que, mientras el balance MR/GR controla algunos aspectos de la respuesta de estrés, otros son regulados por la cantidad absoluta de GR o MR (Harris y col. 2013). En nuestro modelo, el balance de estos receptores no fue alterado por el ECV en ninguno de las 3 estructuras analizadas (NPV, hipocampo y amígdala) (figs. 13, 19 y 24), sin embargo en hipocampo y MeA si hubo cambios en la cantidad de células inmunoreactivas a esos receptores (figs. 15, 17 y 22 -A-).

ir- = inmunoreactividad a || **GR** = receptor de glucocorticoides || **CM** = criados con madre || **SM** = separados de la madre
HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **MR** = receptor de mineralocorticoides || **ECV** = estrés crónico variable
MeA = núcleo medial de la amígdala || **CORT** = corticosterona || **NPV** = núcleo paraventricular

En el CeA, el estrés no produjo cambios en los niveles de ir-GR, ir-MR ni ir-Fos (figs. 22 -B-, 23 -B- y 25 -B-). Se ha sugerido que en la respuesta del eje HHA al estrés emocional (aquél que no supone un desafío inmediato para la sobrevivencia del organismo) tiene una participación primordial el MeA, mientras que el CeA sería menos afectado por este tipo de estrés (Dayas y col. 1999). En cambio, el CeA sería más importante ante un estrés que produzca alteraciones fisiológicas, como, por ejemplo cambios cardiovasculares (Li y Dampney 1994) o procesos inmunológicos (Ericsson y col. 1994). Probablemente esta sea la razón por la cual este núcleo no haya tenido una participación directa en el protocolo de estrés utilizado en nuestro proyecto, el cual está conformado por *estresores* moderados.

Además, como puede verse en la figura 22 (A), en las ratas no estresadas y tratadas con vehículo el tratamiento de separación materna generó un aumento de las células ir-GR en la amígdala medial, respecto del grupo control. Teniendo en cuenta que la acción de los glucocorticoides sobre la amígdala ejerce una retroalimentación positiva del eje HHA, con una consecuente activación del mismo (de Kloet 2013), nuestros resultados indicarían que, los animales separados de la madre en edad temprana, muestran una sobre-activación del eje HHA en condiciones basales.

En cambio, en los animales estresados y tratados con vehículo, la separación materna disminuyó las células GR-positivas (fig. 22 -A-). Es decir que, en los grupos tratados con vehículo, tanto el estrés (en CM) como la separación (en no estresados), aumentaron la ir-GR, facilitando la retroalimentación positiva ejercida por los GC al actuar sobre esta estructura (de Kloet 2013). Pero con la combinación de ambos tratamientos los niveles de GR disminuyeron, emulando a los controles. Esto demuestra que el fenotipo final del individuo depende de la interacción de las experiencias de la vida temprana y del ambiente de la vida adulta.

Por otro lado, la separación materna temprana produjo un aumento de la ir-Fos en la MeA (fig. 25 -A-). La mayor actividad neuronal en la amígdala de las ratas separadas de la madre indica una mayor actividad en el adulto del eje HHA tanto en condiciones basales como en un ambiente estresante y puede explicar en parte la mayor actividad neuronal del NPV encontrada en estos animales. En cambio en el CeA la separación materna no tuvo efecto sobre la ir-Fos (fig. 25 -B-). Esto se condice con otro estudio en donde la separación por 3 h durante 10 días consecutivos, no produjo aumento de la actividad en el CeA de ratas Sprague Dawley (Felice y col. 2014).

CeA = núcleo central de la amígdala || ir- = inmunoreactividad a || GR = receptor de glucocorticoides
MR = receptor de mineralocorticoides || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || MeA = núcleo medial de la amígdala
CM = criados con madre || GC = glucocorticoides || NPV = núcleo paraventricular

Además, en la CeA no se encontraron efectos de la separación materna sobre la densidad de células inmunoreactivas a GR ni a MR (figs. 22 -B- y 23 -B-). Así, este núcleo no fue alterado por ninguno de los tratamientos evaluados (separación materna, ECV ni antidepresivo). Adicionalmente, un tratamiento crónico de separación breve (15 min por día) tampoco alteró en CeA ni en la amígdala basolateral, la ir-GR ni a la subunidad NR1 del receptor NMDA. Sin embargo este tratamiento aumentó la ir-GR en las subregiones IL y PrL de la CPFm y disminuyó la ir-NR1 en la corteza IL. Además estos cambios se correlacionaron con déficits en la extinción del miedo condicionado en ratas Long Evans (Wilber y col. 2009). De acuerdo a estos datos previos y a nuestros propios resultados, el CeA no parece ser afectado por la separación materna ni por la separación breve, al menos en las variables analizadas en cada caso.

En los animales separados de la madre, no estresados el tratamiento con el antidepresivo tianeptina, disminuye la densidad de neuronas ir-GR en la amígdala medial, respecto de los tratados con vehículo (fig. 22 -A-). De esta manera, tianeptina tiende a disminuir la activación ejercida por la CORT sobre la amígdala, la cual a su vez es activadora del eje HHA. Aunque, los niveles de CORT plasmática no se diferencian en ambos grupos (fig. 8 -B-), es posible que la exposición a un estrés agudo produzca, en los animales tratados con el antidepresivo, una respuesta menos intensa o una terminación más rápida de la respuesta. Futuros estudios podrían analizar esta posibilidad, exponiendo a los animales a un estrés agudo. Por el contrario, en este núcleo, tianeptina provocó, tanto en el grupo SM con estrés como en el CM sin estrés, un aumento de las neuronas ir-GR. Estos efectos opuestos de tianeptina demuestran que la acción de este antidepresivo en la regulación de los GR en la amígdala, es dependiente del estado del animal.

CeA = núcleo central de la amígdala || GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de mineralocorticoides
ECV = estrés crónico variable || ir- = inmunoreactividad a || NR1 = subunidad NR1 del receptor NMDA
NMDA = N-metil-D-aspartato || IL = infralímbica || PrL = prelímbica || CPFm = corteza prefrontal medial
CORT = corticosterona || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || SM = separados de la madre || CM = criados con madre

5.6. CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL

En las cortezas cingulada y prelímbica (fig. 26 -A- y -B-), el estrés crónico disminuyó la densidad de neuronas ir-Fos, respecto de los grupos no estresados. La corteza prefrontal participa en el control de la magnitud y duración apropiada de las respuestas emocionales. Además, se ha sugerido que podría desempeñar alguna función en la formación de asociaciones entre estímulos (Rosenkranz y col. 2003). Entonces, una menor actividad de la CPFm, como la observada en este trabajo en los animales estresados, podría estar relacionada con anomalías en la regulación de la conducta emotiva. Se ha demostrado que la activación de la CPFm suprime la plasticidad neuronal y la respuesta a un estímulo condicionado en la amígdala lateral. Por lo tanto, la hipo-actividad de la CPFm podría resultar no solo en una inadecuada atenuación de la respuesta a estímulos afectivos, sino también en la formación de asociaciones anormales entre estímulos, debido a la falta de regulación de la plasticidad amigdalina (Rosenkranz y col. 2003). En otro estudio realizado con ratones, la estimulación optogenética de la CPFm y subsecuente aumento de c-Fos, ocasionó la reversión de conductas depresivas, inducidas por estrés social, evaluadas en los test de interacción social y preferencia por la sacarosa. En cambio la estimulación optogenética de la CPFm no alteró la locomoción, ansiedad ni memoria social (Covington y col. 2010). Estos datos reafirman la importancia de la CPFm en la regulación de las conductas emocionales y en los trastornos relacionados con la desregulación de esas conductas, tales como la depresión.

Contrario a esta disminución inducida por ECV, Lkhagvasuren y cols. (Lkhagvasuren y col. 2014) encontraron que el estrés agudo por derrota social (*social defeat stress*) aumenta la expresión Fos en varias áreas del sistema de recompensa mesolímbicas, incluidas el NAc, la CPFm y ATV. En este caso, al utilizarse un estrés agudo, el aumento de actividad de estas estructuras ayudaría a controlar la respuesta de estrés iniciada para que la misma tenga la intensidad apropiada.

Además, la CPFm participa en la regulación del eje HHA bajo condiciones de estrés y también cumple una función en la regulación de la conducta emocional y de búsqueda de recompensa. Se ha observado que lesiones en las cortezas cingulada y prelímbica activaron la secreción de ACTH y CORT y aumentaron los niveles de ARNm de c-Fos luego de la exposición a inmovilización pero no a vapores de éter. Mientras que, implantes de CORT en

ir- = inmunoreactividad a || CPFm = corteza prefrontal medial || ECV = estrés crónico variable || NAc = núcleo accumbens
ATV = área tegmental ventral || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || ACTH = hormona adrenocorticotrofa
CORT = corticosterona || ARNm = ácido desoxirribonucleico mensajero

la CPFm, disminuyeron los niveles plasmáticos de esas hormonas, indicando una retroalimentación negativa, ejercida por acción de la CORT en la CPFm, la cual es dependiente del tipo de *estresor* (Diorio y col. 1993; Figueiredo y col. 2003).

En nuestro trabajo no hubo efecto del estrés sobre la corteza IL (fig. 26 -C-). En otro trabajo se observó que el enriquecimiento ambiental indujo resiliencia al estrés social en ratones y esto estuvo relacionado con niveles elevados, en la corteza IL, de Δ FosB (perteneciente a la familia de proteínas Fos, pero más persistente en el tiempo); mientras que, lesiones en la corteza IL impidieron la adquisición de esa resiliencia al estrés (Lehmann y Herkenham 2011). Por lo tanto, una hipofunción de esta subregión de la CPFm podría relacionarse con vulnerabilidad, al menos al estrés de tipo social. Aunque nosotros no hayamos encontrado diferencias en la expresión c-Fos de la corteza IL, ésta podría ser importante en la regulación de otras modalidades de estrés, o bien los cambios en la actividad neuronal en el momento analizado (48 h después del último *estresor*) podrían ser más notorios en la expresión de Δ FosB que en la de c-Fos.

Además, la corteza IL ha sido relacionada con los procesos de extinción del aprendizaje, incluido la extinción del miedo o de la búsqueda de drogas (Millan y col. 2011). En este sentido, un aumento de la expresión c-Fos en la corteza IL y el reclutamiento de proyecciones desde la corteza IL hacia el hipotálamo dorso medial fue asociado con la expresión de la extinción de la búsqueda de alcohol (Marchant y col. 2010). También se ha sugerido que la corteza IL inhibe a la corteza PL y a la BLA, estructuras que promueven el establecimiento de la búsqueda de drogas, promoviendo de esta manera la extinción de esa conducta (Millan y col. 2011).

La separación materna no alteró la expresión de c-Fos en ninguna de las subregiones de la corteza prefrontal medial (fig. 26). De igual modo, la separación por 3 h durante 10 días consecutivos, no produjo efectos en la actividad neuronal de la CPFm de ratas Sprague Dawley adultas, sin embargo ante un estrés nociceptivo visceral de tipo agudo, la ir-Fos en esta estructura aumentó respecto de los animales criados con madre, expuestos al mismo estrés agudo (Felice y col. 2014), demostrando que aunque esta estructura no se vea afectada en su actividad neuronal basal, su reactividad al estrés puede estar aumentada. Además, otros mecanismos activadores de la respuesta de estrés podrían estar afectados, por ejemplo, se observó en la CPF de ratas Sprague Dawley adultas, sometidas a estrés prenatal, una

CPFm = corteza prefrontal medial || CORT = corticosterona || IL = infralímbica || PrL = prelímbica
BLA = amígdala basolateral || ir- = inmunoreactividad a || CPF = corteza prefrontal

disminución de los niveles de FKBP51, una proteína que reduce la afinidad de GR por la CORT y su translocación al núcleo, por lo que habría un aumento de la unión de la hormona a su receptor (Szymanska y col. 2009).

En ratas, la CPFm se desarrolla más tardíamente que la amígdala y que el hipocampo, encontrándose durante las tres primeras semanas postnatales, aún en una etapa temprana de la ontogenia. Se ha propuesto que las estructuras con un mayor grado de desarrollo son las más afectadas por el estrés temprano (Kosten y col. 2012). Esto podría explicar por qué, la separación materna, durante estas 3 primeras semanas de vida, no produjo deterioro en la CPFm, estructura poco desarrollada hasta ese momento. Por el contrario, la separación materna temprana se ha visto relacionada con mejores desempeños en pruebas de aprendizaje inhibitorio, las cuales son dependientes de esta estructura (Kosten y col. 2012).

Además, se ha observado que la manipulación temprana (separación breve) atenúa el aumento, inducido por ECV, de marcadores de estrés oxidativo en la CPF; sin embargo, el procedimiento utilizado fue muy diferente, ya que consistió en la estimulación táctil de las crías durante 10 min por día, durante 3 semanas (Bouffleur y col. 2013). En cambio, Braun y cols. (Braun y col. 2000), en experimentos realizados con el degú o ratón de las pircas (*Octodon degus*), obtuvieron que la separación materna por 1 h, 3 veces al día, durante las 3 primeras semanas postnatales, seguida de aislamiento social crónico, provocó en las cortezas PrL, Cg y precentral medial (PrCm), una disminución de las fibras inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa; mientras que en la corteza IL aumentó el número de fibras ir-5-HT. Además de utilizarse un protocolo de separación y estrés diferente, en este caso la especie utilizada presenta un desarrollo anterior de la CPF, con todas las capas presentes al momento del nacimiento y una maduración completa ya en el DPN 14 (Braun y col. 2000). Por lo tanto el estrés temprano afectaría más intensamente a la CPFm del degú que a la de la rata.

Por otro lado, se ha asociado la disminución de la expresión de GR en la corteza frontal, inducida por la separación materna, con un aumento en la sensibilidad hipofisaria al estrés; por el contrario, ratas separadas y estresadas en la adultez mostraron un aumento de la expresión GR en corteza frontal, asociada con una disminución de la sensibilidad de la hipófisis (Ladd y col. 2005).

FKBP51 = proteína 51 de unión a tracolimus (FK506) || **GR** = receptor de glucocorticoides || **CORT** = corticosterona
CPFm = corteza prefrontal medial || **ECV** = estrés crónico variable || **CPF** = corteza prefrontal || **PrL** = prefrontal
Cg = cingulada || **IL** = infralímbica || **ir-** = inmunoreactividad a || **5-HT** = serotonina

5.7. NÚCLEO ACCUMBENS

Contrario a lo que esperábamos, ninguno de los tratamientos (separación materna, ECV y antidepresivo) aplicados a los animales produjo alteraciones significativas de la actividad neuronal en el NAc (fig. 27). Grippo y cols. encontraron que animales expuestos a ECV por 4 semanas, mostraron una menor activación del NAc en respuesta a una solución de sacarosa (Grippo y col. 2004). Considerando esto, aunque la actividad neuronal en este núcleo no fue modificada significativamente por el estrés en nuestro estudio, su reactividad luego de la exposición a un estímulo placentero podría estar afectada. En futuros estudios podría incluirse la repuesta del NAc a un estímulo placentero para clarificar esto. Además, en otro trabajo se encontró que el estrés agudo por inmovilización produjo un aumento del número de neuronas c-Fos positivas en el NAc *shell* pero no en el NAc *core* (Park y col. 2014). Aunque la respuesta a un estrés agudo puede ser muy diferente a la del estrés crónico, es sabido que existen diferencias funcionales entre las distintas subregiones del NAc (Kalivas y Volkow 2005), por lo que es posible que en nuestros animales esté afectada una de las dos subregiones y en el análisis del núcleo completo, esos cambios queden enmascarados.

El NAc está relacionado con conductas emocionales y su alteración puede implicar déficits en la regulación de las respuestas emocionales generadas por el animal. Además, son activadas por estímulos emocionalmente relevantes y la menor activación de estos grupos neuronales indicaría una disminución en la capacidad de experimentar sensaciones placenteras. La relación entre alteraciones en el NAc y depresión han sido bien establecidas. Trabajando con ratones, Vialou y col. demostraron que la inducción de Δ FosB en el NAc promueve la resiliencia al estrés crónico por *social defeat* y contribuye a la respuesta antidepresiva, mientras que, el aislamiento social crónico disminuyó los niveles de Δ FosB en esa estructura. Además, estos investigadores reportaron bajos niveles de Δ FosB en el NAc de personas con depresión, corroborando lo encontrado en el modelo animal (Vialou y col. 2010). Además, se observó en pacientes depresivos altamente resistentes a terapia farmacológica y electroconvulsiva, que la estimulación profunda del NAc (a través de electrodos implantados) tuvo efectos antidepresivos (incluidos efectos hedónicos) y ansiolíticos (Bewernick y col. 2010; Schlaepfer y col. 2008).

Por otro lado, se ha observado que tianeptina aumenta los niveles de DA en el NAc de ratas (Invernizzi y col. 1992). Teniendo en cuenta que, el bloqueo en el NAc, de la

ECV = estrés crónico variable || NAc = núcleo accumbens || DA = dopamina

transmisión DAérgica por un antagonista D2, impide los efectos antidepresivos de desipramina, evaluados en el *forced swimming test* (Cervo y Samanin 1987), podría especularse con que el aumento de la actividad DAérgica del NAc mediaría algunos de los efectos antidepresivos de tianeptina. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, esta droga no afecta la actividad neuronal del núcleo accumbens (fig. 27).

Jahng y col. (2010) observaron que ratas Sprague Dawley adolescentes (41 días de edad) separadas tempranamente de la madre, presentaban, en condiciones basales, un aumento no significativo de la ir-Fos en el NAc. Sin embargo, al dividir el NAc en las subregiones *shell* y *core*, hubo un aumento significativo de la actividad neuronal en el NAc *core* (Jahng y col. 2010). En nuestro trabajo no se encontró efecto de la separación sobre la actividad del NAc, aunque alguna de las subregiones podría estar afectada.

5.8. ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

La actividad neuronal en el ATV, no se vio afectada en los animales estresados (fig. 28). Esto se corresponde con resultados obtenidos en un modelo de estrés por miedo condicionado (*conditioned-fear stress*) en ratas (Ishida y col. 2002) y de estrés inescapable en ratones (Berton y col. 2007), en donde el estrés no indujo, en el ATV, cambios en los niveles de c-Fos o Δ FosB, respectivamente. Sin embargo en ambos trabajos se encontró un aumento de actividad neuronal en el *locus coeruleus* y en el núcleo dorsal del rafe, indicando una mayor participación de estas estructuras, las cuales poseen importantes conexiones con la amígdala, al menos en la regulación del aprendizaje de indefensión (*helplessness*).

Por el contrario, en ratas Sprague Dawley la exposición a ECV provocó una disminución en la proporción de neuronas DAérgicas del ATV que dispararon espontáneamente (*population activity*), sin verse afectado ni la intensidad media de disparo (*mean firing rates*) ni la actividad de disparo en ráfaga (*bursting activity*) (Chang y Grace 2014). La menor actividad de las neuronas de este núcleo está en discordancia con la falta de efecto del ECV observada en nuestro estudio. Además de haber utilizado en nuestro proyecto otra cepa de ratas, las diferencias obtenidas podrían deberse a variaciones en el protocolo de estrés aplicado, ya que en el trabajo mencionado anteriormente, además de *estresores* físicos se incorporaron estresores de tipo psicológico (olor de un predador) y social (intruso), diferenciándose así de nuestro protocolo de ECV. Se ha demostrado que el tipo de *estresor* puede afectar diferencialmente la plasticidad del sistema nervioso. En este sentido, mientras el frío disminuyó la actividad espontánea de las neuronas DAérgicas del ATV de ratas, el estrés por inmovilización la aumentó, e incluso la exposición previa a frío inhibió el aumento, inducido por inmovilización, de la actividad de estas neuronas (Valenti y col. 2012). Por lo tanto, la combinación de estresores seleccionados en cada protocolo de ECV puede afectar la respuesta obtenida.

Además, en el ATV, no hubo diferencias en el número de neuronas Fos-positivas entre los animales separados de la madre y los criados con la madre (fig. 28). De igual modo, en ratas Wistar adultas separadas por 6 h entre los DPN 1 a 14, no se encontraron cambios en los niveles de 5-HT ni del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), un metabolito de la 5-HT, en el ATV. Tampoco se encontraron diferencias en el recambio de DA en esta estructura cerebral, evaluado en función de la formación de sus metabolitos (el ácido 3,4-di-hidroxi-

ATV = área tegmental ventral || ECV = estrés crónico variable || DAérgicas = dopaminérgicas || DPN = día postnatal
5-HT = serotonina || DA = dopamina

fenilacético –DOPAC- y el ácido homovanílico -HVA-) en relación a los niveles del neurotransmisor (DOPAC+HVA / DA). Esto indica que no habría cambios en la actividad neuronal del ATV, ya que la cantidad de metabolito formado refleja la cantidad de neurotransmisor liberado y por lo tanto, cambios en los niveles de metabolitos formados pueden usarse como medida de actividad neuronal (Oreland y col. 2011). Además, en otro trabajo, la separación materna por 3 h diarias en las primeras semanas de vida, no produjo cambios en el volumen del ATV ni tampoco en la densidad de células ir-TH (tiroxina hidroxilasa) en esta estructura en machos, aunque hubo un aumento de ir-TH en hembras separadas de la madre (Chocyk y col. 2011; Madruga y col. 2006). Estos datos considerados conjuntamente indican que, la separación materna temprana no produce efectos en la actividad basal del ATV en ratas macho adultas. Aunque no puede descartarse que exista una alteración, en esta área, de la sensibilidad al estrés o a estímulos motivacionales, ya sean confortables (recompensas) o aversivos.

Por último, el antidepresivo tianeptina disminuyó la actividad neuronal del ATV. El circuito mesolímbico ocupa una posición central en el control de las conductas motivacionales, sin embargo, la contribución funcional de las proyecciones específicas desde el ATV hacia NAc, CPFm y amígdala no han sido suficientemente esclarecidas (Walsh y Han 2014). Algunos autores han relacionado un aumento, contexto específico, de la actividad de las proyecciones DAérgicas ATV-NAc con susceptibilidad al estrés, mientras que la inhibición de estas neuronas se asoció con resiliencia. Por el contrario, la inhibición de las proyecciones ATV-CPFm indujo susceptibilidad al estrés (Chaudhury y col. 2013). Opuesto a estos resultados, otros investigadores, han reportado que las proyecciones ATV-CPFm son activadas preferentemente por estímulo aversivos y, por lo tanto, se esperaría que una sobre-activación de estas neuronas se relacione con síntomas de depresión tales como anhedonia. En cambio, las proyecciones hacia el NAc *shell* señalarían primariamente los estímulos de recompensa y quizás también la importancia de ese estímulo (Lammel y col. 2012). Teniendo en cuenta esto, la disminución de la actividad neuronal producida por tianeptina en el ATV, podría afectar circuitos específicos, como las proyecciones ATV-CPF, para producir alguno de sus efectos antidepresivos. Sin embargo, otros estudios son necesarios para confirmar esto.

DA = dopamina || ATV = área tegmental ventral || ir- = inmunoreactividad a || NAc = núcleo accumbens
CPFm = corteza prefrontal medial || DAérgicas = dopaminérgicas

5.9. CONSIDERACIONES FINALES

El estrés crónico variable mostró sobre las variables medidas, algunos efectos generales, afectando a todos los grupos. En primer lugar, el ECV provocó una disminución de la actividad neuronal en el hipocampo. Dado que ésta es una estructura inhibidora del eje HHA, la disminución de su actividad neuronal puede contribuir a la sobre-activación del NPV observada en animales estresados, respecto de los no estresados. En segundo lugar, el estrés crónico produjo una disminución de la actividad neuronal en la CPFm, lo cual podría asociarse también, con el aumento de actividad de este núcleo, ya que la CPFm tiene un efecto inhibitor sobre el NPV. Además, la CPFm provee la importancia motivacional de un estímulo y participa en la generación de una respuesta adecuada; por lo tanto, la disminución de su actividad puede afectar la evaluación apropiada de los estímulos y la consecuente respuesta hedónica. Por último, además del aumento de actividad del eje HHA, el estrés también aumentó la conducta de ansiedad.

Como esperábamos, además de los efectos generales, el estrés tuvo también algunos efectos dependientes de las experiencias tempranas de los animales. De esta manera, en los animales criados con la madre, pero no en los separados, el estrés aumentó los receptores GR y MR en el hipocampo dorsal. Además, el protocolo de ECV aplicado sobre animales CM, tratados con vehículo produjo un aumento de células GR-positivas en la MeA (facilitando así su activación por acción de la corticosterona), y también un aumento de la corticosterona plasmática. Mientras que, en los animales SM, con vehículo, el estrés disminuyó las células GR-positivas en la MeA y no modificó los niveles de la hormona. Esto sugiere que los neonatos, al ser separados de su madre de forma crónica, sufren cambios en los circuitos que controlan la respuesta neuroendócrina al estrés, que son persistentes en el adulto y le confieren, frente a un ambiente adulto con alto nivel de estrés, menores niveles de GR en la amígdala y una atenuación del aumento de corticosterona inducido por estrés, respecto de aquellos animales que fueron criados con la madre.

Por su parte, el tratamiento de separación materna también tuvo efectos generales y efectos dependientes de la interacción con el estrés y el antidepresivo. Entre los efectos generales se observó un aumento de la ansiedad y de la actividad Fos en hipocampo, MeA y NPV. La mayor actividad de la MeA probablemente contribuya al aumento de la actividad del NPV y

ECV = estrés crónico variable || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || NPV = núcleo paraventricular
CPFm = corteza prefrontal medial || GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de glucocorticoides
MR = receptor de mineralocorticoides || CM = criados con madre || MeA = núcleo medial de la amígdala
SM = separados de la madre

al aumento de ansiedad encontrado en los animales SM. En cambio el aumento de actividad Fos del hipocampo podría ser compensatorio a esa sobre-activación del NPV. Por último la separación materna aumentó el balance MR/GR en el NPV, lo cual se ha visto relacionado con la depresión.

Por otro lado, algunos de los efectos de la separación materna observados en este trabajo dependieron de la aplicación o no del protocolo de estrés crónico, cuando adultos. En este caso se observó que, en los animales sin ECV, la separación aumentó la ir-GR en el hipocampo, mientras que en los animales sometidos a ECV, la ir-GR y la ir-MR fueron disminuidas por la separación. Además, la separación aumentó la ir-GR de la MeA en los animales no estresados, tratados con vehículo y por el contrario, la disminuyó en los estresados. Por lo tanto, los efectos de la separación materna sobre la expresión de estos receptores en hipocampo y amígdala, parece depender del contexto actual en que se desarrolla el animal.

En cambio, ni la separación materna, ni el estrés crónico, ni la aplicación de ambos protocolos juntos, afectaron la actividad de la CeA, del NAc o del ATV ni tampoco alteraron el consumo ni la preferencia por una solución de sacarosa.

En cuanto al antidepresivo, se observó que el mismo aumentó las células inmunoreactivas a GR y a MR en el hipocampo, lo que facilitaría la retroalimentación negativa del eje HHA, y además disminuyó la ansiedad de los animales. En cambio, en la amígdala, tianeptina afectó diferencialmente la ir-GR, dependiendo del contexto de la vida temprana y adulta. Así, el tratamiento con este antidepresivo aumentó las neuronas GR-positivas tanto en animales CM, sin estrés como en los SM con estrés. Pero produjo una disminución de estas neuronas cuando fue administrada en animales SM, sin estrés.

En nuestro modelo, la separación y el estrés, de manera independiente, afectaron la actividad neuronal del hipocampo (el estrés disminuyó la ir-Fos y la SM la aumentó), MeA (la SM aumentó la ir-Fos), NPV (tanto la SM como el ECV aumentaron la ir-Fos) y la CPFm (el ECV disminuyó la ir-Fos), y además ambos tratamientos aumentaron la ansiedad. Por el contrario, el efecto sobre los receptores GR y MR fue principalmente dependiente de la interacción entre ambos protocolos. En resumen, como era de esperarse los tratamientos de

SM = separados de la madre || NPV = núcleo paraventricular || MR = receptor de mineralocorticoides
GR = receptor de glucocorticoides || ECV = estrés crónico variable || ir- = inmunoreactividad a
MeA = núcleo medial de la amígdala || CeA = núcleo central de la amígdala || NAc = núcleo accumbens
ATV = área tegmental ventral || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || CM = criados con madre
CPFm = corteza prefrontal medial

separación materna y de estrés fueron ansiogénicos y se asociaron a la activación del eje HHA (a excepción del aumento de actividad hipocampal encontradas en ratas SM, lo cual probablemente sea compensatorio a la mayor actividad del NPV y de la MeA). En cambio, la separación materna demostró producir cambios persistentes en los niveles de neuronas que expresan GR y MR, en estructuras cerebrales que participan en la regulación de la respuesta de estrés. Además, el estrés aumentó los niveles de corticosterona plasmática en los animales criados con la madre, tratados con vehículo. Pero ese aumento no se observó luego de que animales SM fueran sometidos a ECV, a pesar de que tanto el ECV como la separación produjeron una sobreactivación del NPV. De lo anterior se desprende que, en los animales separados tempranamente de la madre, se producen cambios neuroendócrinos adaptativos persistentes a largo plazo, los cuales les confieren una respuesta diferente al estrés en la vida adulta. En nuestro modelo, esto se tradujo en una atenuación, en los animales SM, de la reactividad neuroendócrina al estrés crónico en el adulto, al bloquearse el aumento inducido por estrés, de los niveles de corticosterona plasmática, incluso a pesar de tener aumentada la actividad del NPV.

Por el contrario, el antidepresivo tianeptina aumentó la ir-GR y la ir-MR en el hipocampo, facilitando la retroalimentación negativa del eje HHA y además tuvo un efecto ansiolítico, al aumentar los porcentajes de entradas y permanencia en brazos abiertos del *plus maze*. En cambio, en la amígdala, el tratamiento con tianeptina produjo resultados diferentes de acuerdo a las experiencias del animal en la vida temprana y también en el adulto. De esta forma, en los animales con bajo nivel de estrés, tanto en su vida temprana como adulta (CM, sin ECV) y también en los animales con alto nivel de estrés en ambas etapas de su vida (SM, con ECV) tianeptina aumentó las neuronas ir-GR, respecto de los tratados con vehículo. Por el contrario, cuando la droga se administró en animales con alto nivel de estrés en la vida temprana pero bajo nivel en el adulto (SM, sin ECV), produjo una disminución de las células GR-positivas, comparadas con el grupo con vehículo respectivo. Es de destacar que en los animales no estresados y tratados con vehículo la separación materna produjo una regulación hacia arriba (*up-regulation*) de las neuronas que expresan GR en la MeA, por lo que el antidepresivo bloquea ese aumento. De igual modo, en los grupos con ECV y vehículo, la separación disminuyó la ir-GR, mientras la administración de tianeptina inhibe esa disminución. En síntesis, esta droga demostró ser ansiolítica y producir efectos generales sobre el hipocampo,

SM = separados de la madre || NPV = núcleo paraventricular || MeA = núcleo medial de la amígdala
GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de mineralocorticoides || ECV = estrés crónico variable
ir- = inmunoreactividad a || HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || CM = criados con madre

tendientes a mejorar la regulación del eje HHA. Mientras que en la amígdala, esta droga tiende a normalizar los niveles de células inmunoreactivas a GR.

Por último, tianeptina disminuyó la actividad neuronal del ATV. Dado que se ha asociado la susceptibilidad al estrés con un aumento de los disparos de las neuronas del ATV, la disminución de la actividad de este núcleo producida por tianeptina en nuestro trabajo podría conferirles a los animales resiliencia al estrés. Sin embargo, es de destacar que en nuestro modelo, ni el estrés ni la separación afectaron la actividad Fos de este núcleo.

HHA = hipotálamo-hipófiso-adrenal || **GR** = receptor de glucocorticoides || **ATV** = área tegmental ventral

6. CONCLUSIÓN

Se estudió, en ratas macho adultas, los efectos de la separación materna temprana, el estrés crónico variable y el antidepressivo tianeptina, sobre los niveles de células inmunoreactivas a GR, MR y Fos en el hipocampo dorsal, núcleo paraventricular del hipotálamo y amígdala central y medial. También se determinó la inmunoreactividad a Fos en la corteza prefrontal medial, el núcleo accumbens y el área tegmental ventral. Además se evaluó la conducta de ansiedad, el estado hedónico y la corticosterona plasmática.

El estrés crónico variable produjo:

- Disminución de ir-Fos en hipocampo dorsal
- Aumento de ir-Fos en núcleo paraventricular
- Disminución de ir-Fos en corteza prefrontal medial (cingulada y prelímbica)
- Aumento de ansiedad
- Aumento de ir-GR e ir-MR en hipocampo dorsal (en animales criados con la madre)
- Aumento de ir-GR en amígdala medial (en animales criados con la madre, tratados con vehículo)
- Aumento de corticosterona plasmática (en animales criados con la madre, tratados con vehículo)

La separación materna temprana provocó:

- Aumento de ir-Fos en hipocampo dorsal
- Aumento del balance MR/GR y de ir-Fos en núcleo paraventricular
- Aumento de ir-Fos en núcleo medial de la amígdala
- Aumento de ansiedad
- Aumento de ir-GR en hipocampo dorsal (en animales sin estrés crónico variable)
- Aumento de ir-GR en amígdala medial (en animales sin estrés crónico, tratados con vehículo)

La separación materna en los animales estresados como adultos generó:

- Disminución de ir-GR e ir-MR en hipocampo dorsal
- Disminución de ir-GR en amígdala medial (en animales tratados con vehículo)
- Inhibición del aumento de corticosterona inducida por estrés

GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de mineralocorticoides || ir- = inmunoreactividad a

La tianeptina produjo:

- Aumento de ir-GR e ir-MR en hipocampo dorsal
- Disminución de ir-Fos en área tegmental ventral
- Disminución de la ansiedad
- Normalización contexto-dependiente de los niveles de ir-GR en la amígdala
- Disminución de ir-MR en núcleo paraventricular (en animales criados con la madre)

En conclusión, nuestros resultados muestran que los eventos de la vida temprana producen alteraciones en la regulación de la respuesta de estrés en el adulto, observándose en éstos, luego de la exposición a estrés crónico, una repuesta diferencial a nivel de los receptores de gluco- y mineralocorticoides y también en cuanto a los niveles de corticosterona plasmática. Sin embargo las interacciones producidas son complejas, ya que por un lado, la separación materna podría conferir vulnerabilidad al estrés en el adulto, al disminuir el número de neuronas que expresan GR y MR en hipocampo. Pero, por otro lado, afectaría positivamente la regulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, al inhibir la respuesta de corticosterona ante situaciones de estrés crónico.

Además de estos datos se desprende que el tratamiento con el antidepresivo tricíclico tianeptina produce efectos a nivel central, los cuales podrían atenuar la desregulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, con frecuencia alterado en estados de depresión, mientras que a nivel conductual posee un efecto ansiolítico.

GR = receptor de glucocorticoides || MR = receptor de mineralocorticoides || ir- = inmunoreactividad a

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abelaira H.M., Reus G.Z., Quevedo J. (2013). Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista brasileira de psiquiatria* 35 Suppl 2:S112-120
- Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Rio J., Ramirez M.J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32(3):256-266
- Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Rio J., Ramirez M.J. (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154(4):1218-1226
- Al-Qadhi W., Ur Rahman S., Ferwana M.S., Abdulmajeed I.A. (2014). Adult depression screening in Saudi primary care: prevalence, instrument and cost. *BMC psychiatry* 14:190
- Alcaro A., Huber R., Panksepp J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain research reviews* 56(2):283-321
- Alenina N., Klempin F. (2014). The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behavioural brain research*
- Alfonso J., Frick L.R., Silberman D.M., Palumbo M.L., Genaro A.M., Frasch A.C. (2006). Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biological psychiatry* 59(3):244-251
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5ta ed., Arlington, V A. American Psychiatric Association
- Anisman H., Zaharia M.D., Meaney M.J., Merali Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 16(3-4):149-164
- Arias-Carrion O., Caraza-Santiago X., Salgado-Licon S., Salama M., Machado S., Nardi A.E., Menendez-Gonzalez M., Murillo-Rodriguez E. (2014). Orquestic regulation of neurotransmitters on reward-seeking behavior. *International archives of medicine* 7:29
- Atmaca M., Kuloglu M., Tezcan E., Buyukbayram A. (2003). Switching to tianeptine in patients with antidepressant-induced sexual dysfunction. *Human psychopharmacology* 18(4):277-280
- Ayensu W.K., Pucilowski O., Mason G.A., Overstreet D.H., Rezvani A.H., Janowsky D.S. (1995). Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiology & behavior* 57(1):165-169
- Bagot R.C., van Hasselt F.N., Champagne D.L., Meaney M.J., Krugers H.J., Joels M. (2009). Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. *Neurobiology of learning and memory* 92(3):292-300
- Baker S.L., Kentner A.C., Konkle A.T., Santa-Maria Barbagallo L., Bielajew C. (2006). Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats. *Physiology & behavior* 87(2):314-322
- Barden N., Reul J.M., Holsboer F. (1995). Do antidepressants stabilize mood through actions on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system? *Trends in neurosciences* 18(1):6-11
- Barik J., Marti F., Morel C., Fernandez S.P., Lanteri C., Godeheu G., Tassin J.P., Mombereau C., Faure P., Tronche F. (2013). Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. *Science* 339(6117):332-335
- Belsky J., Pluess M. (2009). Beyond diathesis stress: differential susceptibility to environmental influences. *Psychological bulletin* 135(6):885-908
- Belsky J., Beaver K.M. (2011). Cumulative-genetic plasticity, parenting and adolescent self-regulation. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 52(5):619-626
- Berridge K.C., Robinson T.E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research. Brain research reviews* 28(3):309-369
- Berton O., Covington H.E., 3rd, Ebner K., Tsankova N.M., Carle T.L., Ulery P., Bhonsle A., Barrot M., Krishnan V., Singewald G.M., Singewald N., Birnbaum S., Neve R.L., Nestler E.J. (2007). Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 55(2):289-300
- Bewernick B.H., Hurlmann R., Matusch A., Kayser S., Grubert C., Hadrysiewicz B., Axmacher N., Lemke M., Cooper-Mahkorn D., Cohen M.X., Brockmann H., Lenartz D., Sturm V., Schlaepfer T.E. (2010). Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biological psychiatry* 67(2):110-116
- Binelli C., Subira S., Batalla A., Muniz A., Sugranyes G., Crippa J.A., Farre M., Perez-Jurado L., Martin-Santos R. (2014). Common and distinct neural correlates of facial emotion processing in social anxiety disorder and Williams syndrome: A systematic review and voxel-based meta-analysis of functional resonance imaging studies. *Neuropsychologia* 64C:205-217
- Bjartmar L., Johansson I.M., Marcusson J., Ross S.B., Seckl J.R., Olsson T. (2000). Selective effects on NGFI-A, MR, GR and NGFI-B hippocampal mRNA expression after chronic treatment with different subclasses of antidepressants in the rat. *Psychopharmacology* 151(1):7-12

- Bouffleur N., Antoniazzi C.T., Pase C.S., Benvegno D.M., Dias V.T., Segat H.J., Roversi K., Roversi K., Nora M.D., Koakoskia G., Rosa J.G., Barcellos L.J., Burger M.E. (2013). Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: behavioral and oxidative parameters. *Stress* 16(3):321-330
- Brady L.S., Whitfield H.J., Jr., Fox R.J., Gold P.W., Herkenham M. (1991). Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *The Journal of clinical investigation* 87(3):831-837
- Braun K., Lange E., Metzger M., Poeggel G. (2000). Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of Octodon degus. *Neuroscience* 95(1):309-318
- Budziszewska B., Jaworska-Feil L., Kajta M., Lason W. (2000). Antidepressant drugs inhibit glucocorticoid receptor-mediated gene transcription - a possible mechanism. *British journal of pharmacology* 130(6):1385-1393
- Burghardt N.S., Sullivan G.M., McEwen B.S., Gorman J.M., LeDoux J.E. (2004). The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: a comparison with tianeptine. *Biological psychiatry* 55(12):1171-1178
- Cabib S., Puglisi-Allegra S. (1996). Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology* 128(4):331-342
- Cabib S. (1997). What is mild in mild stress? *Psychopharmacology* 134(4):344-346; discussion 371-347
- Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plotsky P.M., Meaney M.J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9):5335-5340
- Cameron H.A., Woolley C.S., Gould E. (1993). Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain research* 611(2):342-346
- Campbell A.M., Park C.R., Zoladz P.R., Munoz C., Fleshner M., Diamond D.M. (2008). Pre-training administration of tianeptine, but not propranolol, protects hippocampus-dependent memory from being impaired by predator stress. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 18(2):87-98
- Cao J.L., Covington H.E., 3rd, Friedman A.K., Wilkinson M.B., Walsh J.J., Cooper D.C., Nestler E.J., Han M.H. (2010). Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(49):16453-16458
- Cao X., Liu Z., Xu C., Li J., Gao Q., Sun N., Xu Y., Ren Y., Yang C., Zhang K. (2012). Disrupted resting-state functional connectivity of the hippocampus in medication-naïve patients with major depressive disorder. *Journal of affective disorders* 141(2-3):194-203
- Castanon N., Konsman J.P., Medina C., Chauvet N., Dantzer R. (2003). Chronic treatment with the antidepressant tianeptine attenuates lipopolysaccharide-induced Fos expression in the rat paraventricular nucleus and HPA axis activation. *Psychoneuroendocrinology* 28(1):19-34
- Caudal D., Jay T.M., Godsil B.P. (2014). Behavioral stress induces regionally-distinct shifts of brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor levels. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8:19
- Cervo L., Samanin R. (1987). Evidence that dopamine mechanisms in the nucleus accumbens are selectively involved in the effect of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology* 26(10):1469-1472
- Claessens S.E., Daskalakis N.P., van der Veen R., Oitzl M.S., de Kloet E.R., Champagne D.L. (2011). Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology* 214(1):141-154
- Conrad C.D., Galea L.A., Kuroda Y., McEwen B.S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral neuroscience* 110(6):1321-1334
- Cotella E.M., Durando P.E., Suárez M.M. (2014). A double-hit model of stress dysregulation in rats: implications for limbic corticosteroid receptors and anxious behavior under amitriptyline treatment. *Stress* 17(3):235-246
- Covington H.E., 3rd, Lobo M.K., Maze I., Vialou V., Hyman J.M., Zaman S., LaPlant Q., Mouzon E., Ghose S., Tamminga C.A., Neve R.L., Deisseroth K., Nestler E.J. (2010). Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(48):16082-16090
- Cruz F.C., Quadros I.M., Planeta Cda S., Miczek K.A. (2008). Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology* 201(3):459-468
- Czéh B., Michaelis T., Watanabe T., Frahm J., de Biurrun G., van Kampen M., Bartolomucci A., Fuchs E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are

- prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(22):12796-12801
- Champagne D.L., Bagot R.C., van Hasselt F., Ramakers G., Meaney M.J., de Kloet E.R., Joels M., Krugers H. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(23):6037-6045
- Chang C.H., Grace A.A. (2014). Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity after chronic mild stress in rats. *Biological psychiatry* 76(3):223-230
- Chapman D.P., Whitfield C.L., Felitti V.J., Dube S.R., Edwards V.J., Anda R.F. (2004). Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *Journal of affective disorders* 82(2):217-225
- Chaudhury D., Walsh J.J., Friedman A.K., Juarez B., Ku S.M., Koo J.W., Ferguson D., Tsai H.C., Pomeranz L., Christoffel D.J., Nectow A.R., Ekstrand M., Domingos A., Mazei-Robison M.S., Mouzon E., Lobo M.K., Neve R.L., Friedman J.M., Russo S.J., Deisseroth K., Nestler E.J., Han M.H. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493(7433):532-536
- Chen F., Madsen T.M., Wegener G., Nyengaard J.R. (2009). Repeated electroconvulsive seizures increase the total number of synapses in adult male rat hippocampus. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19(5):329-338
- Chen F., Madsen T.M., Wegener G., Nyengaard J.R. (2010). Imipramine treatment increases the number of hippocampal synapses and neurons in a genetic animal model of depression. *Hippocampus* 20(12):1376-1384
- Chocyk A., Dudys D., Przyborowska A., Majcher I., Mackowiak M., Wedzony K. (2011). Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. *Neuroscience* 173:1-18
- D'Aquila P.S., Brain P., Willner P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & behavior* 56(5):861-867
- Dalla C., Pitychoutis P.M., Kokras N., Papadopoulou-Daifoti Z. (2011). Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat. *Current topics in behavioral neurosciences* 8:97-118
- Daskalakis N.P., Bagot R.C., Parker K.J., Vinkers C.H., de Kloet E.R. (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology* 38(9):1858-1873
- Datla K.P., Curzon G. (1993). Behavioural and neurochemical evidence for the decrease of brain extracellular 5-HT by the antidepressant drug tianeptine. *Neuropharmacology* 32(9):839-845
- Dawson G.R., Tricklebank M.D. (1995). Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in pharmacological sciences* 16(2):33-36
- Dayas C.V., Buller K.M., Day T.A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *The European journal of neuroscience* 11(7):2312-2322
- De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joels M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews* 19(3):269-301
- de Kloet E.R., Joels M., Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience* 6(6):463-475
- de Kloet E.R. (2013). Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *Eur J Pharmacol* 719(1-3):53-62
- De Vry J., Schreiber R. (1997). The chronic mild stress depression model: future developments from a drug discovery perspective. *Psychopharmacology* 134(4):349-350; discussion 371-347
- Delbende C., Contesse V., Mocaer E., Kamoun A., Vaudry H. (1991). The novel antidepressant, tianeptine, reduces stress-evoked stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 202(3):391-396
- Della F.P., Abelaira H.M., Reus G.Z., Santos M.A., Tomaz D.B., Antunes A.R., Scaini G., Morais M.O., Streck E.L., Quevedo J. (2013). Treatment with tianeptine induces antidepressant-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. *Metabolic brain disease* 28(1):93-105
- Di Chiara G., Loddo P., Tanda G. (1999). Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biological psychiatry* 46(12):1624-1633
- Díaz Lujan V.E., Castellanos M.M., Levin G., Suárez M.M. (2008). Amitriptyline: sex-dependent effect on sympathetic response and anxiety in rats submitted to early maternal separation and variable chronic

- stress in adulthood. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26(5):415-422
- Diorio D., Viau V., Meaney M.J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(9):3839-3847
- Doron R., Lotan D., Versano Z., Benatav L., Franko M., Armoza S., Kately N., Rehavi M. (2014). Escitalopram or novel herbal mixture treatments during or following exposure to stress reduce anxiety-like behavior through corticosterone and BDNF modifications. *PloS one* 9(4):e91455
- Duman R.S., Malberg J., Thome J. (1999). Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biological psychiatry* 46(9):1181-1191
- Duncko R., Schwendt M., Jezova D. (2003). Altered glutamate receptor and corticoliberin gene expression in brain regions related to hedonic behavior in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 76(1):9-16
- Edwards V.J., Holden G.W., Felitti V.J., Anda R.F. (2003). Relationship between multiple forms of childhood maltreatment and adult mental health in community respondents: results from the adverse childhood experiences study. *The American journal of psychiatry* 160(8):1453-1460
- Elakovic I., Djordjevic A., Adzic M., Djordjevic J., Radojicic M., Matic G. (2011). Gender-specific response of brain corticosteroid receptors to stress and fluoxetine. *Brain research* 1384:61-68
- Ericsson A., Kovacs K.J., Sawchenko P.E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14(2):897-913
- Fattaccini C.M., Bolanos-Jimenez F., Gozlan H., Hamon M. (1990). Tianeptine stimulates uptake of 5-hydroxytryptamine in vivo in the rat brain. *Neuropharmacology* 29(1):1-8
- Felice V.D., Gibney S.M., Gosselin R.D., Dinan T.G., O'Mahony S.M., Cryan J.F. (2014). Differential activation of the prefrontal cortex and amygdala following psychological stress and colorectal distension in the maternally separated rat. *Neuroscience* 267:252-262
- Felitti V.J., Anda R.F., Nordenberg D., Williamson D.F., Spitz A.M., Edwards V., Koss M.P., Marks J.S. (1998). Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. *American journal of preventive medicine* 14(4):245-258
- Ferrini M., Piroli G., Frontera M., Falbo A., Lima A., De Nicola A.F. (1999). Estrogens normalize the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress and increase glucocorticoid receptor immunoreactivity in hippocampus of aging male rats. *Neuroendocrinology* 69(2):129-137
- Figueiredo H.F., Bruestle A., Bodie B., Dolgas C.M., Herman J.P. (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *The European journal of neuroscience* 18(8):2357-2364
- File S.E., Gonzalez L.E., Andrews N. (1996). Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16(15):4810-4815
- Forbes N.F., Stewart C.A., Matthews K., Reid I.C. (1996). Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiology & behavior* 60(6):1481-1484
- Friedman A.K., Walsh J.J., Juarez B., Ku S.M., Chaudhury D., Wang J., Li X., Dietz D.M., Pan N., Vialou V.F., Neve R.L., Yue Z., Han M.H. (2014). Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science* 344(6181):313-319
- Fuchs E., Czeh B., Michaelis T., de Biurrun G., Watanabe T., Frahm J. (2002). Synaptic plasticity and tianeptine: structural regulation. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 17 Suppl 3:311-317
- Fuchs E., Czéh B., Kole M.H., Michaelis T., Lucassen P.J. (2004). Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14(Suppl 5):S481-490
- Girotti M., Pace T.W., Gaylord R.I., Rubin B.A., Herman J.P., Spencer R.L. (2006). Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* 138(4):1067-1081
- Gold P.W., Chrousos G.P. (2002). Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Molecular psychiatry* 7(3):254-275
- Gomez-Sanchez C.E., de Rodriguez A.F., Romero D.G., Estess J., Warden M.P., Gomez-Sanchez M.T., Gomez-Sanchez E.P. (2006). Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 147(3):1343-1348
- Griffiths J., Shanks N., Anisman H. (1992). Strain-specific alterations in consumption of a palatable diet following repeated stressor exposure. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 42(2):219-227

- Grippe A.J., Na E.S., Johnson R.F., Beltz T.G., Johnson A.K. (2004). Sucrose ingestion elicits reduced Fos expression in the nucleus accumbens of anhedonic rats. *Brain research* 1019(1-2):259-264
- Grippe A.J., Beltz T.G., Weiss R.M., Johnson A.K. (2006). The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. *Biological psychiatry* 59(4):309-316
- Gunnar M.R., Donzella B. (2002). Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology* 27(1-2):199-220
- Hamilton J.P., Chen M.C., Gotlib I.H. (2013). Neural systems approaches to understanding major depressive disorder: an intrinsic functional organization perspective. *Neurobiology of disease* 52:4-11
- Han F., Ozawa H., Matsuda K., Nishi M., Kawata M. (2005). Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience research* 51(4):371-381
- Han F., Ding J., Shi Y. (2014). Expression of amygdala mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the single-prolonged stress rats. *BMC neuroscience* 15:77
- Harris A.P., Holmes M.C., de Kloet E.R., Chapman K.E., Seckl J.R. (2013). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 38(5):648-658
- Herman J.P., Ostrander M.M., Mueller N.K., Figueiredo H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29(8):1201-1213
- Heuser I., Lammers C.H. (2003). Stress and the brain. *Neurobiol Aging* 24 Suppl 1:S69-76; discussion S81-62
- Hill M.N., Hellems K.G., Verma P., Gorzalka B.B., Weinberg J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36(9):2085-2117
- Hill R.A., Klug M., Kiss Von Soly S., Binder M.D., Hannan A.J., van den Buuse M. (2014). Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a "two hit" rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. *Hippocampus* 24(10):1197-1211
- Ho Y.J., Eichendorff J., Schwarting R.K. (2002). Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behavioural brain research* 136(1):1-12
- Huether G. (1996). The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. *Progress in neurobiology* 48(6):569-612
- Huot R.L., Thrivikraman K.V., Meaney M.J., Plotsky P.M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158(4):366-373
- Huot R.L., Plotsky P.M., Lenox R.H., McNamara R.K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain research* 950(1-2):52-63
- Ikemoto S., Panksepp J. (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain research. Brain research reviews* 31(1):6-41
- Invernizzi R., Pozzi L., Garattini S., Samanin R. (1992). Tianeptine increases the extracellular concentrations of dopamine in the nucleus accumbens by a serotonin-independent mechanism. *Neuropharmacology* 31(3):221-227
- Ishida Y., Hashiguchi H., Takeda R., Ishizuka Y., Mitsuyama Y., Kannan H., Nishimori T., Nakahara D. (2002). Conditioned-fear stress increases Fos expression in monoaminergic and GABAergic neurons of the locus coeruleus and dorsal raphe nuclei. *Synapse* 45(1):46-51
- Jahng J.W., Ryu V., Yoo S.B., Noh S.J., Kim J.Y., Lee J.H. (2010). Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience* 171(1):144-152
- Kaae S.S., Chen F., Wegener G., Madsen T.M., Nyengaard J.R. (2012). Quantitative hippocampal structural changes following electroconvulsive seizure treatment in a rat model of depression. *Synapse* 66(8):667-676
- Kagamiishi Y., Yamamoto T., Watanabe S. (2003). Hippocampal serotonergic system is involved in anxiety-like behavior induced by corticotropin-releasing factor. *Brain research* 991(1-2):212-221
- Kalinichev M., Easterling K.W., Plotsky P.M., Holtzman S.G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 73(1):131-140
- Kalivas P.W., Volkow N.D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry* 162(8):1403-1413
- Karst H., Berger S., Turiault M., Tronche F., Schutz G., Joels M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(52):19204-19207

- Karst H., Berger S., Erdmann G., Schutz G., Joels M. (2010). Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32):14449-14454
- Kasper S., Olie J.P. (2002). A meta-analysis of randomized controlled trials of tianeptine versus SSRI in the short-term treatment of depression. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 17 Suppl 3:331-340
- Katz R.J., Roth K.A., Carroll B.J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 5(2):247-251
- Kelley A.E. (1999). Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877:71-90
- Kelly J.P., Leonard B.E. (1994). The effect of tianeptine and sertraline in three animal models of depression. *Neuropharmacology* 33(8):1011-1016
- Kendler K.S., Karkowski L.M., Prescott C.A. (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American journal of psychiatry* 156(6):837-841
- Kendler K.S., Thornton L.M., Gardner C.O. (2000). Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the "kindling" hypothesis. *The American journal of psychiatry* 157(8):1243-1251
- Kessler R.C. (1997). The effects of stressful life events on depression. *Annual review of psychology* 48:191-214
- Kim S.J., Park S.H., Choi S.H., Moon B.H., Lee K.J., Kang S.W., Lee M.S., Choi S.H., Chun B.G., Shin K.H. (2006). Effects of repeated tianeptine treatment on CRF mRNA expression in non-stressed and chronic mild stress-exposed rats. *Neuropharmacology* 50(7):824-833
- Kim Y.J., Shin M.C., Kim S.A., Chung J.H., Kim E.H., Kim C.J. (2002). Modulation of tianeptine on ion currents induced by inhibitory neurotransmitters in acutely dissociated dorsal raphe neurons of Sprague-Dawley rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 12(5):417-425
- Kole M.H., Swan L., Fuchs E. (2002). The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats. *The European journal of neuroscience* 16(5):807-816
- Konkle A.T., Baker S.L., Kentner A.C., Barbagallo L.S., Merali Z., Bielajew C. (2003). Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. *Brain research* 992(2):227-238
- Kosten T.A., Kim J.J., Lee H.J. (2012). Early life manipulations alter learning and memory in rats. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36(9):1985-2006
- Krishnan V., Han M.H., Graham D.L., Berton O., Renthal W., Russo S.J., Laplant Q., Graham A., Lutter M., Lagace D.C., Ghose S., Reister R., Tannous P., Green T.A., Neve R.L., Chakravarty S., Kumar A., Eisch A.J., Self D.W., Lee F.S., Tamminga C.A., Cooper D.C., Gershenfeld H.K., Nestler E.J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131(2):391-404
- Ladd C.O., Huot R.L., Thirivikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological psychiatry* 55(4):367-375
- Ladd C.O., Thirivikraman K.V., Huot R.L., Plotsky P.M. (2005). Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology* 30(6):520-533
- Lai M., McCormick J.A., Chapman K.E., Kelly P.A., Seckl J.R., Yau J.L. (2003). Differential regulation of corticosteroid receptors by monoamine neurotransmitters and antidepressant drugs in primary hippocampal culture. *Neuroscience* 118(4):975-984
- Lammel S., Lim B.K., Ran C., Huang K.W., Betley M.J., Tye K.M., Deisseroth K., Malenka R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491(7423):212-217
- Le Menuet D., Lombes M. (2014). The neuronal mineralocorticoid receptor: From cell survival to neurogenesis. *Steroids*
- Lee R.S., Tamashiro K.L., Yang X., Purcell R.H., Harvey A., Willour V.L., Huo Y., Rongione M., Wand G.S., Potash J.B. (2010). Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology* 151(9):4332-4343
- Lehmann M.L., Herkenham M. (2011). Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(16):6159-6173
- Lehner M., Wislowska-Stanek A., Taracha E., Maciejak P., Szyndler J., Skorzewska A., Turzynska D., Sobolewska A., Hamed A., Bidzinski A., Plaznik A. (2009). The expression of c-Fos and colocalisation

- of c-Fos and glucocorticoid receptors in brain structures of low and high anxiety rats subjected to extinction trials and re-learning of a conditioned fear response. *Neurobiology of learning and memory* 92(4):535-543
- Lepine J.P., Altamura C., Ansseau M., Gutierrez J.L., Bitter I., Lader M., Waintraub L. (2001). Tianeptine and paroxetine in major depressive disorder, with a special focus on the anxious component in depression: an international, 6-week double-blind study dagger. *Human psychopharmacology* 16(3):219-227
- Levine S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiology & behavior* 73(3):255-260
- Levine S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30(10):939-946
- Li Y.W., Dampney R.A. (1994). Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience* 61(3):613-634
- Lippmann M., Bress A., Nemeroff C.B., Plotsky P.M., Monteggia L.M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *The European journal of neuroscience* 25(10):3091-3098
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277(5332):1659-1662
- Liu D., Caldji C., Sharma S., Plotsky P.M., Meaney M.J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of neuroendocrinology* 12(1):5-12
- Liu W., Shu X.J., Chen F.Y., Zhu C., Sun X.H., Liu L.J., Ai Y.X., Li Y.G., Zhao H. (2011). Tianeptine reverses stress-induced asymmetrical hippocampal volume and N-acetylaspartate loss in rats: an in vivo study. *Psychiatry research* 194(3):385-392
- Lkhagvasuren B., Oka T., Nakamura Y., Hayashi H., Sudo N., Nakamura K. (2014). Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. *Neuroscience* 272:34-57
- Lopez J.F., Chalmers D.T., Little K.Y., Watson S.J. (1998). Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biological psychiatry* 43(8):547-573
- Lucassen P.J., Fuchs E., Czéh B. (2004). Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biological psychiatry* 55(8):789-796
- Luine V., Villegas M., Martinez C., McEwen B.S. (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain research* 639(1):167-170
- Ma S., Morilak D.A. (2004). Induction of FOS expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-Kyoto rats compared to Sprague-Dawley rats. *Neuroscience* 124(4):963-972
- Macri S., Wurbel H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and behavior* 50(5):667-680
- Madrugá C., Xavier L.L., Achaval M., Sanvitto G.L., Lucion A.B. (2006). Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioural brain research* 166(2):241-246
- Magariños A.M., Deslandes A., McEwen B.S. (1999). Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* 371(2-3):113-122
- Malagié I., Deslandes A., Gardier A.M. (2000). Effects of acute and chronic tianeptine administration on serotonin outflow in rats: comparison with paroxetine by using in vivo microdialysis. *Eur J Pharmacol* 403(1-2):55-65
- Manji H.K., Lenox R.H. (2000). Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biological psychiatry* 48(6):518-530
- Manji H.K., Drevets W.C., Charney D.S. (2001). The cellular neurobiology of depression. *Nature medicine* 7(5):541-547
- Marais L., van Rensburg S.J., van Zyl J.M., Stein D.J., Daniels W.M. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience research* 61(1):106-112
- Marchant N.J., Furlong T.M., McNally G.P. (2010). Medial dorsal hypothalamus mediates the inhibition of reward seeking after extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(42):14102-14115

- Marinelli M., White F.J. (2000). Enhanced vulnerability to cocaine self-administration is associated with elevated impulse activity of midbrain dopamine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(23):8876-8885
- Markou A., Kosten T.R., Koob G.F. (1998). Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 18(3):135-174
- Matthews K., Forbes N., Reid I.C. (1995). Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiology & behavior* 57(2):241-248
- McArthur R., Borsini F. (2006). Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 84(3):436-452
- McEwen B.S. (2000). Stress, definitions and concepts of. In *Encyclopedia of Stress*, ed. G Fink, pp. 508-509. San Diego: Academic Press
- McEwen B.S., Wingfield J.C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior* 43(1):2-15
- McEwen B.S., Chattarji S. (2004). Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14 Suppl 5:S497-502
- McEwen B.S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews* 87(3):873-904
- McEwen B.S., Chattarji S., Diamond D.M., Jay T.M., Reagan L.P., Svenningsson P., Fuchs E. (2010). The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Molecular psychiatry* 15(3):237-249
- McEwen B.S., Gianaros P.J. (2011). Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annual review of medicine* 62:431-445
- Meaney M.J., Aitken D.H., Bodnoff S.R., Iny L.J., Tatarewicz J.E., Sapolsky R.M. (1985). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behavioral neuroscience* 99(4):765-770
- Meaney M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual review of neuroscience* 24:1161-1192
- Meerlo P., Horvath K.M., Nagy G.M., Bohus B., Koolhaas J.M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of neuroendocrinology* 11(12):925-933
- Mello A.F., Mello M.F., Carpenter L.L., Price L.H. (2003). Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Revista brasileira de psiquiatria* 25(4):231-238
- Milde A.M., Enger O., Murison R. (2004). The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats. *Physiology & behavior* 81(1):71-84
- Millan E.Z., Marchant N.J., McNally G.P. (2011). Extinction of drug seeking. *Behavioural brain research* 217(2):454-462
- Mizoguchi K., Ishige A., Aburada M., Tabira T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119(3):887-897
- Molina S.M., Suárez M.M., Rivarola M.A. (2006). Behavioral and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to anterodorsal thalamic nuclei lesions and variable chronic stress in maternally separated rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 24(5):319-326
- Moreau J.L., Bourson A., Jenck F., Martin J.R., Mortas P. (1994). Curative effects of the atypical antidepressant mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 19(1):51-56
- Moreau J.L., Scherschlicht R., Jenck F., Martin J.R. (1995). Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behavioural pharmacology* 6(7):682-687
- Muscat R., Willner P. (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 16(4):507-517
- Nederhof E., Schmidt M.V. (2012). Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiology & behavior* 106(5):691-700
- Nielsen C.K., Arnt J., Sanchez C. (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behavioural brain research* 107(1-2):21-33
- Nikulina E.M., Covington H.E., 3rd, Ganschow L., Hammer R.P., Jr., Miczek K.A. (2004). Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. *Neuroscience* 123(4):857-865

- Novotny V., Faltus F. (2002). Tianeptine and fluoxetine in major depression: a 6-week randomised double-blind study. *Human psychopharmacology* 17(6):299-303
- Nowacka M.M., Paul-Samojedny M., Bielecka A.M., Obuchowicz E. (2014). Chronic social instability stress enhances vulnerability of BDNF response to LPS in the limbic structures of female rats: A protective role of antidepressants. *Neuroscience research*
- O'Donnell D., Larocque S., Seckl J.R., Meaney M.J. (1994). Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid messenger RNA expression in the hippocampus of adult rats. *Brain research. Molecular brain research* 26(1-2):242-248
- O'Malley D., Dinan T.G., Cryan J.F. (2011). Neonatal maternal separation in the rat impacts on the stress responsiveness of central corticotropin-releasing factor receptors in adulthood. *Psychopharmacology* 214(1):221-229
- Ogawa T., Mikuni M., Kuroda Y., Muneoka K., Mori K.J., Takahashi K. (1994). Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 49(4):961-967
- Oglodek E., Szota A., Just M., Mos D., Araszkievicz A. (2014). The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. *Pharmacological reports : PR* 66(5):776-781
- Oreland S., Raudkivi K., Oreland L., Harro J., Arborelius L., Nylander I. (2011). Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. *Brain research* 1405:57-68
- Papp M., Lappas S., Muscat R., Willner P. (1992). Attenuation of place preference conditioning but not place aversion conditioning by chronic mild stress. *Journal of psychopharmacology* 6(3):352-356
- Papp M., Moryl E., Willner P. (1996). Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 296(2):129-136
- Park E., Kim J.Y., Lee J.H., Jahng J.W. (2014). Increased depression-like behaviors with dysfunctions in the stress axis and the reward center by free access to highly palatable food. *Neuroscience* 262:31-39
- Patel P.D., Katz M., Karssen A.M., Lyons D.M. (2008). Stress-induced changes in corticosteroid receptor expression in primate hippocampus and prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology* 33(3):360-367
- Paxinos G., Watson C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6ta ed., San Diego. Elsevier Academic Press
- Pecoraro N., Reyes F., Gomez F., Bhargava A., Dallman M.F. (2004). Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145(8):3754-3762
- Peiffer A., Veilleux S., Barden N. (1991). Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 16(6):505-515
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods* 14(3):149-167
- Phillips A.G., Vacca G., Ahn S. (2008). A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 90(2):236-249
- Pillai A.G., Anilkumar S., Chattarji S. (2012). The same antidepressant elicits contrasting patterns of synaptic changes in the amygdala vs hippocampus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37(12):2702-2711
- Plotsky P.M., Meaney M.J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain research. Molecular brain research* 18(3):195-200
- Plotsky P.M., Thiruvikraman K.V., Nemeroff C.B., Caldji C., Sharma S., Meaney M.J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30(12):2192-2204
- Przegalinski E., Budziszewska B. (1993). The effect of long-term treatment with antidepressant drugs on the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rats. *Neuroscience letters* 161(2):215-218
- Przegalinski E., Budziszewska B., Siwanowicz J., Jaworska L. (1993). The effect of repeated combined treatment with nifedipine and antidepressant drugs or electroconvulsive shock on the hippocampal corticosteroid receptors in rats. *Neuropharmacology* 32(12):1397-1400
- Reagan L.P., Hendry R.M., Reznikov L.R., Piroli G.G., Wood G.E., McEwen B.S., Grillo C.A. (2007). Tianeptine increases brain-derived neurotrophic factor expression in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol* 565(1-3):68-75
- Reid I., Forbes N., Stewart C., Matthews K. (1997). Chronic mild stress and depressive disorder: a useful new model? *Psychopharmacology* 134(4):365-367; discussion 371-367

- Renard G.M., Rivarola M.A., Suarez M.M. (2007). Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 25(6):373-379
- Renard G.M., Rivarola M.A., Suarez M.M. (2010). Gender-dependent effects of early maternal separation and variable chronic stress on vasopressinergic activity and glucocorticoid receptor expression in adult rats. *Developmental neuroscience* 32(1):71-80
- Reul J.M., de Kloet E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117(6):2505-2511
- Reznikov L.R., Grillo C.A., Piroli G.G., Pasumarthi R.K., Reagan L.P., Fadel J. (2007). Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *The European journal of neuroscience* 25(10):3109-3114
- Ridout F., Hindmarch I. (2001). Effects of tianeptine and mianserin on car driving skills. *Psychopharmacology* 154(4):356-361
- Rocher C., Spedding M., Munoz C., Jay T.M. (2004). Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cerebral cortex* 14(2):224-229
- Rosenkranz J.A., Moore H., Grace A.A. (2003). The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(35):11054-11064
- Sanders B.J., Anticevic A. (2007). Maternal separation enhances neuronal activation and cardiovascular responses to acute stress in borderline hypertensive rats. *Behavioural brain research* 183(1):25-30
- Sandi C., Merino J.J., Cordero M.I., Touyarot K., Venero C. (2001). Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience* 102(2):329-339
- Sarabdjitsingh R.A., Meijer O.C., Schaaf M.J., de Kloet E.R. (2009). Subregion-specific differences in translocation patterns of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain research* 1249:43-53
- Schlaepfer T.E., Cohen M.X., Frick C., Kosel M., Brodesser D., Axmacher N., Joe A.Y., Kreft M., Lenartz D., Sturm V. (2008). Deep brain stimulation to reward circuitry alleviates anhedonia in refractory major depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(2):368-377
- Shakesby A.C., Anwyl R., Rowan M.J. (2002). Overcoming the effects of stress on synaptic plasticity in the intact hippocampus: rapid actions of serotonergic and antidepressant agents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(9):3638-3644
- Sheline Y.I., Gado M.H., Kraemer H.C. (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *The American journal of psychiatry* 160(8):1516-1518
- Shizgal P. (1997). Neural basis of utility estimation. *Current opinion in neurobiology* 7(2):198-208
- Suárez M.M., Perassi N.I. (1994). Adrenal function response to chronic stress in rats with anterodorsal thalamic nuclei lesions. *Life sciences* 56(3):163-167
- Suárez M.M., Fiol de Cuneo M., Vincenti L., Ruiz R.D. (1996). Changes in corticosterone levels and sperm functional activity by chronic stress in rats. *Archives of physiology and biochemistry* 104(3):351-356
- Suárez M.M., Perassi N.I. (1997). Influence of anterodorsal thalamic nuclei on ACTH release under basal and stressful conditions. *Physiology & behavior* 62(2):373-377
- Suárez M.M., Paglini P., Fernández R., Enders J., Maglianesi M., Perassi N.I., Palma J. (1999). Influence of anterodorsal thalamic nuclei on the hypophyseal-adrenal axis and cardiac beta receptors in rats submitted to variable chronic stress. *Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana : organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y [de] la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia* 49(2):71-78
- Suárez M.M., Rivarola M.A., Molina S.M., Perassi N.I., Levin G.M., Cabrera R. (2001). Periodic maternal deprivation and lesion of anterodorsal thalamic nuclei induce alteration on hypophyseal-adrenal system activity in adult rats. *Life sciences* 69(7):803-813
- Suárez M.M., Molina S., Rivarola M.A., Perassi N.I. (2002). Effects of maternal deprivation on adrenal and behavioural responses in rats with anterodorsal thalamic nuclei lesions. *Life sciences* 71(10):1125-1137
- Suárez M.M., Rivarola M.A., Molina S.M., Levin G.M., Enders J., Paglini P. (2004). The role of the anterodorsal thalamic nuclei in the regulation of adrenal medullary function, beta-adrenergic cardiac receptors and anxiety responses in maternally deprived rats under stressful conditions. *Stress* 7(3):195-203
- Svenningsson P., Bateup H., Qi H., Takamiya K., Haganir R.L., Spedding M., Roth B.L., McEwen B.S., Greengard P. (2007). Involvement of AMPA receptor phosphorylation in antidepressant actions with special reference to tianeptine. *The European journal of neuroscience* 26(12):3509-3517

- Swanson L.W., Petrovich G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends in neurosciences* 21(8):323-331
- Szymanska M., Budziszewska B., Jaworska-Feil L., Basta-Kaim A., Kubera M., Leskiewicz M., Regulaska M., Lason W. (2009). The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats. *Psychoneuroendocrinology* 34(6):822-832
- Taylor C., Fricker A.D., Devi L.A., Gomes I. (2005). Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cellular signalling* 17(5):549-557
- Troakes C., Ingram C.D. (2009). Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress* 12(4):362-369
- Trujillo V., Masseroni M.L., Levin G., Suárez M.M. (2009). Tianeptine influence on plasmatic catecholamine levels and anxiety index in rats under variable chronic stress after early maternal separation. *The International journal of neuroscience* 119(8):1210-1227
- Tye K.M., Mirzabekov J.J., Warden M.R., Ferenczi E.A., Tsai H.C., Finkelstein J., Kim S.Y., Adhikari A., Thompson K.R., Andalman A.S., Gunaydin L.A., Witten I.B., Deisseroth K. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493(7433):537-541
- Valenti O., Cifelli P., Gill K.M., Grace A.A. (2011). Antipsychotic drugs rapidly induce dopamine neuron depolarization block in a developmental rat model of schizophrenia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(34):12330-12338
- Valenti O., Gill K.M., Grace A.A. (2012). Different stressors produce excitation or inhibition of mesolimbic dopamine neuron activity: response alteration by stress pre-exposure. *The European journal of neuroscience* 35(8):1312-1321
- van Haarst A.D., Oitzl M.S., de Kloet E.R. (1997). Facilitation of feedback inhibition through blockade of glucocorticoid receptors in the hippocampus. *Neurochemical research* 22(11):1323-1328
- Veenema A.H., Bredewold R., Neumann I.D. (2007). Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 32(5):437-450
- Venzala E., Garcia-Garcia A.L., Elizalde N., Delagrangé P., Tordera R.M. (2012). Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology* 224(2):313-325
- Vialou V., Robison A.J., Laplant Q.C., Covington H.E., 3rd, Dietz D.M., Ohnishi Y.N., Mouzon E., Rush A.J., 3rd, Watts E.L., Wallace D.L., Iniguez S.D., Ohnishi Y.H., Steiner M.A., Warren B.L., Krishnan V., Bolanos C.A., Neve R.L., Ghose S., Berton O., Tamminga C.A., Nestler E.J. (2010). DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nature neuroscience* 13(6):745-752
- Viau V., Sharma S., Plotsky P.M., Meaney M.J. (1993). Increased plasma ACTH responses to stress in nonhandled compared with handled rats require basal levels of corticosterone and are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(3):1097-1105
- Viltart O., Mairesse J., Darnaudery M., Louvart H., Vanbesien-Mailliot C., Catalani A., Maccari S. (2006). Prenatal stress alters Fos protein expression in hippocampus and locus coeruleus stress-related brain structures. *Psychoneuroendocrinology* 31(6):769-780
- Vivinetto A.L., Suarez M.M., Rivarola M.A. (2013). Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behavioural brain research* 240:110-118
- Vollmayr B., Henn F.A. (2003). Stress models of depression. *Clinical Neuroscience Research* 3(4-5):245-251
- Vouimba R.M., Munoz C., Diamond D.M. (2006). Differential effects of predator stress and the antidepressant tianeptine on physiological plasticity in the hippocampus and basolateral amygdala. *Stress* 9(1):29-40
- Vyas A., Mitra R., Shankaranarayana Rao B.S., Chattarji S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(15):6810-6818
- Walker A.K., Nakamura T., Byrne R.J., Naicker S., Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M. (2009). Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology* 34(10):1515-1525
- Walsh J.J., Han M.H. (2014). The heterogeneity of ventral tegmental area neurons: Projection functions in a mood-related context. *Neuroscience* 282C:101-108
- Wang S.S., Kamphuis W., Huitinga I., Zhou J.N., Swaab D.F. (2008). Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. *Molecular psychiatry* 13(8):786-799, 741
- Watanabe Y., Gould E., Daniels D.C., Cameron H., McEwen B.S. (1992). Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 222(1):157-162

- Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience* 7(8):847-854
- Weiss J.M., Goodman P.A., Losito B.G., Corrigan S., Charry J.M., Bailey W.H. (1981). Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: Relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain research reviews* 3:43
- Weiss J.M. (1997). Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology* 134(4):368-370; discussion 371-367
- Wheeler R.A., Aragona B.J., Fuhrmann K.A., Jones J.L., Day J.J., Cacciapaglia F., Wightman R.M., Carelli R.M. (2011). Cocaine cues drive opposing context-dependent shifts in reward processing and emotional state. *Biological psychiatry* 69(11):1067-1074
- Whitton P.S., Sarna G.S., O'Connell M.T., Curzon G. (1991). The effect of the novel antidepressant tianeptine on the concentration of 5-hydroxytryptamine in rat hippocampal dialysates in vivo. *Neuropharmacology* 30(1):1-4
- WHO: *The world health report* (2001). Mental Health: New understanding, new hope: *World Health Organization*, Ginebra
- Wilber A.A., Southwood C.J., Wellman C.L. (2009). Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats. *Developmental neurobiology* 69(2-3):73-87
- Willner P., Golembiowska K., Klimek V., Muscat R. (1991). Changes in mesolimbic dopamine may explain stress-induced anhedonia. *Psychobiology* 19(1):79-84
- Willner P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134(4):319-329
- Willner P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52(2):90-110
- Wise T., Cleare A.J., Herane A., Young A.H., Arnott D. (2014). Diagnostic and therapeutic utility of neuroimaging in depression: an overview. *Neuropsychiatric disease and treatment* 10:1509-1522
- Witzmann S.R., Turner J.D., Meriaux S.B., Meijer O.C., Muller C.P. (2012). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor promoter 1(7) in adult rats. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 7(11):1290-1301
- Wong M.L., Kling M.A., Munson P.J., Listwak S., Licinio J., Prolo P., Karp B., McCutcheon I.E., Geraciotti T.D., Jr., DeBellis M.D., Rice K.C., Goldstein D.S., Veldhuis J.D., Chrousos G.P., Oldfield E.H., McCann S.M., Gold P.W. (2000). Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(1):325-330
- Yau J.L., Olsson T., Morris R.G., Meaney M.J., Seckl J.R. (1995). Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* 66(3):571-581
- Young E.A., Abelson J.L., Cameron O.G. (2004). Effect of comorbid anxiety disorders on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a social stressor in major depression. *Biological psychiatry* 56(2):113-120
- Zalosnik M.I., Pollano A., Trujillo V., Suárez M.M., Durando P.E. (2014). Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: evidence for the mismatch hypothesis. *Stress* 17(5):445-450
- Zavala J.K., Fernandez A.A., Gosselink K.L. (2011). Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. *Physiology & behavior* 104(2):215-221
- Zhe D., Fang H., Yuxiu S. (2008). Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats. *Acta histochemica et cytochemica* 41(4):89-95
- Zimmerberg B., Brett M.B. (1992). Effects of early environmental experience on self-administration of amphetamine and barbitol. *Psychopharmacology* 106(4):474-478
- Zoladz P.R., Fleshner M., Diamond D.M. (2013). Differential effectiveness of tianeptine, clonidine and amitriptyline in blocking traumatic memory expression, anxiety and hypertension in an animal model of PTSD. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 44:1-16
- Zurita A., Murúa S., Molina V. (1996). An endogenous opiate mechanism seems to be involved in stress-induced anhedonia. *Eur J Pharmacol* 299(1-3):1-7