



**400** AÑOS  
UNC | Universidad  
Nacional de Córdoba

Posibles alteraciones en el sustrato neurobiológico y conductual provocadas por la separación materna temprana en un modelo animal de depresión: tratamiento con tianeptina

## TESIS DOCTORAL

*Doctorado en Neurociencias*

*Doctoranda: Antonella Pollano*

*Directora: Dra. Marta Suárez*

*Co-Directora: Dra. María Angélica Rivarola*

2018

*"Science never solves a problem without creating ten more".*

George Bernard Shaw (1856 – 1950)

## AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral es un trabajo que no sólo es fruto del esfuerzo personal del doctorando, sino que necesita de la ayuda de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal. Con estas líneas quisiera mostrar mi agradecimiento a todas ellas.

A la Dra. Marta Suárez, mi Directora y mi maestra, quien ha guiado y acompañado todo mi proceso de formación con mucha alegría, entusiasmo, prolijidad y paciencia. En el transcurso de este trabajo los aprendizajes que me brindó exceden con creces a los aspectos meramente académicos.

A la Dra. María Angélica Rivarola por su amabilidad, por todas sus enseñanzas y por su predisposición.

A la Dra. Patricia Durando, una compañera incomparable, por su bondad inmensa y sus conocimientos.

A mi pareja y compañero de vida José por facilitarme siempre todo, por ayudarme en cada paso, por alentarme y ser ese sostén incondicional. Esta tesis no podría haberse terminado sin su dosis de escucha y de humor.

A mis compañeras del laboratorio Julieta y Verónica por la paciencia y el apoyo siempre que las necesité, y por tantos mates compartidos.

A las amigas que la vida me regaló: Noelia, Lorena, Andrea, Paula, Mercedes, Aída, Belén, Brenda y Florencia, porque cada una formó parte de mi vida durante todo este proceso de realización de mi tesis, escuchándome y animándome.

A mis padres que siempre incentivaron mi capacidad creativa y el amor por el conocimiento, y a quienes les agradezco enormemente por haberme brindado el privilegio de una educación como la que tuve y disfruté. A mis hermanos Gaspar, Agustina y Matías por escucharme siempre y por alegrarse con cada etapa de este proceso.

A la gran casa de estudios que es la Universidad Nacional de Córdoba y a CONICET por permitir que esta tesis se materializara.



# TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	6
ABSTRACT.....	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Separación materna temprana.....	9
1.2 Modelo animal de depresión.....	11
1.3 Participación de neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rate en el modelo de depresión.....	15
1.4 Alteraciones volumétricas del hipocampo en el modelo de depresión.....	19
1.5 Memoria contextual en el modelo de depresión.....	23
1.6 Antidepresivo: Tianeptina.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo general.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Animales.....	31
3.2 Separación materna temprana.....	31
3.3 Condiciones post destete.....	32
3.4 Modelo de depresión - Protocolo de estrés crónico e impredecible.....	33
3.5 Antidepresivo.....	34
3.6 Inmunohistoquímica.....	34
3.6.1 Obtención de los cerebros.....	34
3.6.2 Obtención de los cortes.....	34
3.6.3 Inmunomarcación.....	35
3.6.4 Montaje.....	35
3.6.5 Visualización.....	35
3.6.6 Cuantificación.....	35
3.7 Determinación del volumen de hipocampo.....	37
3.7.1 Obtención de los cerebros.....	37
3.7.2 Obtención y tinción de los cortes.....	37
3.7.3 Técnica de Cavalieri - Estereología.....	38
3.7.4 Determinación del porcentaje de reducción del volumen de hipocampo dorsal (HD).....	39
3.8 Paradigma de condicionamiento de miedo contextual.....	39
3.9 Test de laberinto de Barnes.....	41
3.10 Método estadístico.....	42

3.10.1 Cantidad de células inmunoactivas a Fos-5HT en el NDR .....	42
3.10.2 Volumen del HD, áreas y estratos .....	43
3.10.3 Porcentaje de freezing en el paradigma de condicionamiento de miedo contextual.....	43
3.10.4 Test de laberinto de Barnes.....	44
4. RESULTADOS .....	45
4.1 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el núcleo dorsal del rafe (NDR).....	45
4.1.1 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el NDR a -5,96 mm desde el bregma. ....	46
4.1.2 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el NDR a -7,68 mm desde el bregma. ....	47
4.1.3 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el NDR a -8,04 mm desde el bregma. ....	48
4.1.4 Discusión .....	50
4.2 Volumen del hipocampo dorsal (HD), áreas y estratos.....	57
4.2.1 Volumen total del HD y de las áreas CA1, CA2/3 y GD .....	57
4.2.2 Volumen de los estratos de las áreas CA1, CA2/3 y GD .....	59
4.2.3 Discusión .....	61
4.3 Porcentaje de freezing (inmovilidad) en el test de miedo condicionado .....	68
4.3.1 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de pre-condicionamiento (habitua- ción).....	68
4.3.2 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de condicionamiento .....	68
4.3.3 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de postcondicionamiento .....	68
4.3.4 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de recuperación (evocación).....	68
4.3.1 Discusión .....	70
4.5 Efectos del estrés crónico evaluados en el Test de Barnes .....	76
4.5.1 Etapa de aprendizaje .....	76
4.5.2 Etapa de prueba.....	76
4.5.3 Discusión .....	78
5. DISCUSIÓN GENERAL .....	81
6. CONCLUSIONES FINALES.....	93
TRABAJOS PUBLICADOS VINCULADOS CON ESTA TESIS DOCTORAL.....	94
7. BIBLIOGRAFÍA .....	95

## ABREVIATURAS

5HT: Serotonina

5HT<sub>1A</sub>: Receptor de serotonina

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BNST: Núcleo del lecho de la estría terminal

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CRH<sub>1</sub>: Receptor de la hormona liberadora de corticotropina

CRH<sub>2</sub>: Receptor de la hormona liberadora de corticotropina

DPN: Día post natal

DRD: Subdivisión dorsal del núcleo dorsal del rafe

DRL: Subdivisión lateral del núcleo dorsal del rafe

DRV: Subdivisión ventral del núcleo dorsal del rafe

GR: receptores de glucocorticoides

HD: Hipocampo dorsal

HPA: Eje hipotálamo-pituitario- adrenal

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

LTP: Potenciación a largo plazo

MR: receptores de mineralocorticoides

NDR: Núcleo dorsal del rafe

NGF: Factor de crecimiento nervioso

SERT: Transportador de serotonina





## ABSTRACT

Vulnerability to emotional disorders like depression derives from interactions between early and late environments, including stressful conditions. Early maternal separation produces lasting neurobiological effects that can change the response to chronic stress during adulthood. Chronic stress strongly affects the serotonergic system, and produces dendritic retraction modifying the morphology of the dorsal hippocampus. Contextual memory depends on this structure, but the antidepressant tianeptine reverses those morphological modifications induced by stress. Therefore, we evaluated whether, the interaction between early maternal separation and chronic stress affects 1) the distribution of active serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN) through immunohistochemistry, 2) the volume of the dorsal hippocampus and its areas using stereology and 3) the hippocampal-dependent memory using a contextual fear conditioning paradigm, in rats treated with tianeptine.

Male Wistar rats were subjected to daily maternal separation for 4.5 h between postnatal days (PND) 1–21. Between PND days 50–74, rats were exposed to chronic unpredictable stress and simultaneously treated with tianeptine (10 mg/kg), providing eight groups: unstressed/vehicle, unstressed/tianeptine, chronic stress/vehicle, chronic stress/tianeptine, maternal separation-unstressed/vehicle, maternal separation-unstressed/tianeptine, maternal separation-chronic stress/vehicle, and maternal separation-chronic stress/tianeptine.

We found an interaction between the effects of maternal separation and unpredictable chronic stress on the number of 5HT active neurons of the DRN and contextual memory. The combination of these stressors produced an increase in the activation of 5HT cells compared to rats only subjected to chronic stress, reaching the same value as the controls. Similarly, when both stressors were applied, the memory of fear to the context was similar to controls, while each stress protocol separately reduced the recall of this memory. The antidepressant tianeptine produced a decrease in the volume of the dorsal hippocampus in the separated and stressed rats, compared to those only subjected to maternal separation.

When the two stressors combine, both the activation levels of 5HT neurons in the DRN and the contextual memory are similar to controls. Consequently, our data support the idea of a match in phenotype exhibited when the early and the adult environment correspond.

## RESUMEN

La vulnerabilidad a los trastornos emocionales como la depresión puede surgir a partir de la interacción entre el ambiente temprano y adulto que incluyen componentes estresantes. La separación materna temprana produce efectos neurobiológicos duraderos que pueden cambiar la respuesta al estrés crónico durante la adultez. El estrés crónico afecta fuertemente el sistema serotoninérgico, y produce retracción dendrítica modificando la morfología del hipocampo dorsal. La memoria contextual depende de esta estructura, y el antidepresivo tianeptina revierte las modificaciones morfológicas inducidas por el estrés. Por lo tanto, evaluamos si la interacción entre la separación materna temprana y el estrés crónico afecta: 1) la distribución de neuronas serotoninérgicas activas en el Núcleo Dorsal del Rafe (NDR) a través de inmunohistoquímica, 2) el volumen del hipocampo dorsal y de sus áreas empleando estereología y 3) la memoria dependiente del hipocampo mediante un paradigma de condicionamiento de miedo contextual, en ratas tratadas con tianeptina.

Se emplearon ratas Wistar macho que fueron sometidas a separación materna diariamente durante 4,5 h entre los días postnatales (DPN) 1-21. Entre los DPN 50-74 se expuso a las ratas a un protocolo de estrés crónico e impredecible y simultáneamente se las trató con tianeptina (10 mg / kg), conformando ocho grupos: sin estrés / vehículo, sin estrés/tianeptina, estrés crónico/ vehículo, estrés crónico/tianeptina, separación materna-sin estrés /vehículo, separación materna-sin estrés/tianeptina, separación materna- estrés crónico/vehículo y separación materna-estrés crónico/tianeptina.

Encontramos una interacción entre los efectos de la separación materna y el estrés crónico impredecible en el número de neuronas serotoninérgicas activas en el NDR y en la memoria de miedo contextual. La combinación de estos estresores produjo un aumento de la activación de las células serotoninérgicas en comparación con las ratas sólo sometidas a estrés crónico, alcanzando el mismo valor que las controles. De manera semejante, cuando se aplicaron ambos estresores la memoria de miedo ante el contexto fue similar a la de los controles, mientras que cada protocolo de estrés por separado redujo la evocación de esta memoria. El antidepresivo tianeptina produjo una disminución del volumen del hipocampo dorsal en las ratas separadas y estresadas, en comparación con aquellas solamente sometidas a separación materna.

Cuando los dos estresores se combinan, tanto los niveles de activación de las neuronas serotoninérgicas como la memoria contextual se asemejan a los controles. En consecuencia, nuestros datos soportan la idea de una correspondencia del fenotipo exhibido cuando el entorno temprano y el adulto coinciden.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA

En los modelos de roedores y primates, la exposición a eventos estresantes durante la edad temprana afecta la manera de enfrentar los eventos estresantes en la edad adulta (de Kloet et al., 2005). La mayor respuesta fisiológica ante las condiciones estresantes es la activación de dos sistemas neuroendocrinos: el simpato-adrenomedular y el hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), los cuales forman redes de señalización interactivas que coordinan las respuestas metabólicas y conductuales ante el estrés (de Kloet et al., 2005). En particular, la capacidad de respuesta del eje HPA puede deteriorarse interrumpiendo las interacciones madre-cría habituales, lo que puede inducir cambios persistentes en la neurobiología, la fisiología y el comportamiento emocional en los animales adultos.

Todos los mamíferos recién nacidos son atendidos por sus madres y permanecen en estrecho contacto con ellos durante un período de tiempo. Este primer período de vida implica interacciones complejas relacionadas con el cuidado y el desarrollo emocional y cognitivo de las crías. En particular, los comportamientos maternos en ratas consisten principalmente en la construcción de nidos, la colocación de los crías en el nido, los lamidos y el aseo anogenital para estimular la micción y la defecación, y períodos de lactancia asociados con la postura arqueada que facilita la succión. Durante este período postnatal, el cerebro de la rata experimenta un desarrollo neuronal profundo que incluye sinaptogénesis, neurogénesis de las células granulares del hipocampo, así como también apoptosis neuronal y desarrollo dendrítico. Por lo tanto, los primeros días dan forma a respuestas conductuales, emocionales y fisiológicas en la edad adulta (Vetulani, 2013). Por lo que la separación materna resulta en una reacción de protesta y desesperación por parte de las crías, lo que precipita la activación repetida de mediadores del estrés: los glucocorticoides y las catecolaminas (Vetulani 2013).

Basándose en el trabajo de Harlow y Zimmermann (1959) con primates y Weininger (1954) , Levine (1957, 1967)(Levine, 1966); Levine y Lewis (1959) y Denenberg et al. (1962) con ratas, se desarrollaron modelos que implican manipulaciones post-natales tempranas para evaluar la influencia de las primeras experiencias sobre ciertos fenotipos conductuales y respuestas neuroendocrinas. La separación y la privación materna se han utilizado sistemáticamente como modelos de exposición a eventos de estrés durante la vida temprana (Gutman & Nemeroff, 2002; Levine, 2005; Schmidt, 2010). Para estudiar específicamente los efectos de la separación materna, se han desarrollado varios modelos. Los detalles específicos utilizados en estos paradigmas varían mucho entre distintos grupos de investigación: desde una privación única de 24 horas hasta episodios de privación materna repetidos pero más breves que duran 12, 8, 6 o 3 horas entre el día post natal (DPN) 1 o 2 y se extienden durante el DPN 14 al 21. Además, algunos grupos separan a los crías entre sí, mientras que otros mantienen a los crías juntas como camada durante el período de separación (Gutman & Nemeroff, 2002).

El eje HPA de las ratas presenta un perfil de maduración particular conocido como el período de hiporesponsividad al estrés. El mismo se extiende desde el DPN 4 al 14 y consiste en un período de baja actividad del sistema adrenocortical y capacidad de respuesta refractaria a los factores de estrés que normalmente inducirían una fuerte respuesta en animales adultos (Faturi et al., 2010). Sin embargo, la respuesta reducida del eje HPA observada durante este período no es absoluta, y puede ser superada por factores de estrés suficientemente potentes, incluyendo la privación materna (Gutman & Nemeroff, 2002). Cuando el animal es separado de su madre en forma crónica en esta ventana temporal, puede conducir a la hiperactividad del eje HPA durante toda la vida (Nishi et al., 2014).

Cuando se evalúa durante la adultez a roedores privados o separados, estos presentan una mayor respuesta al estrés (Gutman & Nemeroff, 2002; Suárez et al., 2002) que puede inducir alteraciones persistentes a nivel neuronal (Hulshof et al., 2011; Roque et al., 2015), neuroquímico (Dela et al., 2013; Pinheiro et al., 2015) y del comportamiento (Pinheiro et al., 2015; Trujillo et al., 2015; Vivinnetto et al., 2013). De especial interés para el desarrollo de este trabajo, la separación materna produce alteraciones en el sistema serotoninérgico, tanto de sus receptores (Bravo et al., 2014; Leventopoulos et al., 2009; Vazquez et al., 2000; Vicentic et al., 2006), la actividad electrofisiológica de las neuronas serotoninérgicas en distintas regiones del cerebro (Gartside et al., 2003), como en su proteína transportadora (Lee et al., 2007; Vicentic et al., 2006). También puede influir sobre la morfología de ciertas regiones cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo y el núcleo accumbens, acortando la longitud dendrítica y la densidad de espinas (Eiland & McEwen, 2012; Monroy et al., 2010). La separación materna puede a su vez programar o condicionar el desempeño de animales adultos en tareas que involucran la memoria contextual (Diehl et al., 2014; Vivinnetto et al., 2013).

## 1.2 MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN

La depresión es una enfermedad compleja y heterogénea con una etiopatogenia que se basa en múltiples factores actuando a nivel psicológico, biológico, genético y social. Sus síntomas pueden incluir el estado de desánimo persistente, falta de interés o placer, fatiga, problemas en la concentración y la memoria, trastornos del sueño, cambios en el apetito y en el peso (Roy & Campbell, 2013). Los pacientes también pueden presentar otros síntomas a menudo contradictorios, que incluyen letargo, aislamiento social y disfunción sexual. A pesar de los avances en el diagnóstico, el reconocimiento y la categorización de la depresión, las causas subyacentes de los síntomas son poco conocidas (Haase & Brown, 2015).

Existe una gran variabilidad en la susceptibilidad de un individuo para desarrollar depresión, por lo que un intento de explicar su etiología ha sido el modelo de diátesis/estrés, que considera en forma separada la vulnerabilidad para desarrollar la enfermedad (la diátesis) y el precipitante (estrés) (Monroe & Simons, 1991). La diátesis o predisposición a la depresión puede surgir de diversas maneras y en diferentes etapas del ciclo de vida, entre las que se incluyen múltiples genes de riesgo y experiencias ocurridas a la edad temprana (Andersen, 2015; Willner et al., 2013), tal como la separación materna. La premisa básica del modelo es que el estrés es el activador de la diátesis, transformando una predisposición en psicopatología.

La exposición duradera a estresores incontrolables e impredecibles puede desencadenar el desarrollo de trastornos depresivos, si bien hay muchos casos de depresión en ausencia de estrés así como también muchas personas que están sometidas de manera crónica a factores de estrés y nunca desarrollan depresión (Kendler et al., 1999; Kessler, 1997). Teniendo en cuenta estos hallazgos, el trabajo realizado por Katz y sus colegas en roedores a principios de los ochenta demostró que la exposición a una serie de estresores severos produjo una reducción de la actividad locomotora y del consumo de sustancias altamente gratificantes como la sacarosa (Katz et al., 1981). La reducción en el consumo de sacarosa está relacionada con alteraciones en los procesos de recompensa, que constituyen las bases fundamentales de la anhedonia, uno de los síntomas principales de la depresión (American Psychiatric Association and American Psychiatric Association Task Force on DSM-IV, 2000). Con base en estos resultados, Willner y sus colegas desarrollaron un modelo de estrés crónico moderado, que consiste en exponer a los roedores a estresores en forma repetida e impredecible pero eliminando de la lista a aquellos estresores de naturaleza aversiva como el shock eléctrico (Willner, 2005). De esta manera, el modelo posee mayor sustento ético y etológico que el de Katz y sus colegas. El impacto hedónico del modelo fue la disminución de la preferencia e ingesta de sacarosa, mientras que su validez se apoya en la reversión de dicho impacto mediante antidepresivos.

Durante las dos décadas transcurridas desde el inicio de la utilización del modelo de estrés crónico variable, se ha empleado para analizar aspectos conductuales que atienden a otras facetas de la



depresión además del procesamiento hedónico y de recompensa. Por ejemplo, la exposición de los roedores al estrés crónico moderado aumenta la inmovilidad en la prueba de natación forzada y la indefensión aprendida. Al mismo tiempo, disminuye la frecuencia de los comportamientos sexuales y agresivos en machos, reduce el autocuidado y el aseo (grooming) y aumenta la latencia del sueño REM (revisado en Willner, 2005).

Además de recapitular algunas características conductuales observadas en la depresión, el modelo de estrés crónico variable e impredecible imita algunos aspectos neurobiológicos de esta patología que también responden al tratamiento con antidepresivos.

El estrés crónico desencadena respuestas fisiológicas y conductuales que tienen como objetivo restablecer la homeostasis (de Kloet et al., 2005). Los procesos que subyacen a la respuesta al estrés se han denominado colectivamente "alostasis". Si la respuesta al estrés es inadecuada o excesivamente prolongada, el costo de restablecer la homeostasis puede llegar a ser demasiado alto, condición que se denomina "carga alostática" (de Kloet et al., 2005; McEwen, 2003).

En respuesta a factores estresantes, el hipotálamo segrega la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona arginina vasopresina. Desde el núcleo paraventricular del hipotálamo, las neuronas que contienen CRH poseen proyecciones hacia los centros noradrenérgicos en el tronco encefálico y en la médula espinal. En el tronco encefálico, el locus coeruleus envía proyecciones directas a las neuronas preganglionares simpáticas en la médula espinal y a las neuronas preganglionares parasimpáticas. En general, el locus coeruleus aumenta la actividad simpática a través de la activación de receptores  $\alpha 1$  en neuronas simpáticas preganglionares y reduce la actividad parasimpática a través de la activación de receptores  $\alpha 2$  en neuronas preganglionares parasimpáticas. La activación del primero genera la liberación de noradrenalina desde las sinapsis ampliamente distribuidas en el cerebro y de adrenalina desde la médula suprarrenal. Dicha activación a su vez estimula la liberación de CRH por el hipotálamo, creando un ciclo de retroalimentación positivo. El sistema nervioso parasimpático utiliza acetilcolina como neurotransmisor. En condiciones normales, el sistema nervioso parasimpático es activado cuando la situación de estrés ya no está presente, dado que ambos sistemas autónomos se coordinan para mantener la homeostasis fisiológica. Sin embargo, en condiciones anormales en las que las situaciones de estrés persisten, el sistema nervioso simpático continúa siendo activado sin la neutralización del parasimpático. Como resultado, en situaciones crónicas, los niveles periféricos de catecolaminas aumentan y los niveles de acetilcolina pueden disminuir (Won & Kim, 2016), dando como resultado una respuesta generalizada que permite optimizar la supervivencia frente a un desafío (aumento del ritmo cardíaco, aumento de la presión arterial, aumento de la producción de glucosa hepática, etc.).

Durante la activación del eje HPA, se libera CRH del núcleo paraventricular del hipotálamo para estimular en la hipófisis la producción de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), que a su vez provoca la liberación

de glucocorticoides (cortisol en humanos o corticosterona en roedores) desde la corteza suprarrenal a la circulación sanguínea.

En el sistema nervioso central, dos receptores distintos modulan la acción de los glucocorticoides: los receptores de mineralocorticoides (MR) y los receptores de glucocorticoides (GR) (Przuntek et al.). Los glucocorticoides, cortisol y corticosterona se unen a MR y GR con una diferencia de orden de magnitud en la afinidad de unión. Esto implica que la corticosterona y cortisol se unen en el cerebro al MR con una alta afinidad resultante incluso cuando los niveles de hormonas circulantes son muy bajos. Estos mismos esteroides se unen a GR solo en cantidades adecuadas cuando su concentración ha aumentado como consecuencia del estrés (Herman et al., 2016).

El eje HPA normalmente es regulado mediante la retroalimentación negativa que ejercen los glucocorticoides sobre la hipófisis y el hipotálamo, pero la elevación crónica de las hormonas del estrés daña esta regulación, y puede conducir a su continua hiperactividad (Herman et al., 2005; Pariante & Miller, 2001). En forma paralela, en pacientes depresivos se han encontrado elevados niveles de cortisol en plasma y saliva, así como también incrementos en la secreción urinaria de cortisol libre (Roy & Campbell, 2013). Por lo tanto, la depresión y las condiciones de estrés crónico comparten sintomatología. En ambas situaciones se produce una desregulación del eje HPA asociada con hipercortisolismo y elevados niveles de ACTH (Wong et al., 2000).

En la regulación del eje HPA están implicadas estructuras que pertenecen al sistema límbico. La amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal se consideran estructuras críticas que contribuyen a la desregulación de las funciones emocionales y cognitivas. Cada una de ellas ha sido ampliamente estudiada y vinculada a los aspectos sintomáticos de la depresión. Los déficits emocionales y cognitivos que experimentan los pacientes depresivos podrían estar relacionados no solo con los niveles de actividad alterados dentro de cada región, sino también con interrelaciones anormales entre estas estructuras con otras áreas del cerebro.

La amígdala es un núcleo crucial para el procesamiento emocional de las amenazas, además de una serie de funciones relacionadas, incluidos fenómenos de excitación y atención, vigilancia, detección de novedades y de situaciones preponderantes. Está estrechamente interconectada con regiones cerebrales cognitivo-emocionales (Pessoa, 2008). El hipocampo da soporte a la formación de la memoria al proporcionar al cerebro un marco espacio-temporal dentro del cual los diversos componentes sensoriales, emocionales y cognitivos de una experiencia se unen. Este marco permite que la experiencia se almacene de tal manera que pueda recuperarse posteriormente como un recuerdo consciente (Knierim, 2015). Por último, la corteza prefrontal controla y supervisa las respuestas emocionales y vegetativas asociadas a emociones, y la activación de la reacción de alerta, a través de sus conexiones con la amígdala, el hipocampo y el núcleo accumbens (Maletic et al., 2007).



El hipocampo y la corteza prefrontal son inhibidores de la secreción del eje HPA, mientras que la amígdala está comprometida con la activación de la secreción de glucocorticoides (Herman et al., 2005). Numerosas investigaciones en roedores han demostrado que, en las dos primeras estructuras, el estrés crónico y el exceso de glucocorticoides disminuyen la plasticidad sináptica, ocasionando atrofia de procesos dendríticos e incluso causando una pérdida de volumen (McEwen et al., 2012; Sapolsky, 2015; Tata & Anderson, 2010; Vyas et al., 2002). Esta disminución también ha sido reportada en pacientes depresivos (Sheine et al., 2003). En la amígdala se observa un cuadro diferente, en donde el estrés y los glucocorticoides aumentan la plasticidad sináptica y fomentan la expansión de los procesos dendríticos (Sapolsky, 2015).

La diferencia entre el uso de un protocolo de estrés crónico e impredecible -que induce anhedonia- y la administración repetida del mismo estresor -que normalmente no conduce a dicho síntoma (Zhu et al., 2014) es la habituación de la actividad del eje HPA. En el caso del estrés impredecible, la respuesta aguda del HPA ante cada estresor permanece intacta (Radley & Sawchenko, 2015).

El sistema serotoninérgico también puede alterar la función del eje HPA a través de acciones directas a nivel hipotalámico, hipofisario y adrenal (Lowry, 2002). Una de las principales teorías neurobiológicas de la depresión se sustenta en el desbalance de monoaminas- particularmente noradrenalina y serotonina (5HT)- reportado en determinadas regiones del cerebro. De igual manera, tras protocolos de estrés crónico impredecibles, ciertos análisis espectrofotométricos y neuroquímicos informan decrementos de 5HT en algunas regiones del cerebro, como el hipocampo, la corteza y la amígdala (Ahmad et al., 2010; Gupta et al., 2014; Lin et al., 2016). La teoría monaminérgica ha sido reafirmada a través de los años mediante las acciones de los antidepresivos que funcionan corrigiendo estos desequilibrios. Consecuentemente, los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de 5HT (ISRS) atenúan la hiperactividad del eje HPA mediante la desensibilización de receptores serotoninérgicos en el hipotálamo (Arborelius et al., 1999). El modelo de estrés crónico e impredecible replica , algunas perturbaciones que se observan en la depresión clínica (Hill et al., 2012) con respecto al sistema serotoninérgico.

La revisión de los estudios que emplean el modelo de estrés crónico e impredecible sugiere que este paradigma ejerce efectos razonablemente confiables sobre las variables neurobiológicas que exhiben alteraciones coincidentes en poblaciones clínicas con trastorno depresivo mayor o en víctimas de suicidio (Hill et al., 2012). Este modelo es de gran utilidad en la medición de los parámetros que se relacionan con la fisiopatología de la depresión.

### 1.3 PARTICIPACIÓN DE NEURONAS SEROTONINÉRGICAS DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE EN EL MODELO DE DEPRESIÓN

Como se ha citado en párrafos anteriores, una de las principales teorías que intenta explicar la patogénesis de la depresión es la teoría monoaminérgica la cual establece que la depresión podría ser el resultado del decremento de la disponibilidad de neurotransmisores monoaminérgicos como la 5HT y la noradrenalina en el sistema nervioso central (Haase & Brown, 2015; Roy & Campbell, 2013). Dicha hipótesis se basa en el descubrimiento de que las drogas que incrementan la disponibilidad de estas monoaminas son antidepresivos efectivos, conduciendo al desarrollo y difusión del uso de una generación de nuevos y más efectivos ISRS y de noradrenalina. Sin embargo, pese al éxito en el entendimiento y tratamiento de la depresión desde un punto de vista centrado en las monoaminas, muchas preguntas permanecen sin contestar (Wilner et al., 2013). Por ejemplo, los ISRS no son efectivos para todos los pacientes con depresión, por lo que el bloqueo del transporte de monoaminas constituiría únicamente una parte del mecanismo terapéutico de la depresión. Hallazgos emergentes con respecto al rol de citoquinas pro-inflamatorias, cambios estructurales en ciertas regiones del cerebro, transformaciones en la plasticidad sináptica (Czeh et al., 2001; Lee & Kim, 2010; McEwen et al., 2010) y la neurogénesis (Wilner et al., 2013), han desplazado a la teoría monoaminérgica del centro de la discusión. Sin embargo, es innegable que la neurotransmisión monoaminérgica -en particular la acción de 5HT- actúa como reguladora de los estados de ánimo, y que las condiciones que perturban la conectividad de las monoaminas en el cerebro derivan en consecuencias observables en el comportamiento (Haase & Brown, 2015).

La 5HT es un neurotransmisor monoaminérgico formado por hidroxilación y posterior descarboxilación del aminoácido dietético esencial L-triptofano (Altieri et al., 2013). Se almacena en vesículas para su liberación en la hendidura sináptica, que ocurre cuando la neurona es estimulada. En las terminales nerviosas serotoninérgicas, la neurotransmisión se inicia mediante la liberación de 5HT de la neurona presináptica seguida por la difusión de 5HT en la sinapsis, donde puede unirse a receptores pre y post sinápticos (Haase 2015). Al menos 14 receptores diferentes modulan sus efectos (Altieri et al., 2013), entre ellos, se ha prestado mucha atención al subtipo 1A (5HT<sub>1A</sub>) (Altieri et al., 2013; García-García et al., 2014) dado que estudios en humanos y roedores sugieren que están implicados en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como el aprendizaje, la memoria, la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, y especialmente en la etiología y el tratamiento de trastornos del estado de ánimo y ansiedad. Los autorreceptores 5HT<sub>1A</sub> ejercen una retroalimentación inhibitoria en respuesta a la liberación local de 5HT (Altieri et al., 2013). La duración y el alcance de la neurotransmisión serotoninérgica se controla principalmente por la acción del transportador de serotonina (SERT), quien facilita la remoción de 5HT en la sinapsis, resultando en la recaptura de serotonina por la terminal pre sináptica (Figura 1).

Existen numerosos estudios que evalúan la función del sistema serotoninérgico en el desarrollo de desórdenes de ansiedad y depresión. Estudios tanto en animales como humanos muestran cómo las respuestas endócrina, autonómica y de comportamiento frente al estrés son moduladas en parte por la neurotransmisión serotoninérgica (Hale et al., 2012; Lowry, 2002; Waselus et al., 2011). Por un lado actúa regulando al eje HPA y por otro al simpato-adrenomedular, ambos convergentes a nivel de la corteza adrenal para regular la secreción de glucocorticoides.

El núcleo dorsal del rafe (NDR), ubicado a nivel del mesencéfalo, es el origen central del sistema serotoninérgico, conteniendo aproximadamente el 50% de las neuronas serotoninérgicas del cerebro de la rata. Si bien estas células están restringidas a una parte relativamente pequeña del cerebro, sus proyecciones axonales inervan prácticamente toda la estructura, incluyendo a la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, los núcleos accumbens y estriado, el proencéfalo basal, el cerebelo y la médula espinal (Figura 2) (Haase & Brown, 2015; Morrissette & Stahl, 2014). Una amplia variedad de células dentro del sistema nervioso central expresan receptores serotoninérgicos, incluyendo neuronas, astrocitos y microglia (Haase & Brown, 2015).

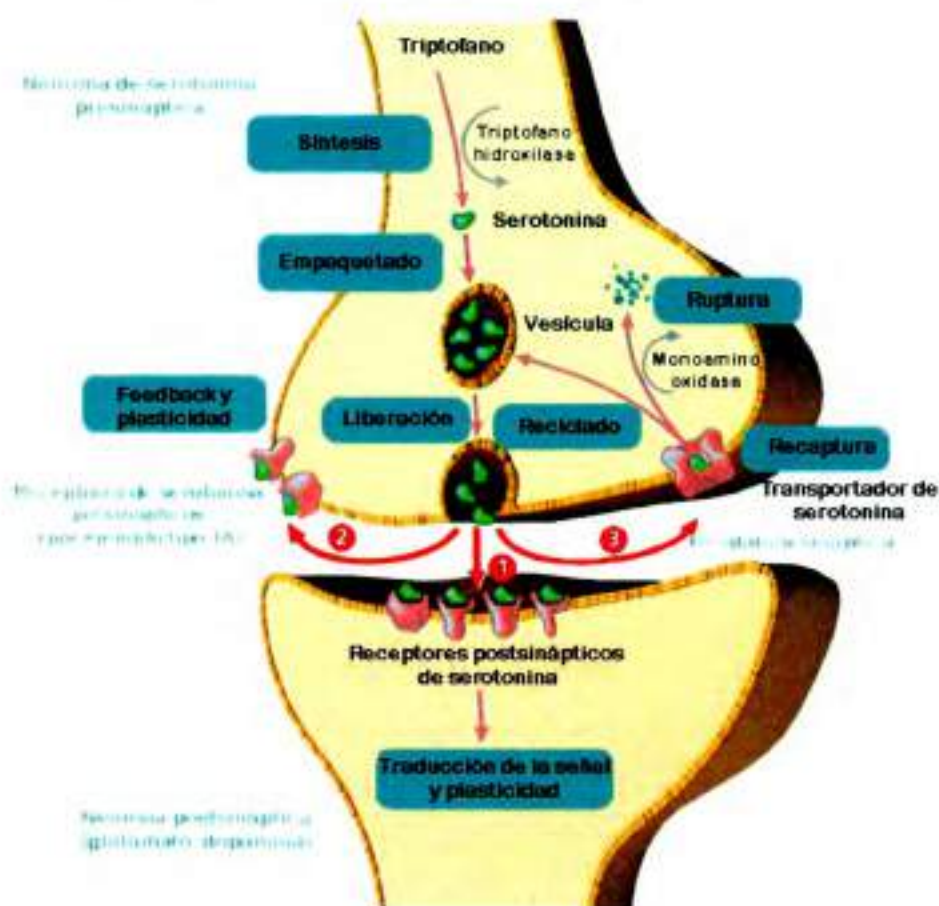


Figura 1. La 5HT se sintetiza a partir de triptófano mediante la enzima triptófano hidroxilasa y se envasa en vesículas para su liberación en la hendidura sináptica. Tras su liberación puede: (1) unirse a sus receptores en otras neuronas, (2) unirse a los receptores de 5HT pre sinápticos en la neurona a partir de la cual fue liberada, lo que proporciona su retroalimentación, (3)

recaptarse en la neurona pre sináptica por el transportador de 5HT, donde se recicla para su posterior liberación o se descompone por acción de la enzima monoamino oxidasa y se excreta en la orina.

Las neuronas serotoninérgicas están topográficamente organizadas: grupos anatómicamente distintos reciben aferencias sinápticas desde regiones específicas de estructuras cerebrales anteriores y troncales, y dan origen a eferentes anatómicamente distintos hacia estructuras anteriores y troncales (Hale et al., 2012). Los patrones de las proyecciones aferentes y eferentes están altamente organizados, lo que sugiere que hay precisión tanto en el control de la actividad neuronal de las subpoblaciones de las neuronas serotoninérgicas como de sus eferencias a estructuras del cerebro anterior y hacia circuitos localizados en el tronco encefálico. Además, neuronas serotoninérgicas individuales dan lugar a proyecciones colaterales o ramificadas a regiones diana anatómicamente distribuidas, pero funcionalmente relacionadas. Esta característica anatómica plantea la posibilidad de que los cambios en la actividad neuronal de un pequeño número de estas neuronas pueden tener importantes implicaciones para determinadas respuestas fisiológicas o de comportamiento. Así, dependiendo cuál de las regiones esté activada dentro del sistema serotoninérgico, se inhibirá o facilitará la secreción de glucocorticoides (Abrams et al., 2005; Hale et al., 2012; Lowry, 2002). Adicionalmente, estas neuronas influyen directa e indirectamente en prácticamente todos los otros sistemas neurotransmisores: el de dopamina, el de noradrenalina, el de glutamato, el de acetilcolina, el de histamina y del ácido gamma-aminobutírico (GABA), y la automodulación del sistema 5HT (Morrissette & Stahl, 2014).

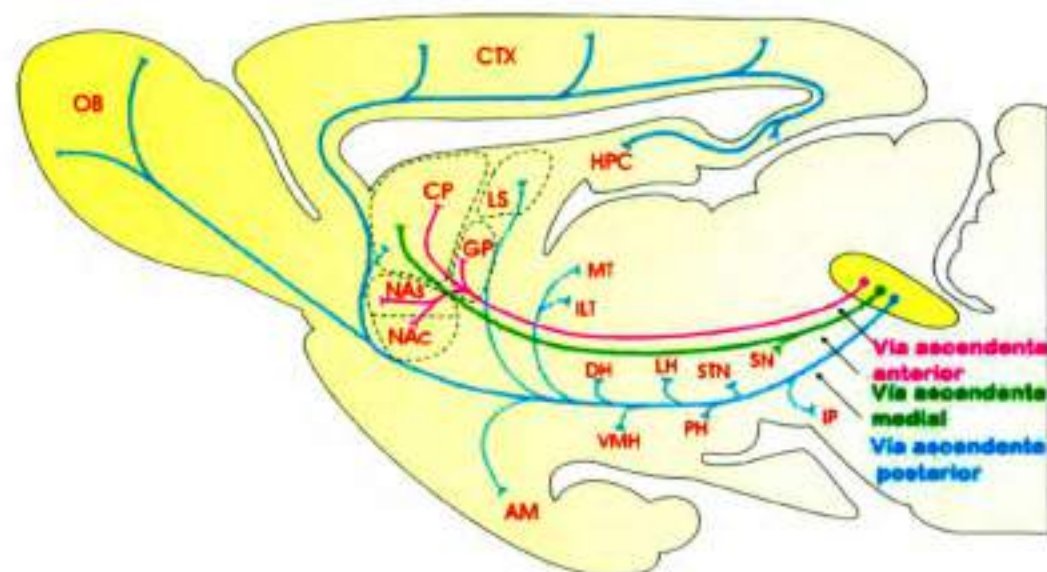


Figura 2. Vías ascendentes del NDR de la rata y sus principales targets. AM, amígdala; CP, núcleo caudado-putámen; CTX, corteza; DH, hipotálamo dorsal; GP, núcleo globus pallidus; HPC, hipocampo; ILT, núcleo intralaminar talámico; IP, núcleo interpeduncular; LH, hipotálamo lateral; LS, septum lateral; MT, núcleo talámico medial; NAc, capa profunda del núcleo accumbens; NAs, capa superficial del núcleo accumbens; SN, substantia nigra; STN, núcleo subtalámico; OB, bulbo olfatorio; PH, hipotálamo posterior; VMH, hipotálamo ventromedial.

Dado que la 5HT es el neurotransmisor más abundante dentro del NDR, esta estructura está involucrada en el control de varias funciones fisiológicas incluyendo el control motor, el apetito, los ciclos de sueño-vigilia, el comportamiento emocional y los estados emocionales, por lo que su relación con desórdenes como la depresión es estrecha (Michelsen et al., 2008). La activación de las neuronas serotoninérgicas dentro de las distintas subregiones del NDR se altera ante comportamientos relacionados con el estrés y la ansiedad, resultando en un incremento en la expresión de Fos, la proteína producto del gen marcador de actividad celular temprana cFos (Bouwknrecht et al., 2007).

Ante la exposición a estrés, diferentes grupos de neuronas en el NDR son activadas de manera diferencial, sugiriendo que regiones mediales rostrocaudales y caudales de dicho núcleo podrían regular respuestas relacionadas con la ansiedad, mientras que las regiones laterales inhibirían respuestas de pánico (Hale & Lowry, 2011).

#### 1.4 ALTERACIONES VOLUMÉTRICAS DEL HIPOCAMPO EN EL MODELO DE DEPRESIÓN

Durante la adultez y como resultado de la exposición a situaciones de estrés crónico de diversos tipos, la arquitectura del cerebro se remodela: los procesos dendríticos se expanden o retraen (dependiendo de la región cerebral) (Tata & Anderson, 2010; Vyas et al., 2002), la forma de las espinas dendríticas se modifica (Conrad et al., 2012; Maras & Baram, 2012) y se inhibe la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Czeh et al., 2001; McEwen, 1999). Estas transformaciones pueden constituir señales de una adaptación exitosa, mientras que la persistencia de estos cambios una vez finalizado el estrés puede indicar fallas en la resiliencia del individuo (McEwen et al., 2015). Las respuestas maladaptativas ante el estrés y la hipersecreción consecuente de glucocorticoides pueden inducir estados de hiperemocionalidad, disfunciones en el humor y alteraciones cognitivas en pacientes deprimidos. Esto usualmente es acompañado por cambios de volumen en varias regiones del cerebro incluyendo el hipocampo (Lucassen et al., 2014).

El hipocampo es una de las estructuras más sensibles al estrés crónico, dado que expresa ambos tipos de receptores para glucocorticoides (GR y MR) en abundancia. Junto con la corteza prefrontal, el hipocampo ejerce un control inhibitorio de las neuronas que secretan CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo en respuesta al estrés (Herman et al., 2016). Ambas regiones envían proyecciones glutamatérgicas a neuronas GABAérgicas del núcleo paraventricular que proyectan a regiones como el núcleo del lecho de la estria terminal (Wilner et al., 2013). Por el contrario, la amígdala ejerce un control excitatorio sobre el hipotálamo para estimular el eje HPA, el cual, a través de niveles incrementados de cortisol, actúa de manera positiva para estimular la amígdala (Duvarci & Pare, 2007). El mecanismo de regulación negativa ejercido por el hipocampo es crucial para limitar la actividad del eje HPA, ya que sin él, el circuito de retroalimentación positiva a través de la amígdala generaría que el sistema funcione fuera de control (Belzung & Billette de Villemeur, 2010; Herman et al., 2016). La exposición prolongada a glucocorticoides conduce inicialmente a una pérdida de receptores GR en las células granulares del hipocampo, con la consecuente desinhibición de eje HPA y el incremento de la estimulación corticosteroide (Herman et al., 2016; Wilner et al., 2013).

Como resultado de las modificaciones morfológicas causadas por el estrés crónico, el volumen del hipocampo tanto de pacientes deprimidos (Cobb et al., 2013; Shelne et al., 1996) como de animales crónicamente estresados (Liu et al., 2011) se reduce. Dicha disminución no es una acción específica del estrés crónico, dado que también se ha informado en varios otros trastornos cerebrales que incluyen esquizofrenia, demencia, enfermedades de Parkinson y Huntington, epilepsia y alcoholismo (Czeh & Lucassen, 2007). Estas reducciones constituyen uno de los hallazgos mejor replicados en la psiquiatría biológica, aunque aun no es claro cuáles son sus causas o posibles consecuencias (Lucassen et al., 2014). Tradicionalmente, los desórdenes cerebrales afectivos o relacionados con el estrés se explican en su mayoría a través de desbalances monoaminérgicos, abordados en la sección anterior. Sin embargo,

ciertos deterioros en la plasticidad estructural y alteraciones en el volumen de algunas regiones límbicas también podrían contribuir a su fisiopatología (McEwen et al., 2010). Se han propuesto diversos sustratos celulares como candidatos que explican dicha reducción: la retracción dendrítica, la pérdida neuronal o las alteraciones volumétricas en la glía, todos ellos sensibles a las acciones del estrés. Incluso las relaciones entre comportamientos relacionados al estrés y cambios en la plasticidad estructural podrían ser recíprocas. En conjunto, aun se desconoce si los sustratos arriba mencionados deberían clasificarse como patológicos o bien podrían representar adaptaciones dinámicas o plásticas ante el estrés, pudiendo hasta cierto punto ser reversibles (Lucassen et al., 2014). En efecto, un estudio realizado por Huang et al. (2013) empleando resonancia magnética funcional, encontró que el volumen del giro dentado del hipocampo fue menor en pacientes no medicados, que en pacientes tratados con antidepresivos (Huang et al., 2013). Resultados similares se hallaron en un análisis post mortem de pacientes diagnosticados con depresión (Boldrini et al., 2013).

La disminución de volumen en el hipocampo puede estar estrechamente ligada a una reducción en el volumen de neuropilo, que contiene principalmente dendritas y axones, y a una pequeña proporción de procesos gliales (Tata & Anderson, 2010). La retracción dendrítica fue observada por primera vez en neuronas de CA1 y CA3 tras la aplicación de un protocolo de estrés crónico (Donohue et al., 2006; Sousa et al., 2000). A nivel estructural, la exposición prolongada a altas dosis de corticosterona reduce la complejidad dendrítica de la zona apical en neuronas piramidales de CA3 (Woolley et al., 1990), y la exposición prolongada a varios tipos de estresores produce transformaciones similares en varias especies. Dichos cambios en la morfología dendrítica del hipocampo generalmente necesitan varias semanas para desarrollarse. El estrés crónico conduce inclusive a una pérdida de sinapsis en las fibras musgosas, incrementa la densidad del área superficial post-sináptica y produce un reacondicionamiento de mitocondrias y vesículas a nivel de los terminales pre-sinápticos. La exposición prolongada a diversos estresores y por ende a glucocorticoides puede afectar el número y la morfología de las espinas dendríticas tanto pre como post sinápticas, las cuales a su vez alteran la fortaleza de las sinapsis excitatorias en el hipocampo. La exploración de los mecanismos que subyacen a los procesos de remodelación de dendritas y sinapsis revela que ni el tamaño de la glándula adrenal ni el estrés fisiológico *per se* determinan dicha reestructuración, sino que diversos factores son capaces de modularla (McEwen, 2010). Entre estos factores se encuentran los mecanismos celulares que involucran esteroides, la elevación de niveles de glutamato a nivel sináptico, la expresión de moléculas extracelulares de adhesión, las alteraciones en la acetilación de las subunidades de microtúbulos, los factores neurotróficos y la CRH.

Sin embargo, esta reorganización del citoesqueleto, de la longitud de las dendritas y de la ramificación ocurre de manera reversible en otras situaciones distintas al estrés. A modo de ejemplo, en las especies de mamíferos que hibernan, la remodelación dendrítica es un proceso reversible y ocurre pocas horas después del comienzo de la hibernación en hámsters europeos y ardillas terrestres. Esto implica que los

cambios morfológicos posiblemente no constituyan daños sino una forma de plasticidad estructural (McEwen, 2010; McEwen et al., 2015).

Otra posible causa de la reducción dendrítica podría ser la apoptosis neuronal, aunque no es respaldada por la evidencia histológica o neuropatológica del hipocampo brindada por modelos de depresión o pacientes depresivos (Lucassen et al., 2014).

En el cerebro adulto de algunas especies de mamíferos, nuevas neuronas se originan principalmente en el giro dentado del hipocampo y, en menor medida, en los bulbos olfatorios, aunque algunas evidencias sugieren que la neurogénesis también puede ocurrir en otras áreas (Wilner et al., 2013). La hipótesis neurogénica de la depresión propone que las reducciones prolongadas en la neurogénesis, inducidas por el estrés crónico, por ejemplo, pueden afectar la estructura y el volumen del hipocampo en la depresión, y que el éxito de determinados antidepresivos consiste en revertir este efecto. Estos antidepresivos pertenecen a diferentes clases farmacológicas, incluyendo no solo a aquellos con efectos sobre las monoaminas, sino también a otros que actúan sobre ligandos glutamatergicos, o compuestos que intervienen directamente en el eje HPA como el CRF o antagonistas del receptor de vasopresina, así como también el antidepresivo tianeptina. El aumento de la neurogénesis del hipocampo también se observa después de otros tratamientos que tienen efectos similares a los antidepresivos en roedores, como el ejercicio físico (Kronenberg et al., 2003; van Praag et al., 1999), la crianza en ambientes enriquecidos, o terapias no farmacológicas como la electroconvulsión (Malberg et al., 2000) o la estimulación del nervio vago (Revesz et al., 2008). El estrés crónico afecta los niveles de varios neurotransmisores implicados en la regulación de la neurogénesis: GABA, 5HT, noradrenalina, dopamina, cannabinoides, opiáceos y óxido nítrico. A la vez, el estrés reduce la expresión de varios factores de crecimiento, como el BDNF, el factor de crecimiento similar a la insulina-1, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento epidérmico y vascular, y el factor de crecimiento endotelial, quienes pueden influir en la neurogénesis.

Las células gliales, especialmente los astrocitos, son componentes clave del "nicho neurogénico" que proporciona el microambiente local necesario para la generación de neuronas en áreas cerebrales específicas. Son compatibles con la maduración y la integración de las neuronas recién nacidas, tanto físicamente como mediante la liberación de un cóctel de factores de crecimiento y citoquinas. Los astrocitos responden al estrés crónico reorganizando su morfología celular y reduciendo la longitud, la complejidad y el volumen de sus procesos (Tynan et al., 2013). El estrés crónico puede reducir la tasa de proliferación de las células gliales (Banar & Duman, 2007) así como también puede promover la remodelación estructural de la microglía y potenciar la liberación de citoquinas proinflamatorias a partir de la microglía (Walker et al., 2013). Si bien los trabajos con muestras de hipocampo de pacientes post-mortem con depresión mayor hasta el momento no han informado reducciones significativas en el número de células neuronales o gliales (Cobb et al., 2013), reportan una menor densidad de oligodendrocitos en



el cerebro (Edgar & Sibille, 2012) y una reducción en la expresión de sus transcritos génicos. Empleando modelos animales basados en paradigmas de estrés crónico también se hallaron cambios celulares y moleculares en ciertas estructuras límbicas que indican la participación de los oligodendrocitos (Czeh & Lucassen, 2007).

El significado funcional de los cambios morfológicos depende de la región del hipocampo estudiada, dado que su conectividad extrínseca es diferente para las regiones ventral y dorsal (Moser et al., 1993; Swanson & Cowan, 1977). Existe una disociación entre los efectos de las lesiones causadas a fibras dorsales y ventrales. Las lesiones dorsales afectan el rendimiento en una amplia gama de tareas relacionadas con la memoria espacial evaluadas en ratas. En particular, dos grupos (Kim & Fanselow, 1992; Philips & LeDoux, 1992) confirmaron que las lesiones del hipocampo dorsal (HD) realizadas después del condicionamiento de tipo tono-shock eléctrico interfieren con la exhibición de comportamientos de miedo ante el contexto pero no ante el tono. En otro estudio se observó una relación casi lineal entre el volumen de las lesiones del HD y el aprendizaje de ciertas tareas espaciales (Moser et al., 1993). De hecho, las ratas sometidas a un protocolo de estrés crónico variable durante un mes tardaron más tiempo en entrenarse para el laberinto de agua de Morris y fallaron en aprender la ubicación de una nueva plataforma durante la prueba (Moser et al., 1993). Sin embargo, y como se ha puntualizado en párrafos anteriores, los efectos del estrés crónico sobre la morfología y el aprendizaje dependiente del contexto desaparecieron en el transcurso de dos semanas después del cese del régimen de estrés diario (Sousa et al., 2000), lo que sugiere que podría cumplir una función adaptativa y no constituir un perjuicio.

Por el contrario, mediante lesiones al hipocampo ventral se han encontrado reducciones en la conducta de ansiedad en una serie de pruebas incondicionadas incluyendo el laberinto en cruz elevado (Bannerman et al., 2003).

## 1.5 MEMORIA CONTEXTUAL EN EL MODELO DE DEPRESIÓN

A través de catecolaminas y glucocorticoides, el estrés ejerce múltiples efectos sobre la salud, la emoción y la cognición (de Kloet et al., 2005). Las consecuencias del estrés contribuyen al desarrollo de numerosas psicopatologías como la ansiedad, el trastorno de estrés posttraumático, la depresión, la esquizofrenia, entre otras. Uno de los factores comunes presente en estos desórdenes es la alteración de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Kim et al., 2015).

La gran mayoría de los estudios reportan que la exposición a estrés o a niveles elevados de glucocorticoides afecta el desempeño de tareas que evalúan la memoria dependiente de hipocampo (Kim & Diamond, 2002; McEwen & Sapolsky, 1995). Esta estructura es especialmente sensible a los efectos de los glucocorticoides, dado que, como ha sido mencionado, expresa la mayor cantidad de receptores para glucocorticoides dentro del cerebro de roedores y primates (Conrad, 2006). En personas diagnosticadas con trastorno de estrés post traumático y depresión se observa una alteración en diversas pruebas que valoran la memoria verbal (Bremner et al., 2000). En pacientes con síndrome de Cushing se evidencian déficits en la memoria sugiriendo un papel directo de los corticosteroides en estos procesos. De manera similar, estudios en roedores han mostrado que la exposición a estrés crónico e impredecible y las inyecciones de dosis altas de corticoides producen déficits en tareas asociadas con la memoria espacial que involucran al hipocampo (Gourand & Matuszewich, 2005; Moreira et al., 2016). También se han reportado profundos déficits en la memoria de ratones transgénicos que sobre expresan CRF (Heinrichs et al., 1996).

Las neuronas en el hipocampo responden vigorosamente a diversos tipos de estímulos, incluidas las señales no contextuales, pero son particularmente sensibles a la ubicación espacial (Maren et al., 2013). Cuando un animal se encuentra en un determinado contexto, se activan algunas neuronas en el hipocampo que responden específicamente a esa locación disparando potenciales de acción. A estas neuronas se las denominó "células de lugar" (O'Keefe, 1976). Si el animal se mueve a un nuevo contexto, otras células de lugar se activan. Cada vez que el animal regresa al sitio inicial, las mismas neuronas de lugar son activadas. Por lo tanto, a medida que el animal se mueve, emerge un patrón de activación específico que puede emplearse para reconstruir la posición del animal. A modo de ejemplo, en un estudio, los autores crearon cuatro contextos distintos combinando estímulos olfatorios y visuales dentro del mismo recinto y luego examinaron las células de lugar en el hipocampo de las ratas mientras exploraban cada contexto. Ciertas neuronas individuales exhibieron un patrón heterogéneo de re-mapeo, algunas neuronas mantuvieron su perfil de activación en todos los contextos, y otras neuronas se activaron o silenciaron conjuntamente en ciertos contextos (Anderson & Jeffery, 2003). Lo anterior sugiere que en el hipocampo se establecen interpretaciones únicas del contexto que están representadas por una población de células codificando tanto las propiedades espaciales del ambiente como la integración de los estímulos espaciales y no-espaciales del ambiente (Maren et al., 2013). De manera similar a los

otros ejemplos citados, el estrés modifica la tasa de disparo de las células de lugar en el hipocampo (Kim et al., 2007).

La potenciación a largo plazo (PLP), resultante de una breve estimulación a alta frecuencia de las fibras aferentes, produce un aumento duradero en la transmisión de las señales entre dos neuronas y fue inicialmente demostrada en el hipocampo. En diferentes regiones del hipocampo - tanto en CA1, en CA3 como en el giro dentado- se han demostrado deficiencias en las PLP asociadas al estrés (Kim et al., 2015).

La posible relación entre los cambios morfológicos producidos por el estrés crónico y la exposición a glucocorticoides en las distintas regiones del hipocampo y sus funciones ha sido estudiada por varios grupos (Conrad, 2006; Sandi, 2013; Tata & Anderson, 2010). Las reducciones en la longitud dendrítica podrían comprometer la transferencia de señales a través del HD y por lo tanto la capacidad de aprender y memorizar información. La reducción en la neurogénesis podría agravar el impacto, dado que las células granulares que nacen en el cerebro de un joven adulto contribuyen significativamente en funciones como la memoria contextual de miedo, la separación de patrones espaciales y el aprendizaje espacial (Krugers et al., 2010).

Pese a que los efectos del estrés crónico en la memoria con frecuencia se suponen perjudiciales, en algunos casos pueden favorecerla o facilitarla (Bowman et al., 2003; Conrad et al., 1999). Esto indica que las implicancias del estrés sobre la memoria dependerán de varios factores relacionados a las características del estresor o los estresores empleados, el tiempo en que se aplica el protocolo de estrés, y aspectos específicos de la memoria estudiada (Sandi, 2013).

Normalmente, cuando a un ratón o a una rata se los re expone a un entorno (un contexto) o a un tono (un estímulo condicionado) que ha sido previamente apareado a descargas eléctricas en sus miembros (un estímulo incondicionado), mostrará un patrón de comportamiento indicativo de miedo (Fanselow, 2000). Este aprendizaje asociativo pavloviano se denomina condicionamiento del miedo (Fear conditioning tasks). El condicionamiento del miedo se produce cuando el estímulo condicionado inicialmente inocuo (EC) se empareja de forma contingente con un estímulo incondicionado (EI) que activa de manera refleja respuestas de miedo (Watson & Rayner, 2000). A través de la formación de asociaciones EC-EI, el EC provocará varias respuestas condicionadas que comparten características similares a las respuestas de miedo innatas. En los estudios que emplean dichas tareas de asociación, se observa una correlación positiva entre las diversas intensidades de shock que se manipulan durante el entrenamiento y el nivel de freezing o congelamiento exhibido por los animales en la sesión de prueba (Sandi, 2013). La conducta de freezing se define como una supresión completa de la actividad locomotora espontánea y de todos los movimientos, excepto los necesarios para la respiración (Fanselow & Bolles, 1979).



En las ratas, el miedo condicionado a una señal contextual difusa, pero no a un tono discreto, se elimina cuando el HD se lesiona un día después del condicionamiento (Anagnostaras et al., 2001; Kim & Fanselow, 1992; Meren & Fanselow, 1997). Del mismo modo, las lesiones del HD previas al test bloquean selectivamente la adquisición de la memoria de miedo ante un contexto, pero no al tono (Phillips & LeDoux, 1992). La noción de que el hipocampo está involucrado en el condicionamiento de memorias de miedo se ha estudiado en ratones transgénicos/ knockout con reducción de PLP en el hipocampo. Estos exhiben déficits en el condicionamiento de miedo ante el contexto pero no ante el tono (Bourtchuladze et al., 1994; Huerta et al., 2000).

Además del hipocampo, se conoce que los efectos de los glucocorticoides y las catecolaminas sobre la memoria son mediados en parte por la amígdala (Schwabe et al., 2012), en particular por su parte basolateral. Infusiones de un agonista del receptor de glucocorticoides en la amígdala basolateral mejoran la consolidación de la memoria (Rozenaal & McGaugh, 1997) mientras que las lesiones en esta estructura o las inyecciones de un antagonista de la adrenalina bloquean los efectos de los glucocorticoides (Rozenaal & McGaugh, 1996). Si bien la amígdala está involucrada en el almacenamiento de memorias de condicionamiento de miedo (LeDoux, 1996), no es el sitio en el que se almacenan las memorias espaciales o "declarativas". Para estas formas de memoria, la amígdala actuaría como un modulador que cambia los procesos de memoria almacenadas en otras regiones del cerebro (Baddeley et al., 2000). Varios estudios muestran que puede tener un profundo efecto en el rendimiento de tareas dependientes del hipocampo. En una versión estresante del laberinto de agua (Morris water maze), la amígdala se activa; mientras que las ratas que no aprenden la versión estresante tampoco muestran esta activación (Akirav et al., 2001). En otro estudio, la estimulación de la amígdala facilita la PLP en el hipocampo (Akirav & Richter-Levin, 1999). Por lo tanto, el aprendizaje dependiente del hipocampo puede verse facilitado en gran medida por contribuciones de la amígdala (Conrad, 2006).



## 1.6 ANTIDEPRESIVO: TIANEPTINA

La reversibilidad de los cambios estructurales inducidos por el estrés en el hipocampo es especialmente alentadora para las condiciones psiquiátricas como la depresión. Si bien los individuos deprimidos muestran un volumen reducido del hipocampo (Sheline et al., 1996) y alteraciones en la memoria declarativa dependiente de hipocampo (Masic et al., 2008) estos resultados estructurales y funcionales no son permanentes: los individuos deprimidos con terapia antidepresiva muestran volúmenes de hipocampo similares a los controles no deprimidos (Sheline et al., 2003), y aquellos en remisión muestran incrementos en dicho volumen (Frodil et al., 2008). La plasticidad del hipocampo en individuos deprimidos es consistente con la literatura en roedores que investiga las estructuras dendríticas en el hipocampo y las habilidades relacionadas con la memoria espacial después del estrés crónico (Czeh & Lucassen, 2007). Estos estudios respaldan la interpretación de que el estrés crónico y la depresión pueden influir en el hipocampo de una manera lábil y altamente dinámica (Conrad, 2010).

En este contexto, y ampliando la hipótesis neuroquímica de la depresión, teorías contemporáneas sugieren que los trastornos depresivos pueden asociarse no solo con un desequilibrio de neurotransmisores y neuromoduladores sino también con un deterioro de la neuroplasticidad y la resiliencia celular, y que los antidepresivos podrían actuar normalizando este deterioro (Pittenger & Duman, 2008).

El déficit serotoninérgico en la depresión como concepto y factor explicativo es particularmente desafiado por el fármaco tianeptina (Stablon), un antidepresivo con similitudes estructurales con los agentes antidepresivos tricíclicos pero con diferentes propiedades farmacológicas (McEwen et al., 2010).

En los últimos años, el trabajo de Gassaway y colaboradores (2014) demuestra que el antidepresivo tianeptina es un agonista del receptor de opioides  $\mu$  (Gassaway et al., 2014). Cuando se desarrolló por primera vez, se pensó que era un antidepresivo tricíclico basado en su estructura química (Figura 3). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la tianeptina no inhibe la recaptación de monoaminas. Además de su estructura inusual, el primer indicio de que posee un mecanismo de acción diferente al de otras clases de antidepresivos fue el hallazgo de que, tras la administración aguda o sostenida, la tianeptina disminuía los niveles extracelulares de 5HT (Mennini et al., 1987). En ese momento, se suponía que este hallazgo era la consecuencia de un aumento de la recaptación de 5HT. Se ha demostrado que la tianeptina también reduce tanto el número de sitios transportadores de 5HT como sus niveles de ARNm en el NDR (Watanabe et al., 1993). Sin embargo, cualquier influencia facilitadora sobre la recaptación de 5HT podría ejercerse indirectamente en lugar de directamente en los transportadores de 5HT, para los cuales su afinidad es baja (Malagie et al., 2000). Investigaciones más recientes han demostrado que la administración aguda o prolongada de tianeptina no provoca alteraciones marcadas (ni aumentos ni disminuciones) sobre los niveles extracelulares de 5HT en las estructuras corticolímbicas de ratas

conscientes (Malagie et al., 2000; Pineyro et al., 1995). Teniendo en cuenta estos hallazgos en los que el papel de 5HT en el mecanismo de eficacia antidepresiva de la tianeptina no ha sido comprobado, surge la hipótesis de que sus efectos podrían ser ejercidos a través de la modulación de las vías glutamatérgicas (McEwen, 2010; Svenningsson et al., 2007). No obstante, el objetivo molecular directo de tianeptina permaneció esquivo hasta que Gassaway y colaboradores (2014) lo evaluaron probando un amplio panel de receptores cerebrales humanos, descubriendo que la tianeptina se une al receptor mu de opioides humano. Éste, es un receptor acoplado a proteína G / o, y los ensayos funcionales revelaron que la tianeptina es un agonista para la activación de la proteína G y la inhibición de la acumulación de AMPc (Gassaway et al, 2014). También se une débilmente al receptor de opioides delta humano y agoniza este receptor, aunque a concentraciones mucho más altas que en el caso del receptor mu. La tianeptina no muestra actividad agonista ni antagonista en cuanto a los receptores de opioides kappa.

La utilización de tianeptina mejora síntomas característicos de la depresión como la ansiedad y los trastornos cognitivos, y es efectiva en pacientes resistentes a la terapia con ISRS (Woo et al., 2013). Adicionalmente, el perfil de efectos secundarios que genera es mejor comparado con el uso de los ISRS y los antidepresivos tricíclicos (Gassaway et al., 2014; McEwen et al., 2010).

En estudios preclínicos, la tianeptina tiene efectos beneficiosos en una serie de modelos de comportamiento relacionados con la depresión, la ansiedad y otros trastornos relacionados con el estrés (McEwen et al., 2010; Zoladz et al., 2013). Tianeptina ha mostrado modular la transmisión glutamatérgica y sus efectos sobre la neuroplasticidad se han estudiado extensamente en el hipocampo y amígdala (McEwen et al., 2010).

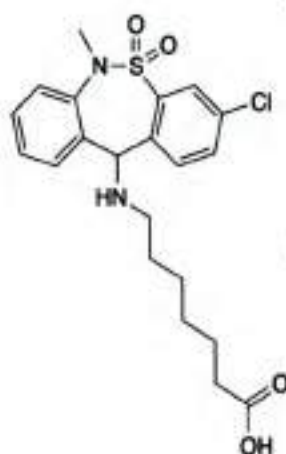


Figura 3. Estructura química del antidepresivo tianeptina.

Entre los antidepresivos, la tianeptina ha sido el más ampliamente estudiado debido al efecto protector constante contra la remodelación neuronal inducida por el estrés. Particularmente, en la capa granular del giro dentado y en la zona subgranular adyacente dentro del hipocampo, la tianeptina revierte la reducción





en la tasa de proliferación de estas células a causa del estrés crónico (Czeh et al., 2001). Por lo tanto, no solo la citogénesis, sino también la muerte celular, y por lo tanto todo el proceso de remodelación neuronal del giro dentado adulto, se afectan positivamente mediante el tratamiento con tianeptina (McEwen et al., 2010). Estos efectos no se restringen al hipocampo, ya que en la corteza temporal, el tratamiento con tianeptina muestra efectos antiapoptóticos tanto en animales estresados como controles (Lucassen et al., 2004).

Adicionalmente, la tianeptina revierte la inhibición inducida por el estrés de la PLP en las sinapsis excitatorias en el hipocampo y la corteza prefrontal (McEwen et al., 2010).

Los déficits cognitivos y de memoria reportados en pacientes con depresión pueden surgir a través de la disrupción del eje HPA mediada por la pérdida de volumen del hipocampo y las alteraciones dendríticas producidas en la amígdala. Según se ha citado, la magnitud de la reducción del hipocampo informada en ciertas condiciones experimentales puede en parte subyacer a algunos de los déficits cognitivos que acompañan a la depresión mayor, cualquier prevención o restauración de estos cambios morfológicos en el hipocampo podría acompañarse paralelamente de efectos procognitivos (McEwen et al., 2010). En consecuencia, la tianeptina tiene efectos particularmente favorables sobre las funciones cognitivas. Por ejemplo, tianeptina revirtió el deterioro en el período de adquisición de la memoria espacial evaluada en el laberinto de ocho brazos causada por estrés crónico de inmovilización, y en forma paralela impidió la atrofia en las dendritas de las neuronas en la región CA3 del hipocampo (Luhe et al., 1994).

De acuerdo con las consideraciones anteriores, los efectos de la separación materna temprana y/o del modelo de depresión podrían alterar la disponibilidad de 5-HT en el núcleo dorsal del rafe, así como producir variaciones en la morfología del hipocampo, alterando su volumen total o el de las áreas que lo componen. Estas repercusiones neurobiológicas a su vez se reflejarán conductualmente evaluando la memoria ante un contexto. No obstante, es de esperar que el uso del antidepresivo tianeptina revierta algunas de las alteraciones nerviosas y/o cognitivas favoreciendo la recuperación del estado de depresión.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETMO GENERAL

Las diferentes metodologías que se están aplicando en las investigaciones sobre estrés crónico y/o depresión, contribuirán a incrementar la información en esta área y resolver algunos de los interrogantes de los muchos que aún existen. La depresión es una patología recurrente y puede ser comorbida con otras enfermedades tales como: cardíacas, osteoporosis y obesidad abdominal. Su sintomatología se relaciona con alteraciones de la memoria y del aprendizaje, estados de ansiedad y de anhedonia entre otros. Las drogas antidepressivas comunes proveen un tratamiento efectivo de sus síntomas. La tianeptina es un antidepresivo tricíclico modificado que, a diferencia de otros, activa la recaptación de 5HT.

En este proyecto nos planteamos la siguiente hipótesis: si los cambios en el ambiente pre y postnatal ejercen fuerte influencia en el desarrollo de un organismo, en particular, eventos de la vida ocurridos durante estos dos períodos tempranos pueden tener diferentes respuestas conductuales a largo plazo. Así como la manipulación postnatal puede revertir los efectos negativos del estrés prenatal, podría también repercutir sobre las consecuencias del estrés en la vida adulta. Si bien en el primer caso con efectos positivos, puede también provocar respuestas perjudiciales a largo plazo. Por ello nos proponemos estudiar, en un modelo animal, si la separación materna temprana provoca mayor vulnerabilidad al estrés en la adultez como inductor de depresión. Dada la complejidad de la etiología de esta enfermedad, se plantea su análisis a través de las alteraciones a nivel del sustrato neurobiológico y sus consecuencias conductuales.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este proyecto nos propusimos cumplimentar los siguientes objetivos específicos:

- A. Identificar con técnicas de inmunohistoquímica, el número de neuronas inmunorreactivas a Fos-5HT en el núcleo dorsal del rafe.
- B. Determinar mediante el tratamiento con tianeptina si se revierte la posible disminución del número de neuronas inmunorreactivas a Fos -5HT en el núcleo dorsal del rafe, clásico síntoma de la depresión.
- C. Establecer mediante estereología, si se producen alteraciones en el volumen del hipocampo dorsal, considerando las áreas CA1, CA2/3 y giro dentado así como también cada uno de los estratos de las áreas mencionadas.
- D. Determinar si la administración de tianeptina corrige la posible disminución del volumen de hipocampo, sus áreas y estratos.

- E. Correlacionar los posibles cambios morfológicos del hipocampo dorsal con el déficit de memoria contextual.
- F. Evaluar si el antidepresivo objeto de estudio mejora los posibles deterioros sobre el volumen del hipocampo dorsal y, en consecuencia, restablece los procesos de memoria contextual.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ANIMALES

Todos los experimentos empleados en el presente proyecto respetan los principios y condiciones éticas, legales y jurídicas establecidas por las normas de Bioética Nacionales e Internacionales para el cuidado y uso de animales en investigación. Contaron además con la aprobación del CICUAL de la Facultad de Ciencias, Exactas, Físicas y Naturales Resol.571-HCD-2014, Acta 8/2015.

Se utilizaron 110 ratas macho derivadas de la cepa Wistar (peso final: 270 -330 g), provenientes de 50 camadas diferentes. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales constantes de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y ciclo luz - oscuridad de 12 h (encendido de las luces a las 7:00 h). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida.

#### 3.2 SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA

Inicialmente, dos ratas hembras no emparentadas se colocaron en presencia de un macho no emparentado y sexualmente activo, permaneciendo en la misma caja hasta que fueron notorias las señales físicas de preñez, tales como la presencia de espermatozoides en el canal vaginal. Luego el macho fue removido y las hembras fueron ubicadas en una caja de polietileno (dimensiones 45x30x20 cm) hasta el día de gestación número 15 en el cual fueron separadas en dos cajas diferentes. Las hembras preñadas fueron divididas entre dos grupos: con crías o separadas de sus crías. El día de nacimiento fue designado como el día post natal 1 (DPN). Ese mismo día, las camadas fueron reducidas, de un promedio de 14 crías en total, a 10 crías (4-5 hembras, 5-6 machos).

El protocolo de separación materna se basó en un protocolo estandarizado (Ogawa et al., 1994). En las camadas sometidas a separación, las crías fueron separadas 4,5 hs por día durante 21 días (Figura 4). La separación consistió en remover a la madre de la caja de origen y ubicarla en una caja aparte, pero en la misma habitación que las crías, que permanecieron juntas en la misma caja. Transcurridas las 4,5 hs, la madre retornó a la caja de origen.

Las separaciones se efectuaron entre las 9:00 hs y las 13:30 hs cada día. En los grupos criados con la madre, las crías permanecieron sin disturbios con sus respectivas madres hasta la edad de destete el DPN 22, excepto los días en que se realizó la limpieza del bioterio dos veces a la semana.





Figura 4. Línea de tiempo de los protocolos y tratamientos efectuados a los animales.

### 3.3 CONDICIONES POST DESTETE

Desde el DPN 22 hasta el 49, las crías macho fueron agrupadas en cajas estándar en grupos de a cuatro. Durante esa etapa fueron manipulados por el mismo investigador para minimizar reacciones que pudieran surgir ante la aplicación de los distintos tratamientos. Al DPN 49, las ratas de las dos condiciones (separados de la madre o criados con ella) fueron aleatoriamente divididas en cuatro tratamientos: criadas con la madre y tratadas con vehículo o tianeptina, y separadas de la madre tratados con vehículo o tianeptina, sometidas a estrés crónico e impredecible, resultando en ocho grupos experimentales:

- [1] Criadas con la madre-vehículo (Animales criados en el laboratorio en condiciones estándar)
- [2] Criadas con la madre- tianeptina
- [3] Criadas con la madre-con estrés-vehículo
- [4] Criadas con la madre-con estrés-tianeptina
- [5] Separadas de la madre- vehículo
- [6] Separadas de la madre- tianeptina
- [7] Separadas de la madre-con estrés-vehículo
- [8] Separadas de la madre-con estrés-tianeptina

A los fines de controlar el efecto camada, cada grupo experimental se conformó con ratas de diferentes camadas (una rata por camada por condición). Los animales fueron alojados en cajas de a cuatro hasta el fin del período experimental.

De lo anterior se concluye que el diseño experimental utilizado fue factorial (2 X 2 X 2), teniendo como factores: *separación materna* (sin separación materna o con separación materna), *estrés crónico* (sin estrés crónico o con estrés crónico) y *droga* (vehículo o tianeptina).



## 3.4 MODELO DE DEPRESIÓN – PROTOCOLO DE ESTRÉS CRÓNICO E IMPREDECIBLE

En el DPN 50, las ratas de los grupos crónicamente estresados fueron expuestas a un protocolo de estrés crónico, aleatorio e impredecible, en el cual el estresor varía en tipo, intensidad y duración. El mismo se aplicó durante 24 días (desde el DPN 50 hasta el DPN 74) (Figura 4; Tabla 1) y consistió en los siguientes estresores aplicados de a uno por día: ruido durante 4 hs producido por una alarma (85 dB; 2.5 Hz); anestesia etérea hasta pérdida de reflejos; dos inyecciones de solución isotónica (CINa 0.9%) con un intervalo de 4hs; privación de alimento por 24 hs e inmovilización por 1 h en cilindros metálicos de 6 cm de diámetro. Para maximizar la impredecibilidad, los estresores fueron aplicados en un orden aleatorio y en horarios distintos durante la fase de luz, excepto el día 24 en el cual el estresor empleado fue el ruido.

Aquellos grupos no estresados no fueron sometidos a estrés alguno y permanecieron en sus cajas hasta que se les realizó el test de miedo condicionado.

Tabla 1. Estresores empleados en el protocolo de estrés crónico e impredecible.

Día	Estresor	Hora
1	Anestesia etérea	16:30 h
2	Inyecciones de solución isotónica (2)	10:00 and 14:00 h
3	Inmovilización	11:30–12:30 h
4	Ruido	12:00–16:00 h
5	Privación de alimento	24 h
6	Descanso	-
7	Anestesia etérea	12:00 h
8	Ruido	13:00–17:00 h
9	Inmovilización	8:30–9:30 h
10	Anestesia etérea	16:30 h
11	Ruido	10:00–14:00 h
12	Privación de alimento	24 h
13	Descanso	-
14	Inmovilización	11:30–12:30 h
15	Ruido	13:00–17:00 h
16	Inyecciones de solución isotónica (2)	9:30 and 13:30 h
17	Anestesia etérea	15:00 h
18	Ruido	8:30–12:30h
19	Privación de alimento	24 h
20	Descanso	-
21	Anestesia etérea	12:00 h
22	Inyecciones de solución isotónica (2)	10:00 and 14:00 h

23	Immobilización	16:00–17:00 h
24	Ruido	8:00–12:00 h

### 3.5 ANTIDEPRESIVO

La tianeptina (Servier), se inyectó diariamente a las 12hs, vía intraperitoneal, en una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal. El vehículo, solución salina isotónica, se le administró de la misma manera a los grupos correspondientes. Este tratamiento se realizó simultáneamente con el protocolo de estrés, de manera que a todos los animales se les inyectó vehículo o tianeptina según el grupo al cual fue asignado, a partir del día 50 PN y hasta el día 74 PN.

### 3.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

#### 3.6.1 Obtención de los cerebros

El sacrificio de los animales y su perfusión para determinar la actividad neuronal (mediante Fos) y la inmunoreactividad a serotonina (5HT) se llevó a cabo a los 77 días de vida (Figura 4), posterior al test de memoria contextual empleado, entre las 9 y las 13 h. Para ello las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral al 6% (0,54g /Kg ip). Posteriormente se les canuló la aorta ascendente transcárdialmente con una aguja conectada a una bomba de perfusión. Se dejaron pasar 60 ml de solución salina con el fin de reemplazar la sangre, para luego pasar 150 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M con 0,2% de solución saturada de ácido pícrico en etanol). Seguidamente se procedió a la extracción de los cerebros los cuales fueron sumergirlos en solución fijadora durante 24 h y al día siguiente traspasados a una solución de sacarosa al 20% en PB 0,1 M a 4°C para su conservación hasta el momento del seccionado.

#### 3.6.2 Obtención de los cortes

Se realizaron cortes coronales de 40 $\mu$  con un micrótopo de congelación, seleccionando y recogiendo con la guía de un atlas (Paxinos & Watson, 2007), los cortes que contuvieron la estructura de interés. Estos cortes fueron almacenados en solución conservadora (200ml de glicerol, 240 ml de etilenglicol, 400ml PB 0,1 M) a -20°C en una placa multiwell hasta el momento de la técnica de inmunohistoquímica.



### 3.6.3 Inmunomarcación

Una vez obtenidas las secciones de los cerebros de los animales se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena, sumergiendo los cortes flotantes (free floating) en una solución de metanol al 10% y  $H_2O_2$  al 10%. El bloqueo de las uniones inespecíficas se efectuó con 10% de suero normal de caballo (NHS) en PB 0,1 M. Las secciones fueron incubadas a temperatura ambiente durante toda la noche con el anticuerpo Anti-c-Fos (Oncogen Science; 1:10000). Luego se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-rabbit de Jackson; 1:500). La reacción fue revelada empleando el Complejo Avidin-Biotin-Peroxidasa (Vector), utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) intensificada como cromógeno. Esta reacción se intensificó además agregando cloruro de cobalto y sulfato de níquel al medio de revelado, lo cual dio al producto de reacción nuclear un color violeta oscuro, diferente del característico marrón de la peroxidasa. Luego las secciones se incubaron a 4°C y durante 48 horas con el anticuerpo primario: anti-5HT (1:10000). Posteriormente se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario (anti-rabbit de Jackson; 1:500). Finalmente la reacción se amplificó y tiñó gracias al empleo del Complejo Avidin-Biotin-Peroxidasa (Vector), utilizando DAB como cromógeno. La Figura 5 muestra una fotomicrografía esquemática del núcleo dorsal del rafe (NDR) que corresponde al nivel -8,04 mm desde el bregma.

### 3.6.4 Montaje

Las secciones con inmunomarcación Fos-5HT se montaron utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/Alcohol 80%), y fueron secadas a temperatura ambiente, desengrasadas con Xileno durante 1,5 h y cubiertas con medio de montaje DPX (Fluka, Buchs, Suiza).

### 3.6.5 Visualización

La visualización microscópica del tejido permitió, en primera instancia, analizar el patrón espacial de la inmunomarca, que luego fue analizado empleando un sistema de videomicroscopía. Las imágenes fueron capturadas por medio de una cámara de vídeo de alta resolución (Olympus) acoplada a un microscopio de campo claro (Olympus BX41) utilizando una magnificación de 400x (40x del objetivo x 10x del ocular). Luego fueron enviadas a una computadora dotada de un programa digitalizador y cuantificador de imágenes (Image J, Image Processing and Analysis in Java).

### 3.6.6 Cuantificación

El área de interés fue delimitada siguiendo el atlas de Paxinos (2007). Se realizó el conteo de neuronas positivas tanto para c-Fos como para 5HT en el núcleo dorsal del rafe a tres niveles desde el bregma: -6,96 mm; -7,68 mm y -8,04 mm (Figura 5). Adicionalmente, en el nivel -8,04mm, se contabilizó la cantidad de células inmunorreactivas a Fos-5HT de cada subdivisión del núcleo: núcleo dorsal del rafe

dorsal (DRD), núcleo dorsal del rafe ventral (DRV) y núcleo dorsal del rafe lateral (DRL) (Figura 6). Mediante la utilización del programa Image J, se calculó el área en  $\text{mm}^2$  de cada una de las subregiones de este nivel, y se calculó el número de neuronas inmunorreactivas a Fos-5HT por  $\text{mm}^2$  de área.

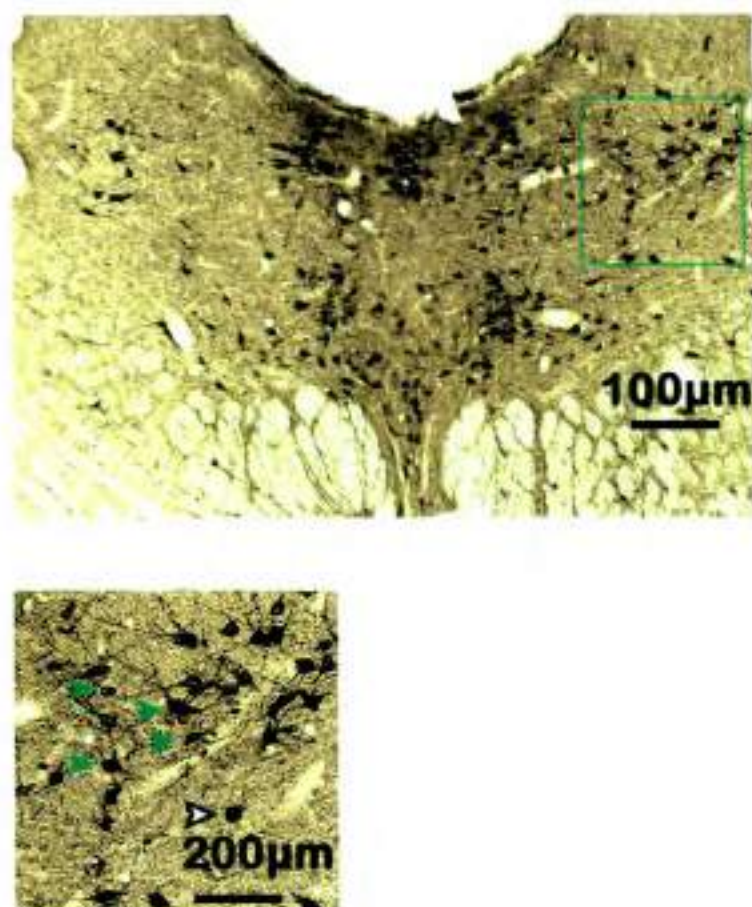


Figura 5. Fotomicrografía representativa de la inmunoreactividad Fos-5HT del NDR a  $-8,04$  mm desde el bregma. El área cuadrada indica la región que se muestra a una mayor magnificación debajo. La flecha blanca indica una célula 5HT marcada y las flechas verdes indican la doble marcación Fos-5HT.



Figura 6. Subdivisiones del núcleo dorsal del rafe. (A) A  $-6,96$  mm desde el bregma (B) A  $-7,68$  mm desde el bregma y (C) A  $-8,04$  mm desde el bregma. Aq, acueducto; DRD, núcleo dorsal del rafe dorsal; DRL, núcleo dorsal del rafe lateral; DRV, núcleo dorsal del rafe ventral.

### 3.7 DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE HIPOCAMPO

A fin de establecer si los tratamientos aplicados generaron variaciones en el volumen total del hipocampo dorsal (HD) y/o de alguna de sus áreas, se utilizó la técnica estereológica en base al principio de Cavalieri (Gundersen et al., 1988). La estereología es una herramienta matemática que permite calcular parámetros tridimensionales de una estructura irregular a partir de información obtenida en dos planos (Gundersen et al., 1988).

#### 3.7.1 Obtención de los cerebros

Al igual que fue descrito para la determinación de la inmunomarcación, el sacrificio de los animales y su perfusión para determinar el volumen del hipocampo se llevó a cabo a los 77 días de vida (Figura 4), 24 hs después del test de memoria contextual empleado, entre las 9 y las 13 h. Para ello las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral al 6% (0,54g /Kg ip). Posteriormente se canuló la aorta ascendente transcárdialmente con una aguja conectada a una bomba de perfusión, que permitió el pasaje de 60 ml de solución salina con el fin de reemplazar la sangre, para luego infundir 150 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M con 0,2% de solución saturada de ácido picrico en etanol). Seguidamente se procedió a la extracción de los cerebros los cuales fueron sumergidos en solución fijadora durante 24 h y al día siguiente traspasados a una solución de sucrosa al 20% en PB 0,1 M a 4°C para su conservación hasta el momento del seccionado.

#### 3.7.2 Obtención y tinción de los cortes

Se realizaron cortes coronales de 40 $\mu$  con un micrótopo de congelación, seleccionando y recogiendo con la guía de un atlas (Paxinos & Watson, 2007) los cortes que contuvieron el HD. El primer corte se estableció a la altura del Bregma = -1,72 mm (Paxinos & Watson, 2007). La aparición del primer indicio de hipocampo ventral (a la altura del Bregma = -3,84 mm) se tomó como criterio para establecer el extremo caudal del HD (Stomianka & West, 2005). Los cortes se ordenaron secuencialmente en cinco series conforme lo establecido por Gundersen & Jensen (1987). La selección de la serie de cortes a analizar se realizó al azar. Estos cortes fueron almacenados en solución conservadora (200ml de glicerol, 240 ml de etilenglicol, 400ml PB 0,1 M) a -20°C en una placa multiwell hasta el momento de la técnica de inmunohistoquímica.

Los cortes se tiñeron mediante tinción de Nissl y se fotografiaron con un microscopio Olympus BX 41 (a 100x). Las imágenes digitales se procesaron mediante el programa Image J (Image Processing and Analysis in Java). El volumen total del HD, de cada una de sus áreas y de los estratos en cada una de ellas se calculó siguiendo a Sousa et al. (1998). Sobre cada fotografía se colocó digitalmente una grilla de



puntos separados a una distancia constante de 150  $\mu\text{m}$  y se contó el número de puntos que se encontraban en cada área (Figura 7).

El cálculo del volumen se realizó contando el número de puntos ubicados dentro de un área y la distancia existente entre las secciones seleccionadas (Figura 7).

### 3.7.3 Técnica de Cavalieri – Estereociología

Principio de Cavalieri. El volumen de cada región del HD se obtuvo como el producto entre: el valor T (que se obtiene multiplicando el número total de cortes por la distancia entre ellos) y el valor  $A_i$ , que representa el área de cada región hipocámpal. Este valor es el producto entre el cuadrado de la distancia entre los puntos de la grilla ( $d^2$ ) y la sumatoria de los puntos incluidos en cada área delimitada ( $\sum P$ ) (Figura 7).

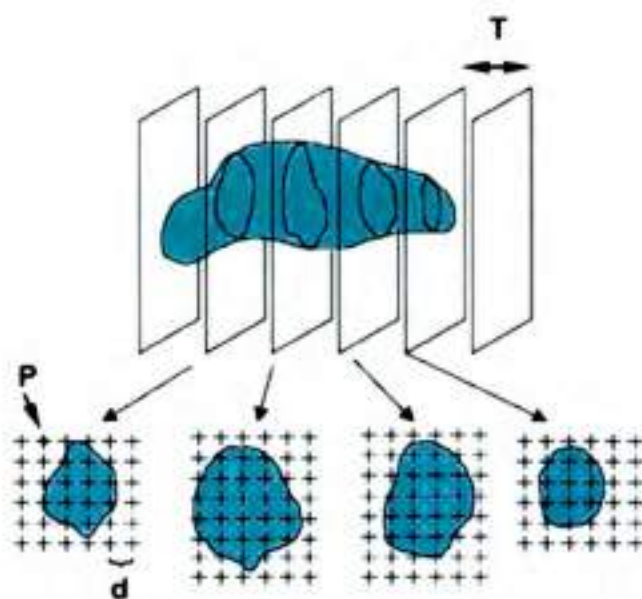


Figura 7. Representación esquemática de la técnica de Cavalieri.

$$T = \sum \text{cantidad de cortes} \cdot t$$

$$\text{Volumen}_i = T \cdot \sum A_i$$

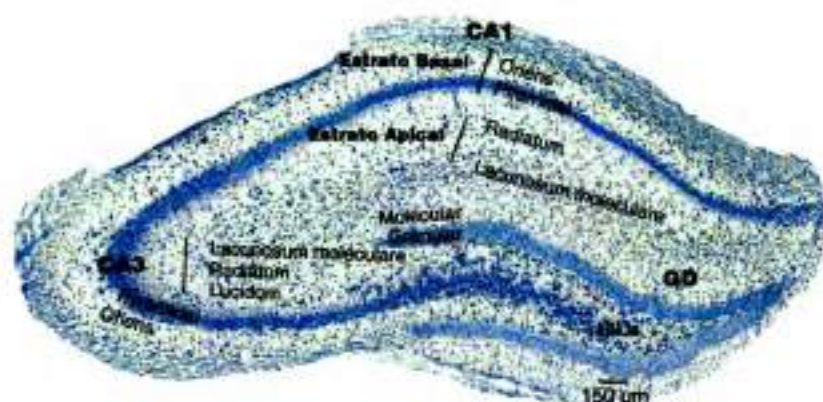
$$A_i = \sum P \cdot d^2$$

Para cada animal se analizaron entre 9 y 11 fotografías, las cuales incluyeron al HD. Se consideró al área CA2 como integrante del área CA3 debido a que los límites entre ambas no se distinguen claramente en cortes teñidos con Nissl (Hosseini-Sharifabad & Nyengaard, 2007; Tata & Anderson, 2010). Para CA1 y CA2/3, se midieron los volúmenes de las capas celulares piramidales. Las dendritas apicales de las células piramidales que proyectan hacia el estratum lucidum, radiatum y lacunosum moleculare fueron





consideradas como estratos apicales, mientras que las dendritas que proyectan hacia el stratum oriens fueron considerados como estratos basales (Tata & Anderson, 2010) (Figura 8). Así, los volúmenes medidos fueron: del HD total; de las áreas CA1, CA2/3 y giro dentado; de los estratos apicales, piramidales y basales de CA1 y CA2/3; de los estratos granular, molecular y polimórfico del giro dentado (Figura 8).



**Figura 8.** Citoarquitectura del hipocampo dorsal (HD). Microfotografía coronal que muestra sus áreas y estratos. Las áreas CA contienen estratos de células piramidales, con su región apical (que incluye las capas stratum lucidum, radiatum, and lacunosum-moleculare), y su región basal (que incluye la capa stratum oriens). En el giro dentado (GD) se identifican los estratos granular, molecular, y polimórfico.

A fin de poder reproducir los resultados obtenidos mediante esta técnica se calculó, para cada animal, el coeficiente de variación conforme lo establecido por Slomianka y West (2005). En todos los casos dicho coeficiente arrojó valores menores a 0.5 (Slomianka y West, 2005).

#### 3.7.4 Determinación del porcentaje de reducción del volumen de hipocampo dorsal (HD)

El porcentaje de disminución del volumen de HD-calculado previamente mediante estereología- fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = (\text{volumen tras aplicación del estrés crónico e impredecible} - \text{volumen de los controles}) / \text{volumen de los controles} \times 100$$

### 3.8 PARADIGMA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO CONTEXTUAL

A las 24 h de aplicado el último estresor, al DPN 75, todos los animales fueron sometidos al condicionamiento para analizar las repercusiones de los tratamientos efectuados sobre la memoria contextual relacionada con el HD.

El test se basa en el condicionamiento de un animal por medio de estímulos aversivos aplicados en un contexto nuevo. Cuando el animal retorna al mismo contexto, lo asocia con el estímulo aversivo, y



produce como respuesta una conducta de "congelamiento" o freezing. Dicho comportamiento se caracteriza por la ausencia total de movimientos, exceptuando los respiratorios (Bustos et al., 2009). El tiempo que el animal permanece en freezing es considerado como un índice del aprendizaje al contexto.

El test se realizó entre las 9 y las 12 hs en un ambiente diferente al de crianza. Para el mismo se utilizó como cámara una caja rectangular (25x25x50 cm) con paredes de acrílico transparente y piso de barras metálicas de acero a través de las cuales se administraron, a cada animal, descargas eléctricas. Dichas descargas proporcionan el estímulo aversivo que es asociado posteriormente por el animal ante la exposición al mismo contexto.

El primer día constituye el entrenamiento (fase de adquisición de la memoria) que consta de tres etapas. Las mismas tienen lugar una a continuación de la otra. En la etapa de pre-condicionamiento (habitación) se dejó al animal en la cámara -durante 3 minutos- a fin de que pudiera explorar libremente y formarse una representación hipocampal del contexto (Rudy et al., 2002). A continuación, durante la etapa de condicionamiento se le aplicaron 4 shocks eléctricos (de 0,41 mA de intensidad y 2 segundos de duración), separados por intervalos de 64 segundos. Finalmente, durante la etapa de postcondicionamiento se dejó al animal en la cámara -durante 3 minutos- sin aplicarle shocks (Figura 9).

A las 24 h, se evaluó la memoria a largo plazo durante la etapa de recuperación (evocación de la memoria contextual) colocando al animal durante 8 minutos en la caja bajo el mismo contexto que el día anterior, en ausencia del shock.

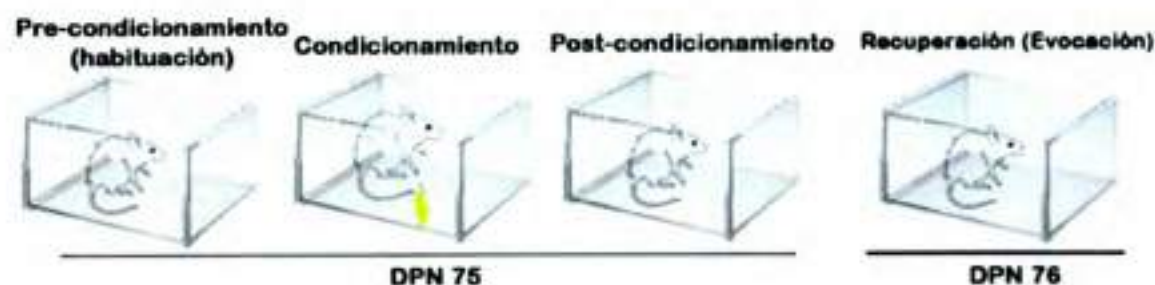


Figura 9. Esquema del paradigma de condicionamiento de miedo contextual empleado.

El DPN 75 se contabilizó el porcentaje de freezing ante el contexto durante la habituación, el condicionamiento (descartando los primeros 10 segundos inmediatos al shock de respuesta incondicionada al estímulo eléctrico) y el postcondicionamiento. El DPN 76 se contabilizó el porcentaje de freezing durante la etapa de recuperación. Las mediciones de los tiempos de freezing se realizaron entre las 9 y las 12 h y fueron efectuadas por un operador que desconocía los tratamientos de cada rata.



## 3.9 TEST DE LABERINTO DE BARNES

Para realizar este experimento se empleó un grupo de animales controles (Criados con la madre, sin estrés crónico) ( $n=7$ ) y un grupo de animales sometidos a estrés crónico e impredecible en la adultez ( $n=8$ ), los cuales fueron sometidos al test de Barnes Maze como método alternativo para evaluar la adquisición y la recuperación de la memoria contextual dependiente de hipocampo. Dicho test fue realizado a las 24 h de aplicado el último estresor, en el DPN 75, y consistió de dos etapas: la etapa de adquisición espacial que se llevó a cabo durante cuatro días, y la etapa de prueba (memoria de referencia espacial) que se realizó el quinto día. El test consistió en colocar a los animales en una plataforma circular (122 cm de diámetro) con 18 orificios equidistantes (9,5 cm de diámetro, espaciados con un ángulo de 20 grados) situados a lo largo del perímetro y elevada 113 cm por encima del suelo (Figura 10). La plataforma fue posicionada en una habitación iluminada, por lo que los animales recibieron un reforzamiento al escapar de la plataforma abierta hacia una cámara oscura (caja de 12 cm de ancho, 12 cm de largo y 29,5 cm de profundidad) localizada debajo de uno de los orificios denominado "orificio de escape" (caja de descenso). Desde el centro del laberinto todos los orificios se observan iguales, sólo uno de ellos contiene la cámara oscura y los demás constituyen "cajas falsas" en donde el animal no puede ingresar. En la habitación se colocaron claves visuales distales a la plataforma que se mantuvieron durante todo el test (Figura 10) (Harrison et al., 2006).

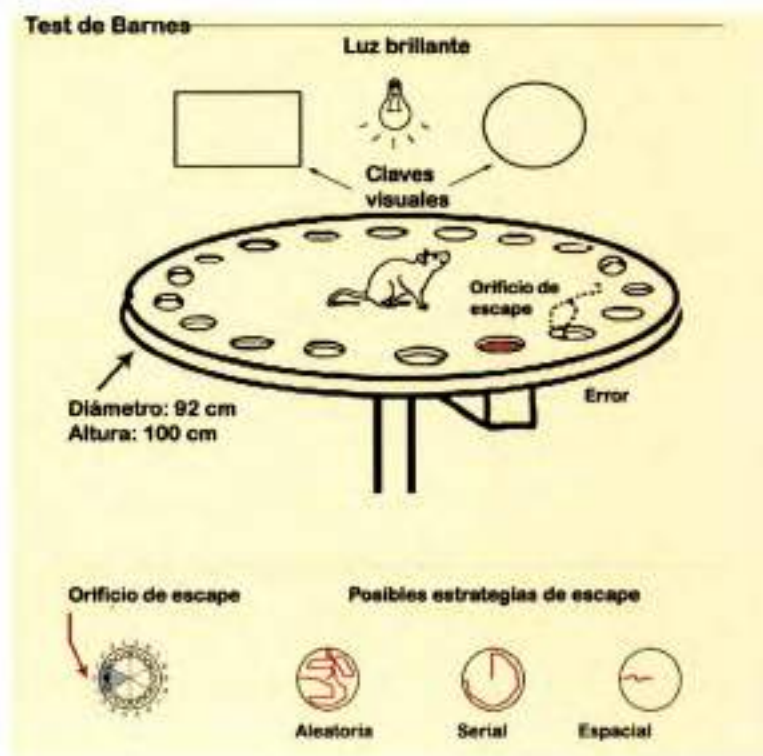


Figura 10. Esquema del Test de Barnes empleado.

Durante la etapa de adquisición espacial se permitió al animal explorar el laberinto, partiendo desde el centro en donde se lo ubicó debajo de un cilindro de acrílico (19 cm de diámetro, 37 cm de altura) durante 10 s. La primera sesión terminó cuando el animal ingresó a la caja de descenso, y cuando no logró hacerlo en los 3 primeros minutos, se lo dirigió hacia la misma e introdujo. Las ratas fueron sometidas a 4 pruebas por día con un intervalo entre-prueba de 15 minutos, evaluándose los siguientes parámetros: tiempo de latencia al orificio de escape y cantidad de errores cometidos (cuando el animal "se asoma" a orificios equivocados). Se consideró como aciertos cuando el animal ingresó completamente al orificio de escape. Una vez dentro del mismo, se les permitió a los animales permanecer en él durante 60 s. Entre cada prueba se limpió al laberinto y la caja de descenso a fin de remover heces, orina y cualquier clave olfativa con alcohol al 70%. A su vez, se rotó el laberinto respetando la posición inicial del orificio de escape para prevenir que los animales pudieran guiarse a través de claves olfativas para resolver la tarea.

En el quinto día se efectuó la prueba de referencia espacial. En esta oportunidad, debajo del orificio de escape se situó una "caja falsa" que permitió a los animales explorar la plataforma durante 90 s. La prueba se realizó con el objetivo de determinar si el animal recuerda dónde estaba localizado el orificio de escape, por lo que se evaluaron los siguientes parámetros: tiempo de latencia al primer orificio, tiempo de latencia al orificio de escape, cantidad de intentos y la técnica o estrategia utilizada para encontrar el orificio de escape. La estrategia de escape se considera *aleatoria* cuando el animal recorre la plataforma sin un orden determinado, *serial* cuando la recorre en sentido horario o anti-horario, o bien *espacial* cuando detecta el orificio de escape en forma directa (Figura 10).

### 3.10 MÉTODO ESTADÍSTICO

#### 3.10.1 Cantidad de células inmunorreactivas a Fos-5HT en el NDR

La cantidad de neuronas inmunorreactivas a Fos-5HT fue comparada estadísticamente por medio de análisis de la varianza (ANAVA) a tres vías (factores y niveles dentro del factor: separación materna: criadas con su madre y separadas de su madre; estrés crónico: sin estrés y con estrés; droga: vehículo y tianeptina), seguido de la prueba a posteriori de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD de Fisher) para identificar grupos significativamente diferentes.

Particularmente, al nivel -8,04 mm desde el bregma, la densidad superficial de neuronas Fos-5HT inmunomarcadas fue computada en cada subdivisión del NDR y analizada estadísticamente mediante un modelo de medidas repetidas, empleando como factores intra-sujetos a las subdivisiones (DRL, DRD y DRV) del NDR, y como factores entre-sujetos a la separación materna, el estrés crónico y la droga. La





prueba a posteriori utilizada fue de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD de Fisher) para identificar grupos significativamente diferentes.

Los datos fueron normalizados, es decir que se realizó una sustracción de cada uno de los valores en referencia al valor de los animales controles. Adicionalmente, se efectuó el análisis de correlación entre estos valores normalizados y los valores de porcentaje de freezing obtenidos a partir del test de condicionamiento de miedo.

Los datos se presentaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0.05$ .

El procesamiento de los datos se realizó mediante el programa estadístico Infostat (2013).

### 3.10.2 Volumen del HD, áreas y estratos

Para corroborar si las variaciones del volumen del hipocampo se correlacionaron con el peso corporal de los animales, se realizó un análisis de covarianza a dos vías, empleando como factores la separación materna y el estrés crónico, y al peso corporal como covariable. Como la covarianza no fue significativa en ninguno de los grupos, los volúmenes analizados se compararon estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANAVA) a tres vías (factores y niveles dentro del factor: separación materna: criadas con su madre y separadas de su madre; estrés crónico: sin estrés y con estrés; droga: vehículo y lianeptina). En los casos en que la interacción triple que arrojó el ANAVA fue significativa, los datos fueron divididos por el factor separación materna, y se emplearon dos ANAVA separados a dos vías (factores: estrés crónico y droga).

La prueba a posteriori utilizada fue de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD de Fisher) para identificar grupos significativamente diferentes.

Los datos se presentaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0.05$ .

El procesamiento de los datos se realizó mediante el programa estadístico Infostat (2013).

### 3.10.3 Porcentaje de freezing en el paradigma de condicionamiento de miedo contextual

Los tiempos de freezing registrados en cada etapa se transformaron en porcentajes de freezing teniendo en cuenta la duración de cada una de las etapas, y se analizaron mediante ANAVA a tres vías, seguido de la prueba a posteriori de LSD de Fisher.



### 3.10.4 Test de laberinto de Barnes

Los parámetros testeados durante el test de Barnes Maze en la etapa de adquisición fueron procesados utilizando un modelo de medidas repetidas, empleando como factores intra-sujetos los días de aprendizaje (Día 1, Día 2, Día 3 y Día 4), y como factores entre-sujetos al estrés crónico (sin estrés y con estrés). Los parámetros testeados el día de la prueba fueron analizados mediante una prueba t de student. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0.05$ .

El procesamiento de los datos se realizó mediante el programa estadístico Infostat (2013).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CANTIDAD DE CÉLULAS SEROTONINÉRGICAS ACTIVAS EN EL NÚCLEO DORSAL DEL RAJE (NDR)

Se realizó el conteo de neuronas positivas tanto para Fos como para 5HT en el NDR a tres niveles desde el bregma: -6,96 mm; -7,68 mm y -8,04 mm. A su vez, en el nivel -8,04mm, se contabilizaron las células inmunorreactivas a Fos-5HT en cada subdivisión del núcleo: núcleo dorsal del rafe dorsal (DRD), núcleo dorsal del rafe ventral (DRV) y núcleo dorsal del rafe lateral (DRL) (Figura 11).



Figura 11. Fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad Fos-5HT del NDR a -8,04 mm desde el bregma de ratas sometidas a separación materna temprana, estrés crónico e impredecible y tratadas con tianeptina. Las áreas cuadradas indican regiones que se muestran a una mayor magnificación debajo y a la izquierda de cada fotografía. Las flechas blancas indican células 5HT marcadas y las flechas verdes indican la doble marcación Fos-5HT.



## 4.1.1 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el NDR a -6,96 mm desde el bregma.

Se encontró una interacción entre los efectos producidos por los factores *separación materna* y *droga* ( $p = 0,03$ ;  $F_{1,28} = 5,06$ ). El análisis post hoc indicó que, en los animales criados con la madre-tianeptina (con estrés y sin estrés), el número de células inmunoreactivas a Fos-5HT fue significativamente menor comparado con el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).

### Actividad de las células serotoninérgicas en el NDR

#### A -6,96 mm desde el bregma

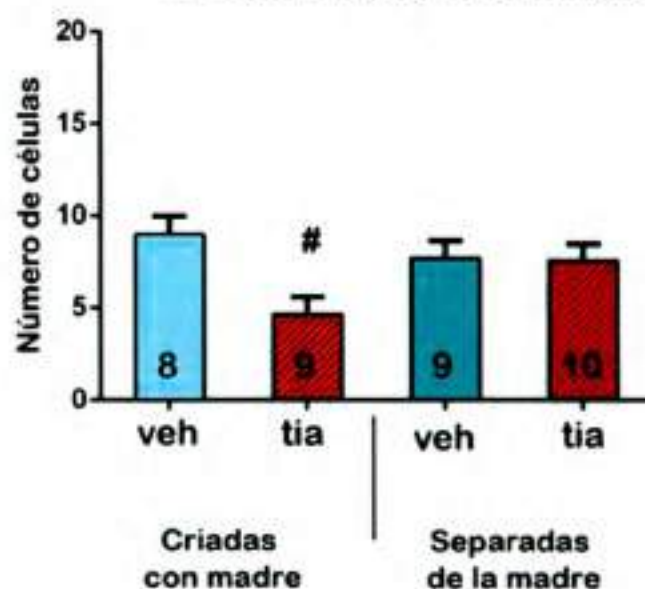


Figura 12. Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la tianeptina (tia) sobre la inmunoreactividad Fos-5HT dentro del NDR a -6,96 mm desde el bregma. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas se incluye en cada barra. Los datos de los animales no estresados y estresados se presentan colapsados dado que el test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación materna y la droga, # $p < 0,05$  versus los demás grupos, test post hoc de LSD.



## 4.1.2 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el NDR a -7,68 mm desde el bregma.

No se encontraron efectos principales ni interacciones a este nivel del NDR (Figura 13).

### Actividad de las células serotoninérgicas en el NDR

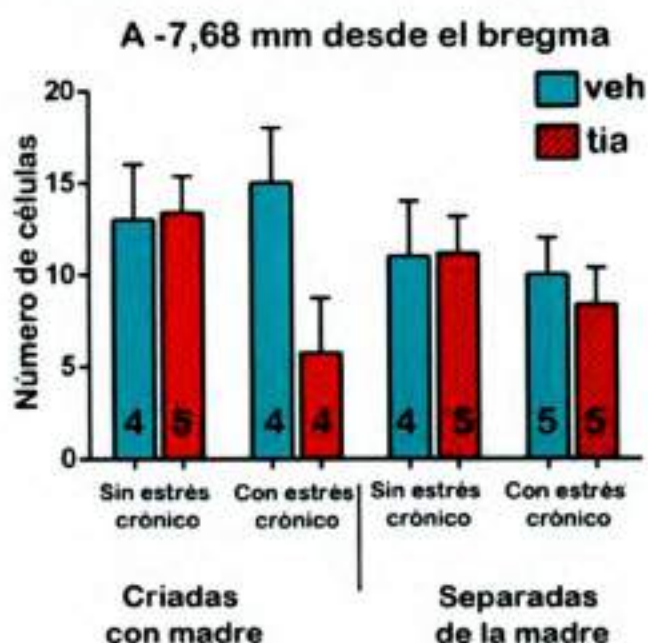


Figura 13. Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la tianeptina (tia) sobre la inmunoreactividad Fos-5HT dentro del NDR a Fos-5HT a -7,68 mm desde el bregma. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas se incluye en cada barra. El test de ANOVA no reveló ningún efecto principal ni interacciones significativas.





## 4.1.3 Cantidad de células serotoninérgicas activas en el NDR a -8,04 mm desde el bregma.

Se encontró una interacción significativa entre los efectos producidos por los factores *separación materna* y *estrés crónico* ( $p = 0,02$ ;  $F_{1,28} = 5,76$ ). El análisis post hoc mostró que en los animales criados con la madre-con estrés la activación de las neuronas serotoninérgicas del NDR fue significativamente menor que en los animales separados de la madre-con estrés y en los controles (criados con la madre-sin estrés) ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

### Actividad de las células serotoninérgicas en el NDR



**Figura 14.** Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la tianeptina (tia) sobre la inmunoreactividad Fos-5HT dentro del NDR a -8,04 mm desde el bregma. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas se incluye en cada barra. Los datos de los animales tratados con vehículo o tianeptina se presentan colapsados dado que el test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación materna y el estrés crónico. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos (a distinto de b) ( $p < 0,05$ ), test post hoc de LSD.

#### 4.1.3.1 Densidad de células serotoninérgicas activas en las subdivisiones del NDR a -8,04 mm desde el bregma.

Se identificaron las células inmunorreactivas a Fos-5HT dentro de cada área y se dividió esta cantidad por el área en  $\text{mm}^2$  de cada subdivisión del NDR.

Según el modelo de medidas repetidas empleado, se encontró una interacción significativa entre los efectos producidos por los factores *separación materna* y *estrés crónico* ( $p = 0,007$ ;  $F_{1,28} = 8,38$ ). El análisis



post hoc mostró que en los animales separados de la madre-estresados en la adultez la densidad de neuronas Fos-5HT fue mayor que en los animales criados con la madre-con estrés ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

### Densidad de células serotoninérgicas activas según las subdivisiones del NDR

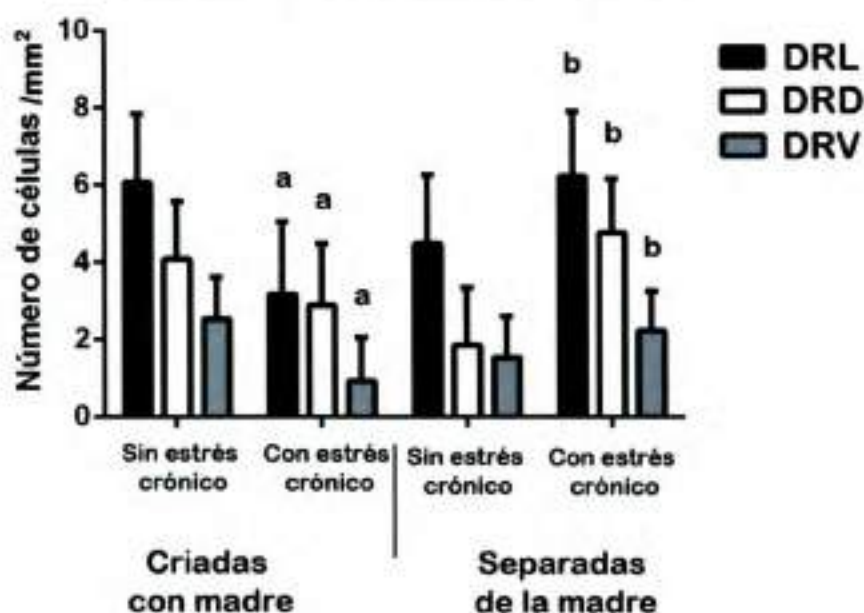


Figura 15. Efecto de la separación materna y el estrés crónico sobre la Densidad superficial de células inmunorreactivas a Fos-5HT en las subdivisiones del NDR a  $-8,04$  mm desde el bregma. El test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación materna y el estrés crónico. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ), test post hoc de LSD. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las subregiones ("a" distinto de "b") ( $p < 0,05$ ), test post hoc de LSD.

Adicionalmente se encontró un efecto significativo del factor *subdivisión* ( $p = 0,001$ ;  $F_{1,28} = 9,71$ ). La densidad de células inmunorreactivas a Fos-5HT fue mayor en el DRL y en el DRD respecto a la subregión DRV ( $p < 0,01$ ) (Figura 16). La densidad de neuronas Fos-5HT en el DRL tendió a ser mayor que en el DRD ( $p = 0,07$ ).



### Células inmunorreactivas a Fos-5HT

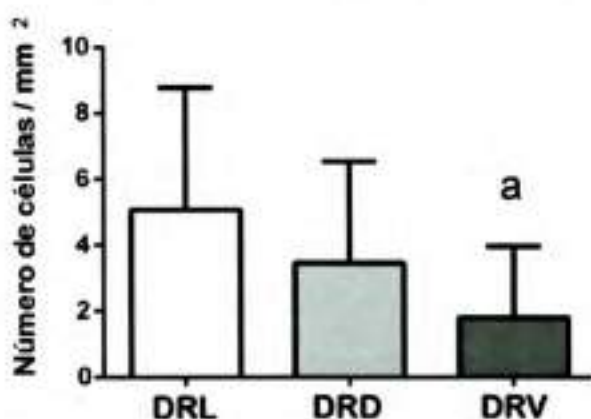


Figura 16. Las células inmunorreactivas a Fos-5HT se encontraron sobre todo en las subdivisiones del núcleo dorsal del rafe lateral (DRL) y dorsal (DRD) respecto de la subdivisión ventral (DRV), como lo reveló el test ANAVA.

Empleando los datos normalizados, los resultados fueron similares a los expuestos anteriormente, por lo que se decidió emplear los datos sin modificar para realizar las gráficas. Las correlaciones estudiadas entre el número de células inmunorreactivas a Fos-5HT y el porcentaje de freezing reportado en cada una de las etapas del test de miedo condicionado no fueron significativas.

#### 4.1.4 Discusión

##### 4.1.4.1 Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la administración de tianeptina sobre la activación de neuronas serotoninérgicas a -8,04 mm desde el bregma

Al estudiar cómo la combinación de la separación materna y el estrés crónico e impredecible más el uso de tianeptina afectan el patrón de activación de las neuronas serotoninérgicas en el NDR, se encontró una interacción entre los dos primeros factores, particularmente a -8,04 mm desde el bregma. A este nivel, la suma de ambos eventos estresantes aumentó significativamente el número de neuronas Fos-5HT en el NDR en comparación con los animales que fueron sometidos únicamente al estrés crónico durante la adultez, equiparándose a los valores obtenidos en el grupo control (criados con la madre-sin estrés). Sin embargo, cuando un solo estresor estuvo presente -separación materna o estrés impredecible- el número de neuronas 5HT activas en el NDR tendió a decrecer respecto del valor obtenido en el grupo control. En vista a la interacción completa, encontramos una concordancia entre la inmunoreactividad a Fos-5HT en el NDR en aquellas ratas sometidas a los dos estresores y las ratas controles, así como también una concordancia en aquellos grupos sometidos a uno solo de los protocolos. Estas evidencias coinciden

con la teoría de coincidencia/desajuste o match/mismatch, que establece que las experiencias o vivencias de la vida temprana configuran estrategias de afrontamiento permitiendo a los individuos enfrentarse óptimamente a entornos similares más tarde en la vida. De acuerdo con esta hipótesis, un desajuste entre el entorno esperado y el real, predice un fenotipo desadaptativo y un mayor riesgo para que se desencadenen ciertas enfermedades (Gluckman et al., 2007; Nederhof et al., 2012) (Figura 17). Desde una perspectiva etológica y evolutiva, esta última hipótesis es plausible: los individuos que se encuentran en un ambiente estresante probablemente también se enfrentarán a un ambiente estresante en la edad adulta y necesitan adaptaciones para hacer frente a las situaciones adversas (Nederhof et al., 2012; Schmidt, 2011).



Figura 17. Representación esquemática de la teoría del match-mismatch. Adaptado de Nederhof y Schmidt (2012).

Corroborando estos hallazgos, la aplicación de un protocolo de estrés crónico y variable parece normalizar los efectos de un estrés prenatal de inmovilización sobre el sistema serotoninérgico en el NDR en ratas macho pero no en hembras (Van den Hove et al., 2014). Estas evidencias implican que algún fenómeno de adaptación podría ocurrir en los animales crónicamente estresados cuando un estrés temprano está presente. El resultado es similar y adaptativo entonces cuando el ambiente temprano se asemeja al de la adultez (ambos ambientes favorables en el caso de los controles o bien dos entornos adversos en el caso de los separados y estresados en la adultez). En cambio, pueden surgir situaciones patológicas cuando un mismatch o desajuste ocurre entre las condiciones experimentadas en un ambiente temprano y aquellas ocurridas más tarde: sólo separación materna temprana o sólo estrés crónico en la adultez (Bock et al., 2014; Schmidt, 2011). La programación temprana puede alterar por ejemplo los registros electrofisiológicos en el NDR (Oosterhof et al., 2016) cuando las condiciones ambientales son análogas.

Si bien los mecanismos que subyacen a los cambios en la programación producidos por la separación materna no son objeto del presente estudio, una de las hipótesis explicativas de los incrementos en la inmunoreactividad de las neuronas Fos-5HT observadas en las ratas expuestas a ambos protocolos en comparación con aquellas solamente sometidas a estrés crónico impredecible, está asociada a la





regulación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). El NDR es un núcleo complejo, no solamente en términos de la organización de sus aferencias y eferencias, sino por la multiplicidad de sistemas de neurotransmisores y neuropéptidos que se distribuyen en esta región y la presencia de varios miembros de la familia de la CRH (Wasselus et al., 2011).

Los efectos del estrés sobre el sistema serotoninérgico son mediados por la CRH, la cual altera la tasa de disparo de estas neuronas y consecuentemente su liberación hacia sus regiones diana (Wasselus et al., 2011). A su vez, la CRH está regulada por dos tipos de receptores: CRH<sub>1</sub> y CRH<sub>2</sub>, y ambos se expresan en el NDR. El receptor CRH<sub>1</sub> generalmente predomina en todo el sistema nervioso central, mientras que el NDR es particular, dado que expresa niveles relativamente altos del receptor CRH<sub>2</sub> (Meloni et al., 2008; Tanahashi et al., 2012).

Resulta interesante que la vasta mayoría (85 -100%) de las neuronas que expresan el ARNm del receptor CRH<sub>2</sub> son serotoninérgicas con excepción de la región caudal del NDR (aproximadamente -8,40 a -8,60 mm desde el bregma) (Staub et al., 2005). La activación del receptor CRH<sub>1</sub> parece inhibir a las neuronas serotoninérgicas en el NDR; la activación de CRH<sub>2</sub>, en cambio, incrementa tanto la tasa de disparo de las neuronas 5HT como la liberación de 5HT en regiones diana anteriores del cerebro (Donner et al., 2016; Korosi et al., 2006; Waselus et al., 2011). Por consiguiente, la CRH genera efectos opuestos en el NDR que dependen de su concentración y de la activación de los receptores CRH<sub>1</sub> y CRH<sub>2</sub> (Tanahashi et al., 2012). La separación materna temprana podría originar una redistribución de estos receptores en las neuronas 5HT del NDR la cual prepararía al sistema serotoninérgico para ser activado por un estrés subsiguiente (Bravo et al., 2014).

El protocolo de estrés podría haber activado a los receptores CRH<sub>2</sub>, y en consecuencia podría fundamentar el decremento en la activación de neuronas 5HT a este nivel (-8,04 mm desde el bregma). Dando soporte a esta explicación, la administración crónica de antagonistas de CRH<sub>1</sub> revirtió los efectos de diez semanas de estrés crónico e impredecible -aumentando el peso corporal, disminuyendo el deterioro físico, y antagonizando la hipertermia, la liberación de noradrenalina a nivel de la corteza cerebral y las vocalizaciones - y mostró tanto efectos ansiolíticos como antidepresivos (Griebel et al., 2002). De manera similar, la pre perfusión con un antagonista de CRH<sub>1</sub> dentro del NDR inhibió la reducción de la liberación de 5HT inducida por la CRH (Tanahashi et al., 2012).

Los resultados observados en el grupo de ratas separadas de la madre-con estrés podrían alternativamente deberse a modificaciones en los niveles del receptor 5HT<sub>1A</sub>. La actividad de estos receptores somatodendríticos (localizados en las neuronas que liberan 5HT) normalmente disminuye la excitabilidad de las neuronas 5HT del NDR (Altieri et al., 2013). La administración de un antagonista de este receptor potencia el número de neuronas positivas a Fos-5HT en dicho núcleo (Goel et al., 2014). En línea con esta interpretación, en un estudio acerca de los efectos de la separación materna temprana sobre la sensibilidad del autorreceptor 5HT<sub>1A</sub> empleando microdiálisis en vivo, se midieron los niveles



extracelulares de 5HT en la corteza frontal en respuesta a la administración de un agonista de 5HT<sub>1A</sub>. Dado que la corteza frontal es inervada por neuronas 5HT que proyectan desde el NDR, la administración de este agonista disminuyó la liberación de 5HT en los animales controles, pero este efecto fue atenuado en los animales separados de la madre, por lo que en éstos últimos es consistente una desensibilización de estos autorreceptores (Gartside et al., 2003). En el citado estudio, las alteraciones en la sensibilidad de los receptores 5HT<sub>1A</sub> fueron persistentes, pudiendo influir en la activación de la neurotransmisión de 5HT bajo condiciones específicas o producir cambios en la respuesta adaptativa al estrés crónico que se sufra posteriormente.

Las acciones de 5HT en la sinapsis se culminan con su recaptación, por lo que otra causa en la desregulación de este sistema podría surgir de alteraciones en el transportador de 5HT (SERT) producidas por la separación materna, como ha sido reportado por Vicentic et al. (2006). Al mismo tiempo, las modificaciones en la función del SERT pueden causar cambios adaptativos en los receptores 5HT<sub>1A</sub>. Existe una conexión funcional entre ellos dado que el SERT regula los niveles de 5HT en la sinapsis y, por lo tanto, controla indirectamente la actividad de los autorreceptores 5HT<sub>1A</sub> (Vicentic et al., 2006). Protocolos de separación materna de 180 min produjeron decrementos en los niveles de ARNm de SERT en el NDR medidos en la adultez (Bravo et al., 2014; Lee et al., 2007). Adicionalmente, Gardner y colaboradores (2009) hallaron aumentos en la expresión de ARNm de SERT en el NDR en ratas de diez semanas de edad sometidas tanto a separación materna temprana de 180 min como a un paradigma de derrota social durante la adultez, comparando los valores con los de ratas separadas durante 15 min y con el grupo control.

Finalmente, se ha sugerido que el impacto de los eventos estresantes y el riesgo individual de desarrollar depresión dependen de la región promotora del gen que regula la expresión del SERT. Dicha región presenta un polimorfismo denominado SERT-LPR (linked polymorphic region) que consiste en una inserción / deleción de 44 pares de bases determinando dos variantes alélicas, un alelo corto y un alelo largo. Específicamente, se encontró que los individuos con el alelo corto del SERT-LPR son más sensibles a los efectos depresogénicos del estrés (Karg et al., 2011). Aunque algunos meta-análisis no pudieron confirmar esta interacción gen x ambiente, otros han demostrado que es especialmente significativa después de un historial de estrés en la vida temprana (Karg et al., 2011). En suma, es necesario continuar indagando acerca de los mecanismos neurofisiológicos vulnerados cuando ocurre una interacción entre estresores ambientales en distintas etapas de la vida, en relación a la activación serotoninérgica en el NDR.

Nuestros resultados indican que el protocolo de estrés crónico disminuye el número de células 5HT activas en el NDR. De manera similar, la aplicación de un estrés crónico e impredecible de 6 semanas de duración indujo una reducción de un 35% en la actividad espontánea de disparo de neuronas 5HT

provenientes del NDR, y un descenso en el número de neuronas espontáneamente activas (Bambico et al., 2009).

Tianeptina no produjo cambios en la expresión de Fos en las neuronas 5HT en el NDR a -8,04 mm desde el bregma. En contraste con nuestros resultados, Kim et al. (2002) empleando patch-clamp reportaron que la tianeptina inhibe las corrientes inducidas por los neurotransmisores inhibidores GABA y glicina, promoviendo un aumento de la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas en este núcleo. Sin embargo, la administración sostenida (20 mg/kg/day for 14 days) de tianeptina no modificó la actividad de disparo de las neuronas 5HT en el NDR (Pineyro et al., 1995). La administración crónica de tianeptina sobre el NDR redujo significativamente la expresión del ARNm del transportador de 5HT y los sitios de unión del transportador de 5HT en el NDR, pero no en el núcleo medial del rafe (Kuroda et al., 1994), resultado que podría explicar en parte la ausencia de efectos del antidepresivo sobre las neuronas serotoninérgicas estudiadas.

#### 4.1.4.2 Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la administración de tianeptina sobre la activación de neuronas serotoninérgicas en las subdivisiones del NDR

El NDR es la fuente principal de 5HT y sus eferencias proyectan hacia regiones límbicas involucradas en la depresión, pero ¿cuál es el significado funcional de su activación? Tratamos de contestar esta respuesta a través del estudio de sus subdivisiones. Las neuronas serotoninérgicas de las distintas subdivisiones del NDR regulan respuestas relacionadas con la ansiedad y se activan de manera diferencial mediante la exposición al estrés (Crawford et al., 2010; Hale et al., 2012; Waselus et al., 2011), por lo que es importante comprender los mecanismos a través de los cuales estas subdivisiones podrían estar individualmente reguladas. Independientemente del tratamiento a la cual cada rata fue sometida, a -8,04 mm desde el bregma, la población de neuronas 5HT se activó en mayor medida en el DRL y en el DRD, y a su vez la densidad de neuronas Fos-5HT activas en el DRL tendió a ser mayor que en el DRD.

Deakin, Graeff y colegas propusieron un modelo en el que establecieron un rol dual de 5HT en el control de la ansiedad y el pánico (Graeff et al., 1996) en el cual la 5HT liberada desde el NDR y que finaliza en el DRL ejerce una influencia inhibitoria sobre las respuestas asociadas al pánico (como el miedo incondicionado o innato), mientras que la 5HT liberada en la amígdala incrementa la aparición de comportamientos defensivos altamente integrados y ansiogénicos. Estos autores argumentan que un sistema que promueve comportamientos defensivos altamente integrados (en la amígdala), mientras que al mismo tiempo inhibe las reacciones primitivas de lucha / huida (en el DRL) implica un claro valor de supervivencia. Específicamente, la subdivisión DRL/ VLPAG - referida en la bibliografía como alas laterales del NDR- pareciera formar parte de un sistema simpato-motor de control que regula las respuestas de lucha/huida u otros comportamientos emocionales que involucren cambios en el tono muscular, tal como la respuesta de freezing (Hale & Lowry, 2011). La activación de esta región podría estar relacionada con la



inhibición de respuestas de pánico fisiológicas, bajo condiciones asociadas a efectos antidepresivo-símiles sobre el comportamiento (Hale et al., 2012).

En efecto, la región DRL contiene una población de interneuronas que expresan el neurotransmisor GABA que podrían afectar la inhibición local de las neuronas 5HT. La subdivisión DRL recibe aferencias desde el tronco cerebral asociadas al control autonómico, incluyendo el núcleo lateral parabraquial, el núcleo del tracto solitario, así como proyecciones aferentes desde los nervios viscerosensitivos glossofaríngeo y vago. También recibe aferencias de regiones límbicas troncales que controlan la respuesta autonómica y los estados emocionales incluyendo el núcleo de la cama de la estria terminalis (BNST), el núcleo central de la amígdala, los núcleos lateral y perifornical hipotalámicos, el área preóptica media y la corteza infralímbica. Sus proyecciones terminan en estructuras que controlan las respuestas de lucha/huida tales como la médula rostral ventrolateral, la sustancia gris periacueductal dorsolateral y el hipotálamo lateral (Hale et al., 2012).

Las neuronas serotoninérgicas del DRL proyectan a su vez a las demás subdivisiones DRD y DRV, y lesiones selectivas del DRL incrementan la expresión del gen de triptofano hidroxilasa en el DRV, sugiriendo que las neuronas 5HT de esta subdivisión proveen un tono inhibitorio a las neuronas 5HT en el DRV (Hale et al., 2012; Hollis et al., 2006). Esto último podría explicar los resultados obtenidos con respecto a la baja activación de la subdivisión DRV reportada en este trabajo. Estudios empleando electrofisiología demuestran que las neuronas 5HT de la subdivisión DRL poseen propiedades de membrana distintivas que confieren a estas neuronas mayor excitabilidad que las neuronas 5HT que se encuentran en el DRV (Crawford et al., 2010).

Por otra parte, las neuronas serotoninérgicas del DRD poseen proyecciones recíprocas hacia estructuras relacionadas con la ansiedad, tales como la corteza prefrontal medial y otras regiones límbicas que incluyen a la amígdala basolateral y central, al BNST, al núcleo accumbens, al área hipotalámica dorsal y a la región periacueductal dorsolateral (Hale et al., 2012). Uno de los estímulos ansiogénicos que incrementan la expresión de Fos en neuronas serotoninérgicas del DRD es el condicionamiento de miedo. Otros estímulos incrementan la expresión de Fos en esta región, entre los que se encuentran ciertas drogas ansiogénicas como la cafeína (Abrams et al., 2004) y un miembro de la familia de neuropéptidos de la CRH con alta afinidad por el receptor CRH<sub>2</sub>: la urocortina II (Hale & Lowry, 2011; Staub et al., 2005). La exposición a un protocolo de derrota social también incrementa los niveles de Fos en el DRD (Gardner et al., 2005). En nuestro trabajo, la activación del DRD fue similar entre aquellos animales sometidos a separación materna- estresados en la adultez y los controles, sugiriendo un fenómeno adaptativo.

A -6,96 mm desde el bregma, la población de neuronas 5HT corresponde anatómicamente a la subdivisión DRD, la cual se extiende aproximadamente desde -6,84 hasta -8,30 mm desde el bregma (Paxinos & Watson, 2007). Analizando la inmunoreactividad a Fos-5HT, se encontró una interacción entre los efectos producidos por la separación materna y la droga empleada como antidepresivo.



En los grupos de ratas criadas con la madre, tianeptina disminuyó el número de neuronas positivas para Fos y 5HT, mientras que en las separadas de la madre su efecto fue similar al de las ratas tratadas con vehículo. Tal como se mencionó en los párrafos anteriores, el DRD es activado mediante estímulos de carácter ansiogénico. Empleando el test de ansiedad de campo abierto, Bouwknecht y colaboradores (2007) detectaron una mayor activación de las neuronas rostrales de la región DRD. La inhibición de neuronas 5HT a este nivel del NDR mediante microinyección de un agonista de 5HT<sub>1A</sub> disminuye el comportamiento de ansiedad previamente incrementado por un protocolo de estrés inescapable (Maier & Watkins, 2005). De acuerdo a los resultados observados a este nivel del NDR, la tianeptina disminuye la activación de las neuronas 5HT en las ratas criadas con su madre (sometidas o no al estrés durante la etapa adulta), pudiendo por lo tanto promover un comportamiento ansiolítico en estos grupos. De manera similar, en otro estudio realizado en nuestro laboratorio utilizando el test plus maze elevado se observó que en los animales tratados con tianeptina se incrementó el porcentaje de ingreso a los brazos abiertos (Trujillo et al., 2016), comportamiento que denota una disminución de la conducta de ansiedad.



## 4.2 VOLUMEN DEL HIPOCAMPO DORSAL (HD), ÁREAS Y ESTRATOS

Mediante la técnica de estereología según el método de Cavalieri, fueron determinados los siguientes volúmenes:

Volumen del HD total:

Volumen del área CA1

Volumen del estrato basal

Volumen del estrato piramidal

Volumen del estrato apical

Volumen del área CA2/3

Volumen del estrato basal

Volumen del estrato piramidal

Volumen del estrato apical

Volumen del giro dentado

Volumen del estrato granular

Volumen del estrato polimórfico

Volumen del estrato molecular

## 4.2.1 Volumen total del HD y de las áreas CA1, CA2/3 y GD

Se encontró una interacción significativa entre los efectos producidos por los factores *separación materna*, *estrés crónico* y *droga* sobre el volumen del (HD) y las áreas CA1, CA2/3 y giro dentado (HD:  $F_{1,38} = 5,52$ ,  $p = 0,02$ ; CA1:  $F_{1,38} = 4,03$ ,  $p = 0,05$ ; CA2/CA3:  $F_{1,38} = 5,59$ ,  $p = 0,02$ ; giro dentado:  $F_{1,38} = 4,63$ ,  $p = 0,04$ ) (Figuras 18 y 19).

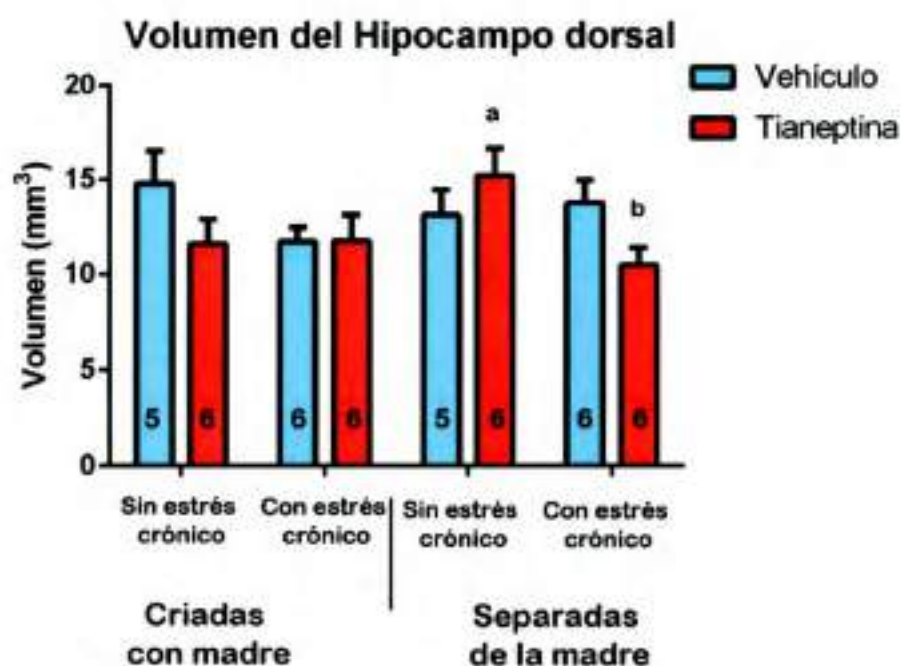
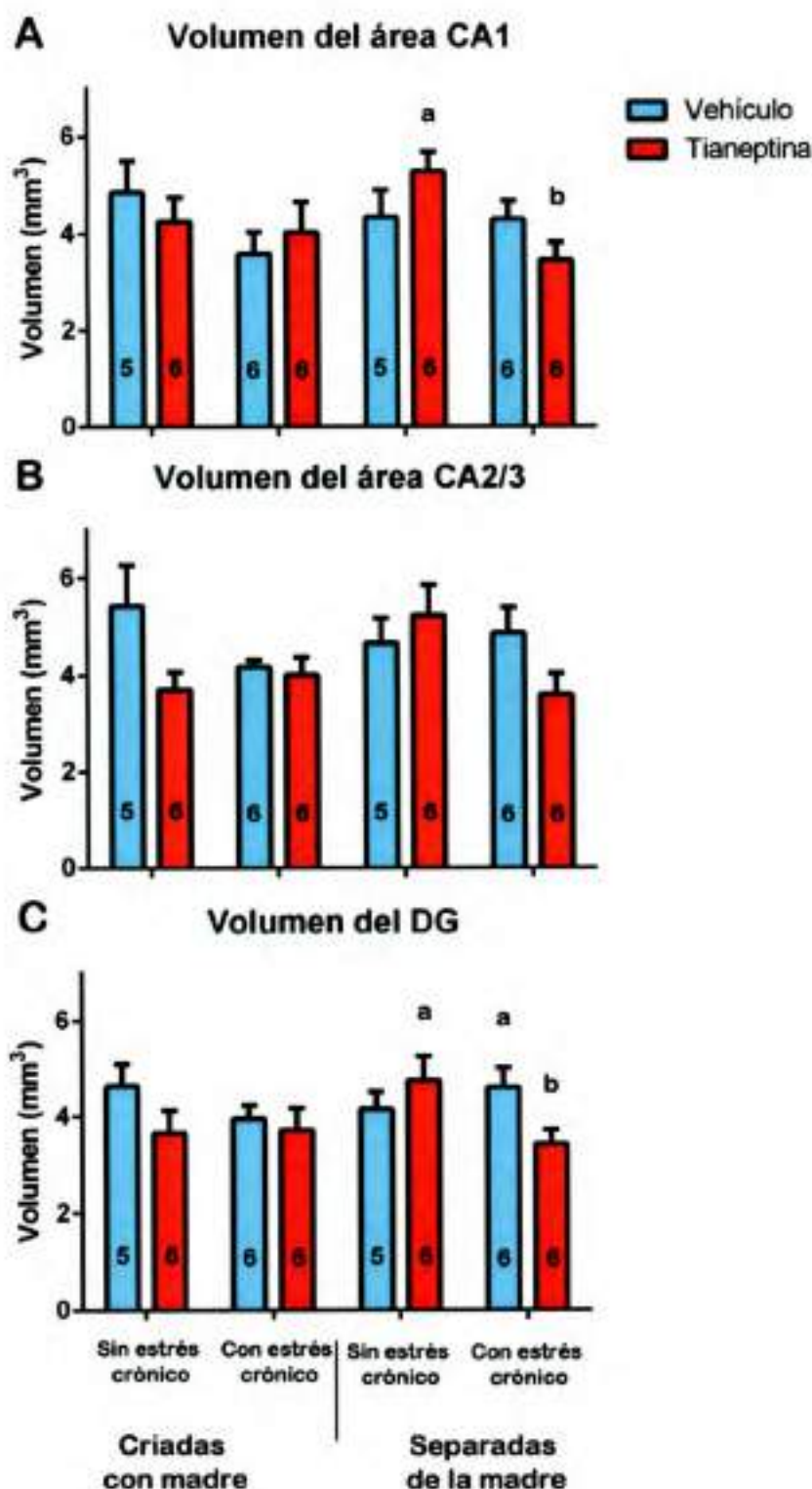


Figura 18. Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecibles y la tianeptina sobre el volumen total del hipocampo dorsal (HD). Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas se incluye en cada barra. (A) CA1, (B) CA2/3, (C) Giro dentado. El test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación materna, el estrés crónico y la droga. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < .05$ ), test post hoc de LSD.





**Figura 19.** Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la tianeptina sobre el volumen de las áreas del hipocampo dorsal (HD). Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas se incluye en cada barra. (A) CA1, (B) CA2/3, (C) Giro dentado. El test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación materna, el estrés crónico y la droga. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < .05$ ), test post hoc de LSD.

Dado que la interacción triple fue significativa, se realizaron dos ANAVAS a dos vías con los datos de los animales criados con la madre por un lado y separados de la madre por otro.

En los grupos criados con la madre, el efecto principal del factor *droga* se evidenció en el volumen del área CA2/3 ( $F_{1,19}=4,35$ ,  $p=0,05$ ) (Figura 19, B). El análisis a posteriori no indicó diferencias entre los grupos. En el resto de los volúmenes estudiados, no se encontraron efectos principales ni interacciones.

En los grupos separados de la madre, en cambio, se encontró una interacción entre los efectos producidos por el *estrés crónico* y la *droga* en los volúmenes del HD, el área CA1 y el giro dentado (HD:  $F_{1,19}=4,66$ ,  $p=0,04$ ; CA1:  $F_{1,19}=4,42$ ,  $p=0,05$ ; giro dentado:  $F_{1,19}=4,87$ ;  $p=0,04$ ). El análisis a posteriori indicó que tanto el volumen del HD (Figura 18) como el del área CA1 (Figura 19, A) de las ratas con estrés-tianeptina son significativamente menores que en los animales sin estrés a los que también se les administró el antidepresivo. El volumen del giro dentado es menor en las ratas con estrés-tianeptina comparado con el grupo con estrés-vehículo y con el grupo sin estrés-tianeptina ( $p < 0,05$ ) (Figura 19, C).

#### 4.2.2 Volumen de los estratos de las áreas CA1, CA2/3 y GD

Se encontró una interacción entre los efectos producidos por la *separación materna*, el *estrés crónico* y la *droga* sobre los estratos apicales de las áreas CA1 y CA2/3 (CA1:  $F_{1,38} = 5,38$ ,  $p = 0,03$ ; CA2/CA3:  $F_{1,38} = 6,54$ ,  $p = 0,01$ ). Dado que la interacción triple fue significativa, se realizaron dos ANAVAS a dos vías con los datos de los animales criados con la madre por un lado y separados de la madre por otro.

En los grupos criados con la madre, no se encontraron efectos principales ni interacciones (Figura 20). Sin embargo, el test estadístico utilizado reveló una tendencia para el factor principal *estrés crónico* en los volúmenes de los estratos apicales de CA1 y CA2/3 ( $p = 0,08$  y  $0,07$  respectivamente) (Tabla 2).

En los grupos separados de la madre, se encontró una interacción entre los efectos producidos por el *estrés crónico* y la *droga* en los volúmenes de los estratos apicales tanto de CA1 como de CA2/3 (CA1:  $F_{1,19} = 5,72$ ,  $p=0,03$ ; CA2/CA3:  $F_{1,19}=5,55$ ,  $p=0,03$ ). El análisis a posteriori reveló que estos volúmenes fueron menores en el grupo de ratas sometidas a estrés crónico que recibieron tianeptina comparadas con el grupo que no fue sometido a estrés crónico al que también se le administró el antidepresivo ( $p < 0,05$ ) (Figura 20, A y B). Con respecto al giro dentado, el test estadístico empleado reveló una tendencia de interacción entre los factores *estrés crónico* y *droga* en el estrato molecular ( $F_{1,19} = 3,44$ ,  $p=0,07$ ) (Figura 20, C).

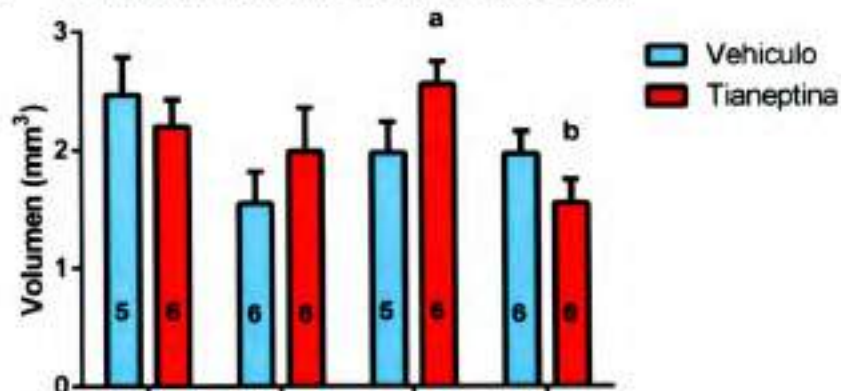
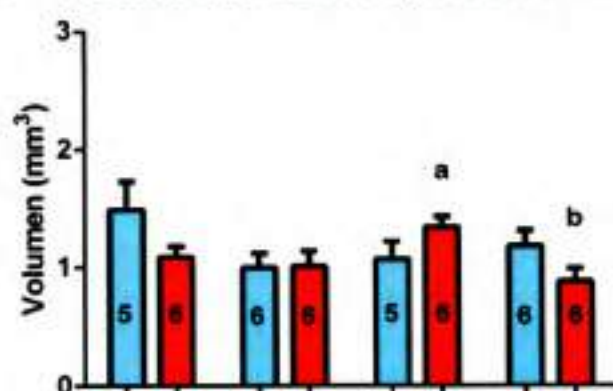
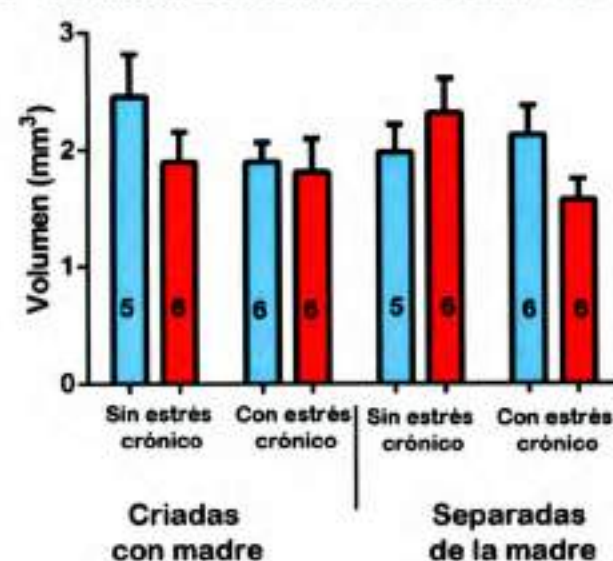
**A Volumen del estrato apical de CA1****B Volumen del estrato apical de CA2/3****C Volumen del estrato molecular del GD**

Figura 20. Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la tianeptina sobre el volumen del estrato apical de CA1(A) y CA2/3 (B), y el estrato molecular del giro dentado (C). Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas



se incluye en cada barra. En los casos (A) y (B) el test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación materna, el estrés crónico y la droga. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < .05$ ), test post hoc de LSD.

Tabla 2. Resultados del ANOVA a dos vías de los volúmenes del HD, sus áreas y estratos

		Estrés Crónico		Droga		Interacción	
		(df 1,19)		(df 1,19)		(df 1,19)	
		F	p	F	p	F	p
Criadas con la madre	Hipocampo Dorsal	1,25	0,28	1,4	0,25	1,48	0,24
	Área CA1	1,77	0,2	0,02	0,9	0,86	0,37
	Estrato apical	3,46	0,08	0,09	0,76	1,36	0,26
	Área CA2/3	1,09	0,31	4,35	0,05	2,89	0,11
	Estrato apical	3,67	0,07	1,79	0,2	1,91	0,18
	Giro dentado	0,56	0,47	2,04	0,17	0,76	0,39
Separados de la madre	Hipocampo Dorsal	2,79	0,11	0,21	0,65	4,66	0,04
	Área CA1	4,96	0,04	0,02	0,89	4,42	0,05
	Estrato apical	5,85	0,03	0,13	0,72	5,72	0,03
	Área CA2/3	1,78	0,20	0,42	0,52	2,96	0,1
	Estrato apical	2,03	0,17	0,01	0,91	5,55	0,03
	Giro Dentado	1,14	0,30	0,51	0,48	4,87	0,04
Estrato molecular	1,51	0,21	0,21	0,65	3,44	0,07	

#### 4.2.3 Discusión

##### 4.2.3.1 Efectos del estrés crónico y de la separación materna sobre el volumen del HD

En las ratas criadas con la madre-con estrés, encontramos una reducción del 37% y del 33% en el volumen ocupado por las dendritas apicales de las áreas CA1 y CA2/3, respectivamente, en comparación con las controles. Dicha reducción no alcanzó a ser significativa, estimamos que por razones en la variabilidad del conjunto de datos, sin embargo sí se manifestó como una tendencia ( $p=0,08$  y  $p=0,07$





respectivamente, Tabla 2). No obstante, el porcentaje de reducción como consecuencia del estrés crónico es menor en aquellos animales sometidos a la experiencia temprana de separación, del 21% y 20% en el volumen ocupado por las dendritas apicales de las áreas CA1 y CA2/3, respectivamente. Lo anterior implica que el paradigma perinatal de separación produce modificaciones duraderas que afectan al volumen del HD en la adultez. Nuevamente, la teoría del match/mismatch concuerda con nuestros resultados, sugiriendo que la historia temprana de los animales posee un rol adaptativo frente al estrés y puede promover la resiliencia frente a desafíos similares en etapas posteriores de la vida. De manera semejante, empleando las variaciones postnatales en los cuidados maternos (licking and grooming) para evaluar los alcances de la adversidad temprana, Champagne y sus colegas encontraron que, durante la adultez, la descendencia que recibió menores cuidados maternos mostró disminuciones en la arborización dendrítica y la densidad de espinas en el hipocampo junto con un marcado deterioro de la memoria (Champagne et al., 2008). Sin embargo, ambos efectos se revirtieron cuando estos animales fueron sometidos a experiencias estresantes durante la adultez (match). A su vez, resultados opuestos se reportaron en el caso de ratas con altos niveles de cuidados maternos sometidas a condiciones de estrés en la adultez (mismatch). En este trabajo, las condiciones de mismatch, es decir, cuando el ambiente temprano y el adulto no coinciden, serían las de los animales sometidos a separación materna o estrés crónico impredecible únicamente. En el caso del primero de estos grupos, las reducciones de los estratos apicales son del 28% y del 20% de las áreas CA1 y CA2/3, respectivamente.

Las disminuciones debidas al paradigma de estrés crónico que calculamos empleando el método de Cavalieri en CA1 y CA2/3 fueron mayores que las reportadas por otros autores como resultado de protocolos de estrés por inmovilización de 21 días también valiéndose de este método estereológico y empleando un número de animales equivalente ( $n=4/5$ ) (Donohue et al., 2006; Stewart et al., 2005). Este fue un resultado esperado dado que hace más de veinte años se encontraron reducciones en la longitud y complejidad de dendritas apicales, no basales, de las neuronas piramidales del área CA3 después de la exposición crónica a niveles elevados de glucocorticoides (Woolley et al., 1990), a procedimientos de estrés crónico mediante inmovilización (Magarinos & McEwen, 1995; Watanabe et al., 1992) o a protocolos de estrés tipo psicosocial (Magarinos et al., 1996). El estrés crónico variable e impredecible también produce una retracción dendrítica significativa en el hipocampo (Lee et al., 2009; Luo et al., 2014; Schoenfeld et al., 2017). Es necesario aclarar, sin embargo, que la duración del protocolo es un factor determinante para que los cambios volumétricos alcancen la significación estadística. Por ejemplo, el período de estrés utilizado por el grupo de Luo et al. (2014) fue de 8 semanas, mientras que en este trabajo fue de 24 días. Si comparamos los resultados de Luo et al. (2014) a las 4 semanas (similar cantidad de días que las empleadas en esta investigación), la reducción del hipocampo -tanto dorsal como ventral- es significativa sólo en el hemisferio izquierdo, en tanto que en esta tesis se estudió únicamente el HD y no se distinguieron los hemisferios. La mayoría de los estudios que evalúan las variaciones volumétricas en el hipocampo reportan reducciones, consistentes con nuestros resultados.

Sin embargo, y continuando con este criterio, el volumen del hipocampo -ya sea el del hemisferio izquierdo o el del derecho- no fue afectado significativamente por 6 semanas de un procedimiento de estrés crónico variable (Xi et al., 2011). Es importante destacar que los trabajos de Xi et al. (2011) y de Luo et al. (2014) emplearon imágenes coronales de cerebros de ratas obtenidas mediante resonancia magnética, a diferencia de las técnicas empleadas en esta tesis. En un trabajo reciente, aplicando resonancia magnética pero a su vez empleando imágenes de alta resolución, 4 semanas de un protocolo de inmovilización impredecible disminuyeron significativamente el volumen de las subregiones CA1, CA2/3 y del giro dentado de ambas porciones dorsal y ventral del hipocampo (Schoenfeld et al., 2017). Estos autores reportaron la misma pérdida de volumen en ambos hemisferios, lo que quizás refleja una menor lateralidad en el cerebro de estas ratas o, como alternativa, mayor capacidad de detección debido a una mejor resolución de la imagen (Schoenfeld et al., 2017).

El estrés aplicado de forma crónica e impredecible puede disminuir también la neurogénesis en el giro dentado (Schoenfeld et al., 2017). En el adulto, la neurogénesis es necesaria para mantener la estructura normal del hipocampo pero es improbable que su disminución sea responsable de la pérdida de volumen que ocurre ante la exposición al estrés (Schoenfeld et al., 2017). Aunque la neurogénesis puede inducirse en respuesta a estímulos ambientales (Kempermann et al., 2002), las tasas de proliferación de estas nuevas neuronas en adultos y ancianos son muy bajas (Czeh & Lucassen, 2007). Cuando se estima la reducción provocada por el estrés en el número de neuronas nuevas y se compara con la población total de células del hipocampo, tales alteraciones difícilmente contribuyan significativamente a la reducción del volumen total de hipocampo. Esto último se ha detectado en animales y humanos, utilizando imágenes de resonancia magnética (Czeh & Lucassen, 2007). Con atención a estas observaciones, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en el volumen del estrato granular del giro dentado, región en la que se encuentran las nuevas neuronas, sino una tendencia en la interacción *estrés crónico x droga* en las ratas separadas de la madre solamente en el estrato molecular, compuesto principalmente por dendritas. Consideramos que es necesario hacer hincapié en el impacto del protocolo de estrés crónico sobre la neurogénesis en estudios posteriores, dado que podría estar afectada, no obstante las técnicas que aplicamos tal vez fueran insuficientes para detectar dichas variaciones.

La sección transversal del hipocampo posee una estructura laminar definida donde se disponen hileras de células piramidales. Sus conexiones generalmente siguen este formato laminar y, como regla general, son unidireccionales y forman bucles cerrados bien caracterizados que se originan principalmente en la corteza entorinal adyacente, la principal interfaz entre el hipocampo y la neocorteza. La vía perforante es la entrada principal al hipocampo y sus axones surgen principalmente en la corteza entorinal. Algunos de estos axones se proyectan a las células granulares del giro dentado y a las células piramidales de la región CA3, mientras que otras se proyectan hacia las células piramidales de CA1 y hacia el subículo (Witter et al., 2000). Una menor cantidad de ramificaciones dendríticas en el estrato molecular del giro dentado, podría afectar a las dendritas apicales de CA3. Una retracción dendrítica en CA3 a su vez podría

reflejarse en el estrato apical de CA1 a través de los colaterales de Schaffer (Figura 21). En esta investigación, el volumen del giro dentado del grupo de animales separados-estresados y tratados con tianeptina fue menor al de los animales separados-no estresados que también recibieron el antidepresivo. En consecuencia, el estrato molecular fue la región más afectada de esta área por la interacción estrés crónico x droga, lo cual es coherente debido a la conectividad intrínseca del hipocampo antes descrita (Figura 21).

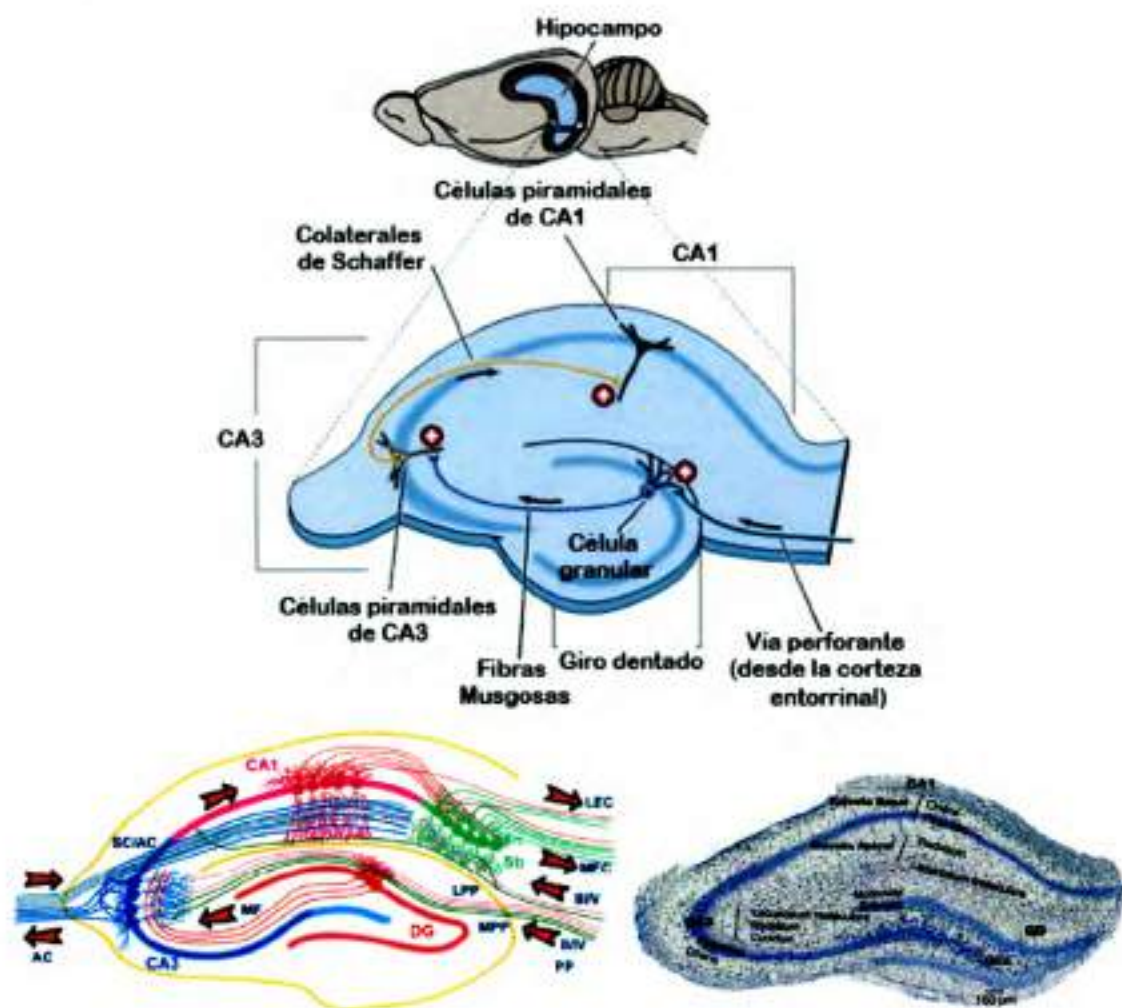


Figura 21. . Redes del hipocampo: el hipocampo forma una red principalmente unidireccional, con aportes de la Corteza Entorrinal (EC) que forma conexiones con las neuronas piramidales de CA3 y del giro dentado (DG) a través de la vía perforante (PP - dividida en lateral y medial). Las neuronas de CA3 también reciben información proveniente del giro dentado a través de las fibras musgosas (MF). Éstas envían axones a las células piramidales de CA1 a través de la vía colateral de Schaffer (SC), así como a las células de CA1 en el hipocampo contralateral a través de la vía de la comisura asociativa (AC). Las neuronas de CA1 también reciben entradas directas de la vía perforante y envían axones al subículo (Sb). Estas neuronas, a su vez, constituyen la salida principal del hipocampo a la corteza entorrinal, formando un ciclo.

#### 4.2.3.1 Efectos del antidepresivo tianeptina sobre el volumen del HD

La administración de tianeptina produjo efectos sobre el volumen del HD que fueron diferentes en los animales separados de la madre respecto a los que sufrieron ambos paradigmas de estrés.

Encontramos una interacción triple entre la separación materna, el estrés crónico y la administración de tianeptina sobre los volúmenes del HD, el área CA1, el área CA2/3, el giro dentado, la capa apical de CA1 y la capa apical de CA2/3. La diferencia en todos estos volúmenes entre las ratas tratadas con tianeptina y tratadas con vehículo fue mayor en las separadas de la madre en comparación con las ratas criadas con la madre. En los animales separados de la madre-estresados, la tianeptina tendió a reducir el volumen del HD, el área CA1 y el giro dentado respecto a su grupo control tratado con vehículo; mientras que en las ratas separadas de la madre-sin estrés, la tianeptina tendió a incrementar el volumen de las áreas citadas respecto a su grupo control tratado con vehículo. Resultados similares se obtuvieron en los estratos apicales de las áreas CA1 y CA2/3.

Las células piramidales que constituyen la vasta mayoría de neuronas de la capa piramidal del hipocampo poseen un árbol dendrítico basal y uno apical (Witter et al., 2000). Dado que las disminuciones observadas pertenecen a los estratos apicales de las áreas CA1 y CA2/3, la tianeptina podría afectar los patrones de remodelación dendrítica en estas regiones de una manera diferencial dependiendo del tipo y la cantidad de estresores aplicados. Nuevamente, la experiencia temprana de separación interacciona con la respuesta al estrés en la adultez modificando el comportamiento del antidepresivo tianeptina sobre el volumen del HD.

En el grupo separados de la madre-sin estrés, la tendencia de tianeptina a incrementar el volumen del HD es un resultado esperado, dado que en musarañas sometidas a estrés psicosocial, la tianeptina revirtió las disminuciones inducidas por el estrés en el volumen del hipocampo (Czeh et al., 2001). En ratas, tianeptina evitó la atrofia dendrítica en neuronas piramidales de CA3 causada por el estrés crónico de inmovilización mientras que dos antagonistas de la recaptación de 5HT, fluoxetina y fluvoxamina, no tuvieron efecto (Magarinos et al., 1999). Al menos dos posibles hipótesis podrían respaldar estos resultados. En primer lugar, este antidepresivo normaliza las alteraciones provocadas por el estrés sobre la función glutamatergica (McEwen & Chattarji, 2004); segundo, revierte la disminución inducida por el estrés en la expresión de factores de crecimiento nervioso tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Afonso et al., 2006).

Cuando el estrés es prolongado, involucra no solo a los glucocorticoides sino a aminoácidos excitatorios como el glutamato, que se incrementan en el hipocampo y en otras regiones (Lowy et al., 1993). El estrés crónico y los estados depresivos se acompañan de una actividad aumentada de los receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato) para glutamato. De hecho, la administración de antagonistas de NMDA incrementa la neurogénesis en el giro dentado y previene la remodelación dendrítica del estrato



apical de neuronas piramidales en CA3 que surge como consecuencia del estrés (Magarinos et al., 1999; McEwen, 1999). A partir de estudios electrofisiológicos la tianeptina ha mostrado revertir las alteraciones inducidas por el estrés sobre el sistema glutamatérgico (McEwen & Chattarji, 2004), modulando su transmisión. A modo de ejemplo, tres semanas de estrés por inmovilización inhiben el tiempo de desactivación de los receptores NMDA, permitiendo la continuidad de los potenciales de excitación post sinápticos. Tianeptina normaliza este efecto (Kole et al., 2002).

En ratas separadas de la madre evaluadas durante la adultez, los niveles de varios receptores de glutamato son menores en relación a los controles (O'Connor et al., 2013; Pickering et al., 2006) por lo que ocurre una reducción en la retroalimentación negativa de glutamato. Esto potencialmente conduce a una liberación excesiva de este neurotransmisor, acompañada de una hiper-excitabilidad, y a su vez provoca la desramificación de las dendritas apicales en el hipocampo (McEwen y Chattarji, 2004). De hecho, la separación materna aumenta los niveles de glutamato en el hipocampo (Martisova et al., 2012), por lo que tianeptina podría actuar restableciendo estos niveles y aumentando la arborización dendrítica de las áreas del hipocampo estudiadas. Alternativamente, dado que la diferenciación y la supervivencia de las neuronas del hipocampo *in vitro* responden a la acción de factores que incluyen al BDNF (Cheng & Mattson, 1994) y al NGF (Frielingsdorf et al., 2007), una segunda hipótesis se soporta en la normalización de los niveles de estos factores tróficos (entre otros) en las ratas separadas de su madre por parte del antidepresivo empleado. Sin embargo, Della et al. (2013) observaron una disminución significativa de la actividad de NGF en el hipocampo de ratas privadas de la madre después de la administración con tianeptina.

La combinación de los dos tipos de estrés y la administración de tianeptina resultó en una disminución significativa del volumen del giro dentado, del área CA1 y su respectivo estrato apical, así como el volumen del estrato apical de CA2/3 respecto al grupo de animales separados de la madre-sin estrés que también recibieron el antidepresivo. La reducción que encontramos en estas regiones difirió de los resultados que esperábamos en base a las propiedades del antidepresivo (Czeh et al., 2001; Chu et al., 2010). Esto nos condujo a una interesante pregunta: ¿la disminución de volúmenes asociada a la administración de tianeptina específicamente en las capas apicales puede considerarse una respuesta de protección/adaptación ante la exposición a ambos estresores o es un indicador de una mayor vulnerabilidad al daño? De hecho, en este estudio, el volumen del HD de los animales separados de la madre-con estrés- tianeptina es similar al de aquellos criados con la madre-sin estrés-con tianeptina. Este resultado concuerda con la teoría del match/mismatch, dado que las condiciones entre el ambiente temprano y futuro coinciden tanto para el grupo de los animales controles (ambos ambientes beneficiosos) como para el grupo separados de la madre-con estrés (ambos ambientes perjudiciales). La noción de que los cambios promovidos por el estrés sobre la morfología del hipocampo pueden ser adaptativos en lugar de perjudiciales, ha sido abordada por distintos autores (Cameron & Schoenfeld, 2018; Conrad, 2006; Fuchs et al., 2006; McEwen et al., 2012). La remodelación dendrítica que ocurre en



las células piramidales de CA3 y sus aferencias como consecuencia del estrés crónico, es afectada por la elevación repetida de los glucocorticoides (Conrad, 2006). Simultáneamente, el estrés potencia la liberación de glutamato y el aumento de la expresión de su transportador en la región CA3. Puesto que la mayoría de las interneuronas dentro del hipocampo son inhibitorias (Feldblum et al., 1993) y activan los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA)<sub>A</sub>, la retracción dendrítica al menos en CA3 es inhibida por agonistas de estos receptores (benzodiazepinas). Además, las dendritas que se retraen típicamente en el estrato apical de CA3, reciben aferencias de las fibras musgosas del giro dentado, que son los axones de las células granulares propias de esta zona. Las células granulares son principalmente glutamatérgicas por lo que las fibras musgosas constituyen una conexión excitatoria importante dentro del hipocampo. Curiosamente, estas células poseen un doble fenotipo funcional glutamatérgico-GABAérgico, ya que contienen GABA conjuntamente con la enzima ácido glutámico descarboxilasa responsable de sintetizar GABA a partir del ácido glutámico (Gomez-Lira et al., 2002). Evidencias experimentales han revelado que estas células pueden volverse inhibitorias en respuesta a cambios en el medio ambiente, como por ejemplo la extrema hiperexcitabilidad debida a los ataques epilépticos (Gómez-Lira et al., 2002). Por lo tanto, la neurotransmisión GABAérgica en las sinapsis de las fibras musgosas parece representar un mecanismo compensador en respuesta a las convulsiones (Fuchs et al., 2006). La exposición crónica a los glucocorticoides puede promover un fenotipo GABAérgico como parte de un mecanismo de retroalimentación compensatoria para amortiguar los efectos excitadores iniciales de los glucocorticoides en el hipocampo (McMillan et al., 2004), análogo a lo informado en condiciones de hiperexcitabilidad durante las convulsiones epilépticas. En suma, tieneptina podría reducir el volumen de los estratos apicales de CA3 a través de sus acciones sobre las vías glutamatérgicas (McEwen et al., 2010) favoreciendo los citados mecanismos compensatorios. Sin embargo, los mismos cambios estructurales potencialmente protectores durante un período de días a semanas también pueden ser maladaptativos si los entornos amenazantes o las tensiones percibidas continúan durante largos períodos de tiempo (Cameron & Schoenfeld, 2018).





### 4.3 PORCENTAJE DE FREEZING (INMOVILIDAD) EN EL TEST DE MIEDO CONDICIONADO

El test de miedo condicionado se efectuó para determinar el porcentaje de freezing de los animales frente a un contexto determinado, medida que se relaciona con la conducta de aprendizaje y memoria. Durante cada etapa del test se cronometró el tiempo en que cada animal exhibió la conducta de freezing. Esos tiempos fueron convertidos a porcentajes teniendo en cuenta la duración de cada etapa del test.

#### 4.3.1 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de pre-condicionamiento (habitación)

Durante esta etapa ninguna de las ratas exhibió la conducta de freezing. Asimismo, todas las ratas mostraron un comportamiento exploratorio, lo que indica la ausencia de alteraciones en su capacidad de explorar el contexto debido a los tratamientos.

#### 4.3.2 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de condicionamiento

En esta etapa los animales recibieron la serie de shocks, y no se encontraron interacciones ni efectos principales de ninguno de los factores estudiados (separación materna x estrés crónico:  $F_{1,102} = 3.48$ ;  $p = 0,07$ ; separación materna x droga:  $F_{1,102} = 0,09$ ;  $p = 0,77$ ; estrés crónico x droga:  $F_{1,102} = 0,02$ ;  $p = 0,90$ ; separación materna x estrés crónico x droga:  $F_{1,102} = 0,001$ ;  $p = 0,97$ ). Por lo que todas las ratas mostraron un comportamiento de freezing similar ante el contexto (Figura 22, A).

#### 4.3.3 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de postcondicionamiento

Se encontró una interacción significativa entre los efectos generados por la separación materna y el estrés crónico ( $F_{1,102} = 6.37$ ;  $p = 0,01$ ). El análisis post hoc reveló que el grupo de ratas separadas de la madre-con estrés mostraron mayor porcentaje de freezing comparadas con las ratas criadas con la madre-estresadas y con el grupo control (criadas con la madre-sin estrés) ( $p < 0,05$ ) (Figura 22, B).

#### 4.3.4 Porcentaje de freezing (inmovilidad) durante la etapa de recuperación (evocación)

Se encontró una interacción entre los efectos producidos por la separación materna y el estrés crónico ( $F_{1,102} = 5.11$ ;  $p = 0,03$ ). El análisis post hoc reveló que el grupo de ratas criadas con la madre-con estrés y el grupo separadas de la madre-sin estrés mostraron menor porcentaje de freezing comparadas con las ratas controles (criadas con la madre-sin estrés) ( $p < 0,05$ ) (Figura 22, C).

El efecto de fluoxetine no se evidenció en ninguna de las etapas del test de miedo condicionado, por lo que no logró revertir las alteraciones producidas por el protocolo de separación materna o estrés crónico



respecto a la conducta de freezing. Los datos de los grupos tratados con vehículo y tianeptina se presentan colapsados (Figura 20).

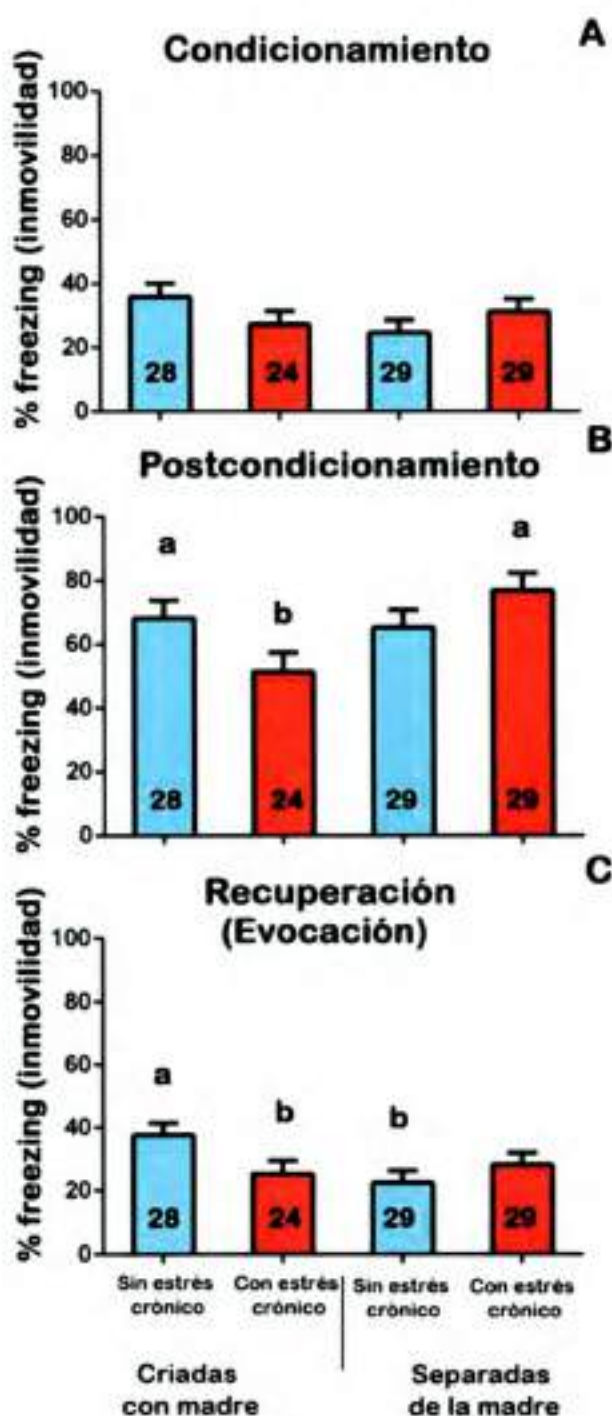


Figura 22. Efectos de la separación materna, el estrés crónico e impredecible y la tianeptina sobre la respuesta de freezing en un test de miedo condicionado. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El número de ratas se incluye en cada barra. (A) Etapa de condicionamiento, (B) Etapa de postcondicionamiento, (C) Etapa de recuperación. Los datos de los animales tratados con vehículo o tianeptina se presentan colapsados dado que el test de ANOVA reveló una interacción significativa entre la separación

materna y el estrés crónico. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ("a" distinto de "b") ( $p < 0,05$ ), test post hoc de LSD.

#### 4.3.1 Discusión

Empleamos el test de miedo condicionado para estudiar la relación entre la respuesta de los animales en un test que evalúa la memoria espacial y los cambios observados a nivel morfológico en el HD dado que esta estructura resulta esencial para el aprendizaje espacial. El test fue dividido y estudiado en etapas, en las cuales se contabilizó el porcentaje de freezing ante el contexto y se lo asoció a la memoria o capacidad de los animales para recordar el entorno en donde se realizó la prueba.

En la etapa de postcondicionamiento y en la de recuperación, las ratas criadas con la madre-con estrés exhibieron menores porcentajes de freezing ante el contexto, indicando una disminución de la memoria ante el contexto según el modelo adoptado. La vinculación entre la aplicación de protocolos de estrés crónico y el detrimento en el desempeño de tareas que requieren memoria contextual ha sido estudiada por diversos grupos experimentales durante décadas de investigación (consultar a Conrad 2010 y Moreira 2016 para una revisión).

El hipocampo tiene dos funciones interrelacionadas: da soporte a la memoria espacial y contextual y regula la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Su estimulación generalmente inhibe al eje HPA y su destrucción parcial o de sus eferentes mejora la actividad de este eje. En este estudio, el estrés crónico impredecible tendió a disminuir el volumen de capas apicales de CA1 y CA2/3, por lo que una hipótesis con respecto a la disminución de la conducta de freezing ante el contexto es que podría estar ligada a la alteración morfológica sufrida por el hipocampo. Con referencia a estos planteos, un paradigma de aislamiento social aplicado en forma crónica disminuyó tanto el volumen de CA1 como la respuesta de freezing de ratas hembras en una prueba de condicionamiento de miedo contextual (Pareda-Perez et al., 2013). De la misma manera, el estrés crónico podría haber influido en la desregulación del eje HPA como consecuencia de sus acciones morfológicas sobre el hipocampo. En estas condiciones, los glucocorticoides pueden exacerbar los efectos del estrés sobre la memoria contextual (Conrad, 2005). Sin embargo, las modificaciones en la respuesta de freezing ante el contexto tras la aplicación de protocolos de estrés crónico son dispares y varían de estudio en estudio. Empleando estrés mediante inmovilización algunos autores reportaron aumentos del freezing ante el contexto (Conrad et al., 1999; Sandi et al., 2001), mientras otros observaron una disminución de este comportamiento (Vander Weele et al., 2013; Yun et al., 2010).

Las consecuencias del estrés pueden diferir cuando el protocolo aplicado es de tipo impredecible. La adaptación exitosa al estrés crónico es un proceso dinámico que depende de ciertos atributos: severidad, modalidad y duración del paradigma utilizado (Herman, 2013). Entonces el afrontamiento exitoso de una determinada situación aversiva obedece en gran medida al nivel de control y a la predictibilidad de la

misma (Koolhaas et al., 2011). A modo de ejemplo, Das et al (2005) mostraron que ratas sometidas a un estrés crónico predecible (inmovilización) exhibieron un mejor aprendizaje en un test de evitación inhibitoria comparados con un grupo sometido a estrés crónico impredecible de la misma duración (Das et al., 2005). Por su parte, Ricon et al. (2012) demostraron que la exposición a un protocolo de estrés impredecible en ratas adultas produce déficits en el aprendizaje y memoria en tareas de evitación que dependen del contexto (shuttle-box). En este último caso, los autores enfatizan la importancia de la imprevisibilidad de los estresores frente a la severidad de los mismos. A diferencia de los regímenes de estrés variables o impredecibles (Chao et al., 1993; Herman et al., 1995) el estrés de inmovilización –repetido en el tiempo– no regula negativamente la expresión de ARNm de los receptores de glucocorticoides GR y MR en el hipocampo (Girotti et al., 2006), lo que sugiere que los mecanismos de retroalimentación neural permanecen intactos. No obstante, aun cuando los estresores se aplican de una manera variable e impredecible, algunos resultados difieren a los de esta investigación. Ratas sometidas a este tipo de protocolos de estrés se sensibilizaron ante el test de miedo condicionado, aumentando los porcentajes de freezing ante el contexto (McGuire et al., 2010), o bien mostraron menores porcentajes de freezing durante el postcondicionamiento pero mayores respecto a los controles durante la etapa de recuperación (Kanatsou et al., 2015). En otro estudio, el protocolo de estrés crónico y variable utilizado no influyó en el test de evitación pasiva ni en el condicionamiento del miedo asociado con un estímulo sonoro (tono), sin embargo, en ratas con un perfil de anhedonia, aumentó la respuesta de freezing en el condicionamiento de miedo ante el contexto (Henningsen et al., 2009). Cabe mencionar que cuando el estrés es variable, la diversidad de estresores, el tiempo de aplicación de cada uno y la duración del protocolo son diferentes en cada uno de los trabajos citados, factores que justifican la disparidad de los resultados. A su vez, el momento en que se realiza el test de miedo condicionado en relación al último estresor también es determinante. De hecho, las transformaciones nerviosas que ocurren en el hipocampo y la amígdala como consecuencia de los paradigmas de estrés crónico son dinámicas y reversibles (Conrad et al., 1999; McEwen, 1999; Sousa et al., 2000), siendo estos procesos los posibles responsables de los efectos observados en la memoria.

Por último, el hecho de que en el presente estudio los animales sometidos a estrés durante la adultez mostraran menores índices de freezing en relación con los controles no estresados nos condujo a preguntarnos si esa disminución podría estar aparejada a una habituación debida al hecho de que tanto el protocolo de estrés como el test de memoria incluyen eventos físicamente aversivos. Para responder esta pregunta se realizó otra prueba de memoria contextual carente de componentes nocivos que se discute en la siguiente sección (Test de Barnes).

Por el contrario, en las ratas sometidas a separación materna temprana, el estrés impredecible produjo una respuesta de freezing que se asemejó a la de los controles durante el post-condicionamiento. De acuerdo con lo anterior, el estrés crónico y variable en nuestro estudio originó diferentes resultados dependiendo de la interacción entre el ambiente temprano y el adulto. La interpretación de los efectos de

dicha interacción y su comparación con otros resultados conllevan cierta dificultad debido a las variaciones sustanciales que existen entre las cepas de los animales, la duración, frecuencia y edad de la aplicación de los protocolos de estrés, y la diversidad de test empleados para evaluar la memoria espacial en la bibliografía (Claessens et al., 2011). En última instancia, las consecuencias duraderas de la separación materna dependerán de la vulnerabilidad genética específica y de la combinación con un entorno específico en la edad adulta (Schmidt, 2011).

Por un lado, el efecto de la aplicación tanto de la separación materna como del estrés crónico sobre el comportamiento de freezing ante el contexto se corresponde nuevamente con la teoría del match/mismatch, dado que en el postcondicionamiento los valores se asemejan a los del grupo control, es decir, cuando el ambiente temprano y el posterior coinciden, se observan resultados similares en la variable estudiada. Por consiguiente, una posible interpretación sugiere que la separación materna promueve una serie de mecanismos adaptativos que le permiten a los individuos lidiar con el estrés durante la adultez y producir respuestas similares a los animales que no atravesaron ninguna situación estresante en su historia de vida (Daskalakis et al., 2013; Nederhof, 2012). Previos estudios de nuestro laboratorio indicaron que ratas macho sometidas a una separación materna temprana poseen mayor capacidad de afrontar el estrés crónico en la edad adulta (Renard et al., 2007; Renard et al., 2010). En estos animales, se detectaron niveles más bajos de ACTH y corticosterona plasmática en comparación con los animales solamente sometidos a estrés crónico en la adultez (Renard et al., 2007).

Ligado al resultado anterior, las ratas separadas de la madre (ambiente temprano hostil) no estresadas posteriormente (ambiente adulto favorable) exhibieron menores porcentajes de freezing durante la etapa de recuperación de la memoria en comparación con los controles (ambos ambientes favorables). Este desajuste o mismatch que también se presenta en las ratas estresadas sólo durante la vida adulta (ambiente temprano favorable, ambiente adulto hostil) coincide con el modelo previamente planteado.

Por otro lado, es importante destacar la influencia de la activación de la amígdala en tareas como la del condicionamiento de miedo (Conrad et al., 2004). Experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron incrementos de la actividad de Fos en la amígdala mediante inmunohistoquímica en animales separados de la madre y crónicamente estresados en la adultez comparados con los criados con la madre -tanto estresados en la adultez como en los no estresados- (Trujillo et al., 2015). Además, el estrés crónico incrementa la arborización dendrítica en la amígdala (McEwen, 2017; Vyas et al., 2002). Dado que esta estructura posee un abundante suministro de receptores de glucocorticoides, y los glucocorticoides son importantes para regular el condicionamiento contextual (Conrad et al., 2004), las neuronas de la amígdala de ratas con separación materna crónicamente estresadas podrían ser más sensibles a los niveles elevados de estas hormonas. Con respecto al hipocampo, el grupo de animales sometidos a los dos estresores exhibió un decremento en la expresión de receptores de glucocorticoides (Trujillo et al., 2015). Bajo estas circunstancias, el eje HPA podría estar desregulado, tal como sucede en el grupo de





animales sometidos sólo a estrés crónico. Durante situaciones emocionalmente demandantes como el condicionamiento de miedo, es plausible la hipótesis de que los grupos sometidos a estrés crónico durante la adultez (con y sin separación materna) secreten más glucocorticoides que los controles (Eiland & McEwen, 2012), por lo que el incremento en la arborización dendrítica de las neuronas de la amígdala en las ratas sometidas a separación materna y estrés crónico podría contribuir a facilitar el freezing ante el contexto. Este hecho podría enmascarar cualquier daño en la memoria contextual producido por alteraciones en el hipocampo que se observan típicamente en situaciones con baja estimulación emocional por parte del individuo.

La separación materna *per se* puede modificar el desempeño de tareas cognitivas como la memoria contextual, por lo que el resultado en este grupo de animales coincide con nuestras expectativas. Tareas como el condicionamiento de miedo evalúan la integridad funcional del hipocampo, porque requieren de la actividad del mismo. Nuestros resultados con respecto al volumen del HD no revelaron disminuciones en esta estructura en los grupos de animales separados de la madre, sugiriendo que el freezing ante el contexto es independiente del volumen de las capas apicales en donde hallamos diferencias. Del mismo modo, ratas separadas de su madre mostraron deficiencias en la adquisición de la memoria en el laberinto de agua de Morris (Huot et al., 2002), así como decrementos en la densidad de fibras musgosas en el estrato oriens del hipocampo durante la adultez, sin exhibir cambios en el volumen total del giro dentado.

Nuevamente, una revisión de la bibliografía provee resultados antagónicos con respecto a los porcentajes de freezing ante el contexto evaluados en la adultez de roedores previamente expuestos a separación materna. En algunos casos el estrés de separación no genera diferencias en la conducta de freezing (Arnett et al., 2015; Xiong et al., 2015), o bien propicia un aumento de la misma (Diehl et al., 2014; Sampath et al., 2014; Toda et al., 2014), o bien suscita un decremento sólo en ratas hembra (Kosten et al., 2006; Sun et al., 2014) o un decremento en ambos sexos (Chocyk et al., 2014; Wang et al., 2011). Estas inconsistencias pueden deberse en parte a factores metodológicos como la duración del protocolo de separación y la manera en que es realizada: si la madre permanece en la misma habitación que las crías, permitiéndoles escuchar el sonido de sus vocalizaciones, o si las crías permanecen juntas o individualmente aisladas durante el período de separación. La cantidad de cuidados maternos propia de cada cepa (Moore et al., 1997) y las diferencias en el comportamiento materno propias de cada madre pueden además influenciar la respuesta de freezing ante el contexto.

La inmovilidad tónica que implica la respuesta de freezing constituye una importante reacción defensiva y posee un amplio valor adaptativo. El comportamiento de congelación permite que las presas sean menos visibles, y la falta de movimiento puede ser también un potente inhibidor de la agresión en los depredadores, que a menudo abortan las respuestas de ataque y muerte. De hecho, una presa inmóvil es menos probable que sea atacada (Brandao et al., 2008). En la rata, las diferencias individuales en las respuestas endocrinas y de comportamiento frente al estrés se asocian a variaciones en la calidad de la

atención materna brindada en edades tempranas (Caldji et al., 2000). De forma predecible, la capacidad de respuesta al estrés de la descendencia se asemeja a la de sus madres: aquellas madres que exhiben menor cantidad de comportamientos de lamido (licking / grooming) y no adoptan una postura arqueada para amamantar son más temerosas que las madres que exhiben en mayor medida estos comportamientos. Del mismo modo, sus descendientes son más temerosos y tímidos que los de las madres con altos niveles de cuidados maternos (Francis & Meaney, 1999). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la separación materna temprana reduce los niveles de cuidados maternos (eficiencia reducida en el test de recuperación y traslado de las crías) (Aguggia et al., 2013), hecho que podría impactar sobre la respuesta de miedo ante el estrés generado por los shocks durante el test memoria. Brandao et al. (2008) consideran que existe un isomorfismo entre la respuesta de freezing que se genera ante estímulos contextuales emparejados con descargas eléctricas y el trastorno de ansiedad generalizada. Sometiendo a ratas Wistar al mismo protocolo de separación materna, en nuestro laboratorio se registró menor número de entradas a los brazos abiertos en un laberinto en cruz elevado en animales adultos en el caso de las separadas de la madre (Trujillo et al., 2015), indicando como consecuencia el carácter ansiogénico de nuestro paradigma de estrés temprano.

Atendiendo a las bases neurobiológicas que podrían explicar la relación entre los efectos nocivos a largo plazo de la exposición al estrés temprano sobre la memoria espacial, la separación materna puede disminuir los niveles de factores neurotróficos tanto en el hipocampo como en la amígdala (Aisa et al., 2009; Della et al., 2013). En particular, debido a las propiedades altamente protectoras del BDNF para los distintos fenotipos neurotróficos, una reducción de su expresión en el hipocampo después de la exposición a la separación materna podría influenciar la vulnerabilidad a las deficiencias en la memoria más tarde, en la vida adulta bajo situaciones estresantes o desafiantes para el individuo (Aisa et al., 2009). Asimismo, como secuela de la separación materna, puede ocurrir una disminución en la longitud de las dendritas de neuronas en el hipocampo ventral (Monroy et al., 2010) involucradas en respuestas emocionales como el condicionamiento del miedo (Hunsaker & Kesner, 2008; Zhang et al., 2014).

Por último, una reducción en el comportamiento de freezing durante el test de miedo condicionado se interpreta generalmente como un deterioro de la memoria contextual. Sin embargo, un menor porcentaje de freezing también podría ocurrir independientemente de los cambios en el aprendizaje (Chocyk et al., 2014). Dado que en esta investigación no se evaluó la respuesta de freezing ante un contexto diferente al del condicionamiento (Rudy et al., 2002), la misma podría estar desvinculada de la memoria contextual. De acuerdo con este análisis, los bajos porcentajes de freezing obtenidos en las ratas criadas con la madre-estresadas en la adultez y en las ratas separadas de la madre-sin estrés durante la etapa de recuperación podrían atribuirse a un incremento en la hiperactividad (Anagnostaras et al., 2001). Por ende, la actividad locomotriz de estos grupos podría ser mayor, aunque no fue valorada en nuestros experimentos. La hiperactividad puede influenciar la respuesta de freezing, no obstante aún no se conoce si el déficit en el freezing que se produce debido a las lesiones en el hipocampo es causado por



incrementos en la actividad locomotriz, o si el incremento de la actividad locomotriz y el decremento en el freezing son sintomáticos de un síndrome común como el déficit en el aprendizaje contextual (Maren & Fanselow, 1997).



## 4.5 EFECTOS DEL ESTRÉS CRÓNICO EVALUADOS EN EL TEST DE BARNES

### 4.5.1 Etapa de aprendizaje

- Cantidad de errores

No se encontraron diferencias significativas entre los animales controles y los crónicamente estresados en cuanto a la cantidad de errores en cada uno de los días de la etapa de aprendizaje (Figura 23, A).

- Tiempo de latencia al orificio de escape

La etapa de aprendizaje se realizó en cuatro días, y el test empleado reveló el efecto intra-sujetos *días de aprendizaje*. En los animales controles existe una diferencia significativa entre los tiempos registrados en el segundo día respecto al primero y en el cuarto día respecto al tercero. Por lo que estos animales aprendieron a encontrar el orificio de escape empleando tiempos significativamente menores entre el día 1 y 2, y entre el día 3 y 4 (Figura 23, B). En los animales sometidos al protocolo de estrés el tiempo de latencia del segundo día es significativamente menor que el del primero, pero no hay diferencias significativas entre los días subsiguientes (Figura 23, B). Por otra parte, no se encontraron diferencias teniendo en cuenta el factor entre-sujetos *estrés crónico* respecto a los tiempos de latencia en ninguno de los cuatro días estudiados.

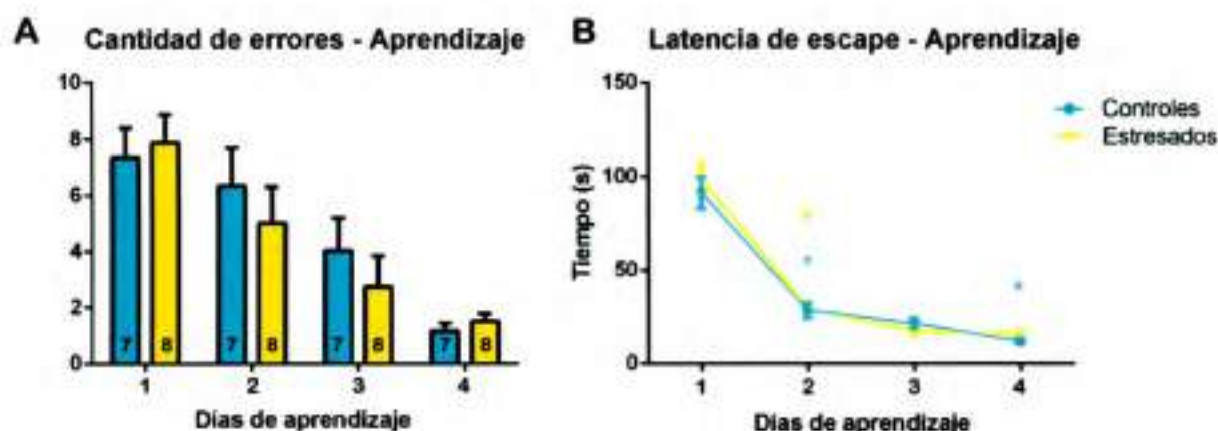


Figura 23. Efectos del estrés crónico durante la etapa de aprendizaje evaluados en el Test de Barnes. (A) Número de errores. El número de animales por grupo se indica en cada barra. (B) Tiempo de latencia al orificio de escape. Los símbolos representan diferencias significativas respecto al mismo grupo, el día anterior: (\*) diferencia significativa del grupo control con respecto al día anterior; (\*) diferencia significativa del grupo crónicamente estresado con respecto al día anterior. ( $p < 0.05$ ).

### 4.5.2 Etapa de prueba

Durante la etapa de prueba, los animales sometidos al protocolo de estrés crónico evidenciaron mayor cantidad de errores que los controles (Figura 24, A). No se encontraron diferencias significativas en el



tiempo de latencia al orificio de escape entre los dos grupos estudiados (Figura 24, B). La estrategia mayormente empleada por ambos grupos fue la *serial*, siendo la estrategia *espacial* la utilizada en segundo lugar por ambos grupos. Se destaca que la estrategia *espacial* fue más utilizada, en proporción, por los animales controles respecto de los estresados, sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa (Figura 24, C).

También se contabilizaron los intentos que cada grupo realizó a los distintos orificios de la plataforma. De las gráficas (Figura 25) puede observarse que los animales controles escogieron en mayor medida el orificio de escape (número 0) durante la prueba, mientras que los animales sometidos al protocolo de estrés crónico escogen tanto el orificio de escape (número 0) como el adyacente (número -1).

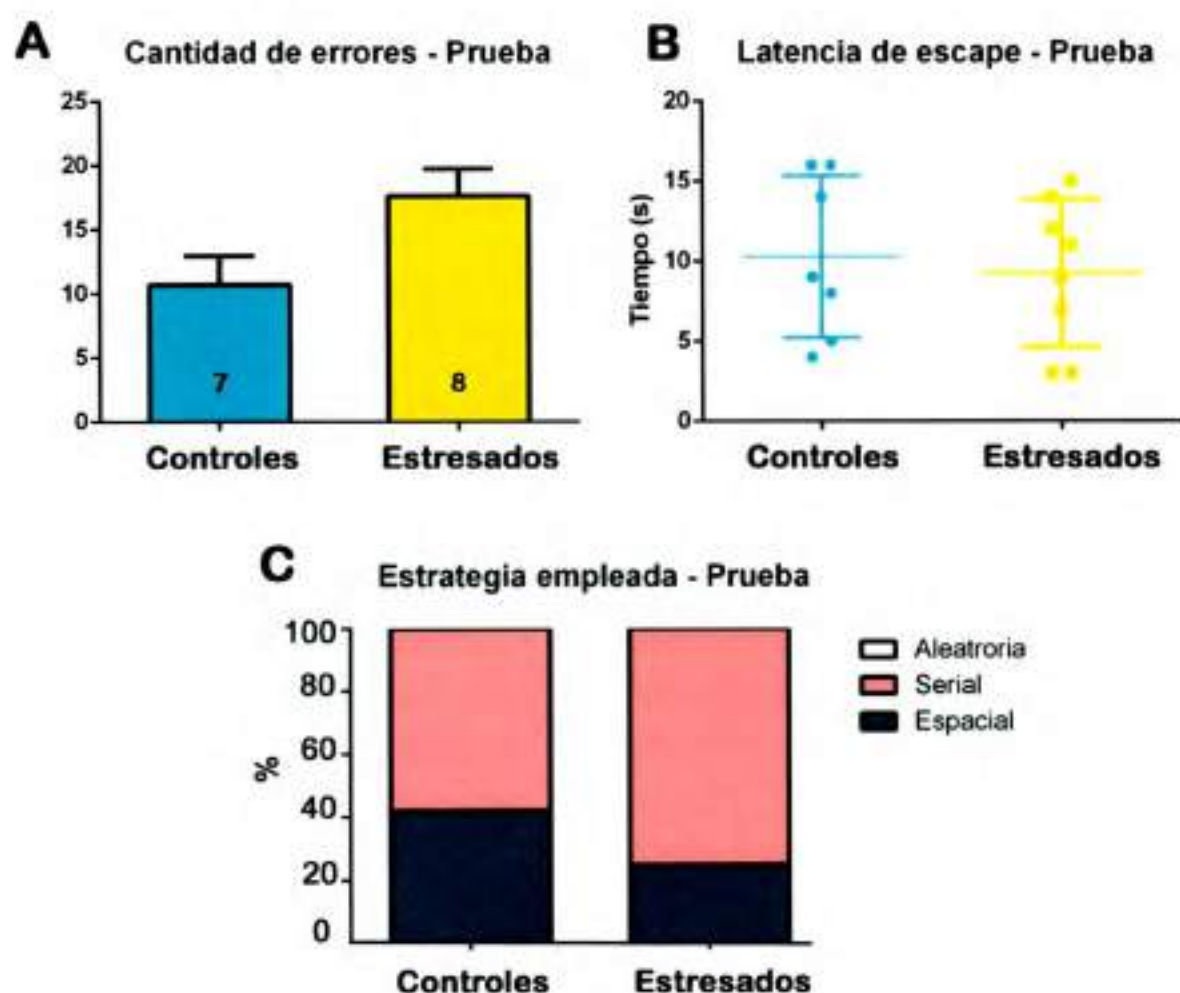


Figura 24. Efectos del estrés crónico durante la etapa de prueba evaluados en el Test de Barnes. (A), Cantidad de errores. El número de animales por grupo se indica en cada barra. Los animales estresados cometieron significativamente mayor cantidad de errores. (B), Tiempo de latencia al orificio de escape. (C), Estrategias utilizadas.



## Cantidad de intentos - Prueba

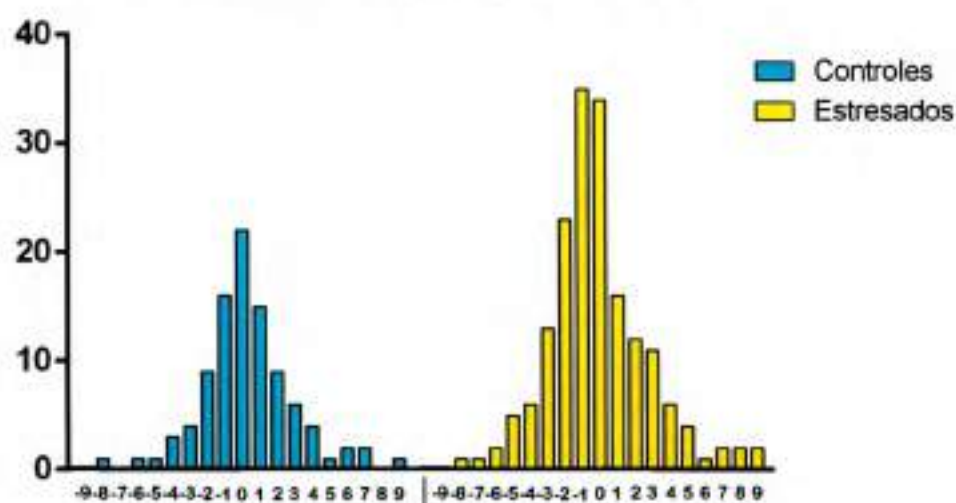


Figura 25. Efectos del estrés crónico durante la etapa de prueba evaluados en el Test de Barnes: cantidad de intentos en cada uno de los orificios, siendo el 10 el orificio de escape.

### 4.5.3 Discusión

Maniobrar con seguridad a través del medio ambiente es fundamental para la supervivencia de casi todas las especies. La navegación es la capacidad de los organismos para aprender a encontrar un camino a través del entorno sin perderse, lo que requiere memoria para aprender y recordar locaciones y rutas. Esta propiedad está codificada en el cerebro por un sistema que utiliza señales externas y distales al organismo (navegación aloentrópica) y un sistema que emplea el auto-movimiento, ciertas señales internas y cercanas (navegación egocéntrica). En la navegación aloentrópica están comprometidos el hipocampo, la corteza entorrinal y otras estructuras circundantes. Esta forma de memoria se evalúa en animales de laboratorio de muchas maneras, pero de manera predominante se utiliza el laberinto de agua de Morris (Vorhees 2014).

El objetivo de emplear el test de Barnes como método alternativo para evaluar la adquisición y recuperación de la memoria contextual surgió a partir de un interrogante planteado durante el desarrollo de la tesis por uno de los miembros evaluadores. Podría ocurrir que los animales sometidos solamente a estrés crónico respondieran al test de miedo condicionado con un menor porcentaje de freezing por estar habituados a estímulos negativos tales como los que experimentan durante el protocolo de estrés y luego durante el propio test mediante los shocks eléctricos. Para responder a esta pregunta, se utilizó un test carente de estímulos físicos nocivos que evaluara la memoria espacial de este grupo. Se eligió el test de Barnes dado que se asemeja al laberinto de agua de Morris pero utiliza estímulos menos aversivos, en



donde la búsqueda del escape se induce en los animales a través de luces brillantes que motivan al animal a guarecerse (Vorhees 2014).

Nuestros resultados indican que el estrés crónico variable e impredecible produce alteraciones en la memoria contextual durante la etapa de prueba del test de Barnes, que se manifiestan en la capacidad para encontrar el orificio de escape. Empleando este mismo test, Mclay y colaboradores (1998) suministraron corticosterona durante 81 días a ratas macho de dos meses de edad. Estos animales cometieron una mayor cantidad de errores durante el período de adquisición que los controles. Incluso cuando el período de administración de corticosterona es de 21 días, también generó mayores tiempos de latencia para alcanzar el orificio de escape y produjo mayor cantidad de errores durante el aprendizaje (Trofimiuk 2015; Darcet 2014). De manera similar, un paradigma de estrés mediante inmovilización durante 21 días (2 hs/día) produjo un mayor promedio de errores durante el período de adquisición en ratas machos Wistar (Wincewicz 2015) y una mayor latencia al orificio de escape (Trofimiuk 2008; Trofimiuk 2011) empleando el Barnes Maze.

El impacto del estrés crónico en el desempeño de tareas cognitivas está ligado a factores biológicos (como el sexo) (ter Horst 2012) y cronobiológicos (como la edad) (Ricon et al., 2012). Pero otros aspectos, tales como el período del día (diurno/nocturno) (Aslani 2014) en el que se implementa el protocolo de estrés o la predictibilidad (Koolhaas et al., 2011) también pueden modular la memoria y el aprendizaje, como se ha citado en párrafos anteriores. En este sentido, el trabajo de Wang et al. (2017) es comparable al nuestro puesto que aplicaron una serie de estresores de manera variable e impredecible durante 28 días a ratones macho adultos. Semejante a los efectos que reportamos, tanto la latencia al orificio de escape como la cantidad de errores se incrementaron en los ratones sometidos al estrés (Wang 2017).

En un meta-análisis realizado por Moreira y colaboradores (2016) se revisaron los resultados de 28 estudios que emplearon protocolos de estrés crónico tanto de inmovilización como variables e impredecibles (21 o 28 días de duración) en roedores adultos. En estos trabajos se cuantificó la performance de los grupos de animales estresados en los siguientes métodos validados: laberinto de agua de Morris, reconocimiento de objetos novedosos, laberinto de brazos radial y laberinto en Y. Se excluyeron aquellos trabajos que emplearon el test de condicionamiento del miedo y los test de evitación pasiva. Pese a la heterogeneidad observada en cada estudio, la conclusión general del análisis fue que la utilización de los diversos protocolos de estrés crónico conduce a alteraciones en el funcionamiento cognitivo, particularmente en la consolidación de las memorias aprendidas. Dando mayor solidez a nuestros hallazgos, el hecho de que la memoria en tareas de navegación espacial no se establece y permita su adecuada consolidación se manifestó en los animales estresados como: un aumento de la latencia al escape durante la fase de adquisición y una disminución del tiempo transcurrido en el

cuadrante de escape en el laberinto de agua de Morris, una disminución en el tiempo transcurrido ante un objeto nuevo y una mayor cantidad de errores en el laberinto de brazos radiales (Moreira 2016).

En síntesis, la performance en el test de Barnes de los animales estresados durante la adultez fue inferior a los controles, y sus porcentajes de freezing ante el contexto registrados en el test de miedo condicionado también fueron menores. Por esta razón, se decidió continuar con la evaluación de la memoria espacial mediante el test de miedo condicionado en todos los grupos experimentales, ya que los resultados en ambos test fueron coincidentes.



## 5. DISCUSIÓN GENERAL

La respuesta del organismo ante el estrés promueve la supervivencia a través de ajustes en los procesos fisiológicos y de comportamiento. Los procesos que se activan e interactúan incluyen los sistemas autonómicos, endocrinos e inmunes y conductuales, que producen una respuesta de estrés integrada. Si bien inicialmente son adaptativos, la activación prolongada de las vías moleculares comprometidas por estos sistemas puede provocar cambios pronunciados en la fisiología y el comportamiento que tienen implicancias perjudiciales a largo plazo para la supervivencia y el bienestar. En esencia, el estrés prolongado o crónico cambia las reglas bajo las cuales el cuerpo regula la homeostasis, lo que requiere nuevas estrategias para una adaptación exitosa. Esta adaptación tiene un costo para el organismo, ya que los sistemas efectores del estrés se movilizan crónicamente para satisfacer las demandas homeostáticas cuando el estrés se prolonga. Por lo tanto, el estrés altera el medio fisiológico a largo plazo, y la respuesta del organismo a estos cambios se encuentra en cierto punto medio, pivotando entre la resiliencia exitosa ante el estrés y su transición a la patología, como por ejemplo la depresión.

Los recientes intentos para comprender los mecanismos que subyacen a la depresión se han centrado en estudiar las interrelaciones entre genética, las variaciones en la morfología o neuroactividad de estructuras límbicas y la influencia del ambiente, que afectan el riesgo de desarrollar el trastorno (Little et al., 2015). Con el afán de reproducir algunos de estos factores, empleamos un modelo animal de separación materna temprana, estrés crónico e impredecible en la adultez y la administración de un antidepresivo para poder estudiar sus efectos sobre aspectos neurobiológicos y conductuales relacionados con esta patología.

Encontramos que el estrés crónico e impredecible produjo: una disminución de la cantidad de neuronas serotoninérgicas activas en el núcleo dorsal del rafe (NDR), una tendencia a disminuir el volumen del estrato apical de CA1 y CA2/3 del hipocampo y una disminución de la memoria contextual. En los objetivos planteamos que las posibles disminuciones en la memoria podrían surgir como consecuencia de las disminuciones de los volúmenes de hipocampo analizadas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados recabados en este trabajo, y dado que las alteraciones del circuito serotoninérgico también pueden incidir en la morfología dendrítica del hipocampo (Kraus et al., 2017; McKittrick et al., 2000; Wirth et al., 2017), las disminuciones en la memoria contextual producidas por el estrés en la adultez podrían guardar estrecha relación con el circuito serotoninérgico, en un modelo propuesto en la Figura 26.

Además de su papel bien establecido como neurotransmisor, la serotonina (5HT) está involucrada en varios aspectos del desarrollo neuronal, incluido el desarrollo de neuritas, la regulación de la morfología somática, el crecimiento del cono de motilidad, la sinaptogénesis y el control de la forma y densidad de las espinas dendríticas. Los efectos morfogénicos de 5HT están regulados por el desarrollo, y la disponibilidad de este neurotransmisor durante etapas sensibles del desarrollo que puede modular la



formación y funciones de redes neuronales conductualmente relevantes en la edad adulta (Wirth et al., 2017).



Figura 26. Posibles relaciones entre las variables estudiadas

Dentro del NDR existen neuronas que se proyectan hacia estructuras como la amígdala, la sustancia negra y el hipocampo (Gaspar & Lillesaar, 2012; McQuade & Sharp, 1997). En este último, una disminución en los niveles de 5HT reduce la longitud dendrítica y afecta la formación de espinas en las neuronas (Alves et al., 2002). Las funciones morfogénicas de la 5HT en el cerebro han sido estudiadas observando los efectos de distintos antidepresivos (tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de 5HT (ISRS), MAO-A) en la reversión de los cambios morfológicos inducidos por el estrés en neuronas granulares del hipocampo (Bessa et al., 2009; Jayatissa et al., 2006; Morais et al., 2014). Adicionalmente, la 5HT a través de sus receptores  $5HT_{1A}$  puede dar forma a los circuitos del hipocampo modulando el crecimiento dendrítico en CA1 (Ferreira et al., 2010), atenuando la motilidad de los conos dendríticos de crecimiento y reduciendo el contenido de los filamentos de actina (Dühr et al., 2014; Rojas et al., 2014). Nuestros resultados indican una posible asociación entre los fenómenos observados en el grupo de ratas estresadas únicamente en la adultez en relación a la cantidad de neuronas serotoninérgicas activas y las disminuciones en los estratos apicales de CA1 y CA2/3 del hipocampo.

En lo que se refiere a la memoria, los animales estresados durante la adultez exhibieron menores porcentajes de freezing ante el contexto comparados con los controles tanto en el período de postcondicionamiento como en la recuperación. Al mismo tiempo, estas ratas presentaron una menor activación de las neuronas serotoninérgicas en la subdivisión DRL. Dentro de esta región, las neuronas serotoninérgicas poseen gran tamaño en comparación con las otras subpoblaciones, y su morfología es multipolar. El DRL recibe aferencias de estructuras involucradas en la regulación autonómica y el comportamiento emocional, incluyendo la corteza infralímbica, el núcleo central de la amígdala, el núcleo preóptico medial, el núcleo del lecho de la estria terminal, y el núcleo lateral y perifornical hipotalámico. Además recibe proyecciones directas desde la retina. Contiene una gran población de neuronas aferentes que expresan el neurotransmisor inhibitor GABA, y éstas podrían ser las responsables de ejercer un control inhibitorio de otras neuronas serotoninérgicas dentro del NDR (Hale & Lowry, 2011). En el DRL, las neuronas serotoninérgicas podrían ser parte de un sistema de control simpatomotor que posee conexiones multisinápticas con neuronas presimpatomotoras en la médula espinal innervando las glándulas



adrenales y los músculos de los miembros posteriores (Kerman et al., 2006). En función de sus aferencias y eferencias, estas células están ubicadas idealmente para regular las respuestas de lucha o huida u otros comportamientos emocionales que involucran cambios en el tono muscular, tales como la respuesta de freezing (Crawford et al., 2010; Hale & Lowry, 2011). De hecho, la activación de las neuronas en la región DRL produce respuestas de tipo pasivas en el individuo que consisten en estados de quiescencia, hipotensión, bradicardia e hiporreactividad ante los estímulos ambientales (Bandler et al., 2000). Estudios mediante electrofisiología sugieren que las neuronas serotoninérgicas del DRL poseen mayor excitabilidad y tasas de disparo más altas *in vitro* comparándolas con las neuronas que se encuentran en la región DRV (Crawford et al., 2010). De lo anterior puede deducirse que una desregulación en su activación puede incrementar la vulnerabilidad para afrontar fenómenos estresantes de tipo inescapables. El hecho de que estos animales exhibieran menores porcentajes de freezing en el test de miedo condicionado sugiere que sus estrategias de afrontamiento ante el estrés podrían relacionarse con la falta de actividad de las neuronas 5HT en el DRL.

Según nuestros resultados, en los animales estresados se evidenció un deterioro de la memoria paralelo a una tendencia a la disminución morfológica del estrato apical en las áreas CA1 y CA2/3. Las ratas no solo son capaces de asociar señales discretas con un estímulo aversivo, sino que también pueden asociar una colección de señales contextuales con un shock. El condicionamiento de miedo es el proceso mediante el cual se adquiere esta asociación. Las implicancias del HD en este proceso se demuestran a partir de lesiones electrolíticas antes o después del entrenamiento que afectan al condicionamiento ante el contexto. Experimentos recientes que utilizan técnicas de optogenética revelan que durante el condicionamiento, subconjuntos de células granulares en el giro dentado codifican la memoria ante el contexto (Bauer, 2015; Kheirbek et al., 2013; Liu et al., 2012). Este recuerdo se puede recuperar o evocar cuando esas subpoblaciones específicas de neuronas se activan (Bauer, 2015). Si bien entonces el rol del HD en la memoria dependiente del contexto ha sido demostrado, la relación entre volumen de hipocampo y la memoria continúa bajo análisis, dado que un mayor volumen no necesariamente implica un mejor desempeño cognitivo, y además existen incompatibilidades en los datos recabados de diferentes estudios. Es decir, existen inconsistencias debido a las diferencias en las técnicas: histológicas, estadísticas y de medición. Incluso independientemente de las técnicas, los estudios han sido diseñados para responder diferentes preguntas y así tratar a los animales de manera diferente, creando variaciones biológicas imprevistas (Roth et al., 2010). Aun cuando existe consenso en establecer causalidad cuando se trata de las consecuencias de los protocolos de estrés crónico sobre la memoria (Conrad et al., 2017; Moreira et al., 2016), no puede confirmarse que las disminuciones en el volumen del hipocampo originen los déficits observados en el comportamiento (Roth et al., 2010). De hecho, en este trabajo la separación materna también produjo déficits en la recuperación de la memoria a largo plazo en nuestro trabajo, siendo que en este grupo los volúmenes del HD se asemejaron a los controles. No obstante, algunos autores hallan coherencia entre los cambios estructurales del hipocampo y los déficits cognitivos en

tareas que dependen de esta estructura (McLaughlin et al., 2007; Molet et al., 2016; Ohi et al., 2000); inclusive otros reportan correlaciones negativas entre estas dos variables en ratas (Clausen et al., 2005; Luo et al., 2014) o bien en humanos (Hagemeyer et al., 2016). Algunos estudios clínicos predicen deterioros de la memoria de navegación como consecuencia de una reducción volumétrica del hipocampo (Guderian et al., 2015). En ratas hembras también se reportaron déficits en la memoria espacial acompañadas de una reducción del volumen del hipocampo, así como la pérdida de neuronas, astrocitos y células de microglia como consecuencia de la ingesta de etanol durante la adolescencia (Oliveira et al., 2015). Por último, Moser y colaboradores (1993) encontraron un valor umbral en la disminución del volumen del área CA1 (producida a partir de lesiones por aspiración) por debajo del cual el aprendizaje espacial en el test de laberinto de agua de Morris se expresa de manera normal. Ese umbral fue el 20%, y a partir del mismo se produjeron déficits duraderos en la latencia de escape (Moser et al., 1993). En comparación, las reducciones reportadas en este trabajo rondan el 35% en el caso de CA1, dando sostén tanto a los resultados obtenidos en el test de miedo condicionado como a los del test de laberinto de Barnes.

El miedo condicionado involucra diferentes etapas de la memoria. Se denomina adquisición del miedo al aprendizaje inicial de la asociación entre el contexto y el shock. Esta memoria se consolida en recuerdos estables y duraderos dependientes de la síntesis de proteínas durante las 24 horas posteriores a la adquisición del miedo. Al día siguiente, cuando al animal se le presenta el contexto sin el shock, la memoria es recuperada, conduciendo a la expresión de la respuesta de miedo, es decir el freezing (Bauer, 2015). Las manipulaciones, como el protocolo de estrés en nuestro caso o la administración de una determinada droga, pueden alterar cualquiera de estas etapas dependiendo el tiempo en el que ocurren; previos al entrenamiento, o después del mismo. Las contribuciones de Kesner y sus colaboradores (Kesner et al., 2004; Lee & Kesner, 2004) testeando el rol específico de las áreas del hipocampo en la adquisición y recuperación de la memoria, utilizando el paradigma del condicionamiento de miedo ante el contexto, sugieren que tanto CA2/3, CA1 y giro dentado están involucradas en la adquisición rápida de la memoria contextual en la fase inicial. La participación de CA2/3 parece ser importante en la etapa más temprana de adquisición, presumiblemente para desarrollar una representación instantánea del contexto. El papel de CA2/3, sin embargo, es mínimo en la etapa de recuperación de la memoria contextual después de un período de tiempo prolongado (es decir, 24 h), mientras que las otras subregiones participan en mayor medida (Lee & Kesner, 2004). Mediante el daño químico del giro dentado (Hernandez-Rabaza et al., 2008) así como también mediante la inhibición por optogenética (Bernier et al., 2017), pudo confirmarse que la integridad del giro dentado es fundamental para establecer una representación coherente del contexto en el que las experiencias emocionales, ya sean hedónicas o aversivas, están vinculadas.

En el marco de las observaciones precedentes, nos parece interesante destacar que el protocolo de estrés impredecible afectó principalmente a los estratos apicales de las áreas CA1 y CA2/3, conformados



en su mayoría por dendritas. Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios evidenciando que es más probable que el estrés crónico y los glucocorticoides influyan en la arborización dendrítica de las zonas apicales de las regiones CA que en las regiones dendríticas basales o piramidales donde se encuentran los somas (para una mejor revisión leer Conrad 2017). La información proveniente de las células granulares del giro dentado podría interrumpirse debido a la disminución de la plasticidad sináptica en CA2/3, dando como resultado un bloqueo de la adquisición inicial de un nuevo contexto espacial (Lee & Kesner, 2004), y a su vez de la recuperación de la memoria ante el contexto como consecuencia de las remodelaciones sufridas en CA1.

Por otra parte, la separación materna temprana también produjo una disminución de la recuperación de la memoria ante el contexto. Ciertas manipulaciones, como el enriquecimiento del ambiente o el entrenamiento intensivo pueden revertir los efectos estructurales del estrés sobre el hipocampo (Hutchinson et al., 2012; Yau et al., 2011) incrementando su complejidad dendrítica y simultáneamente afectando la conducta. En consecuencia, nosotros esperábamos que la influencia positiva que el antidepressivo tianeptina ejerció en las ratas separadas de la madre sobre el volumen de las dendritas apicales en las áreas CA1 y CA2/3 pudiera traducirse en un buen desempeño en el test de miedo condicionado. Sin embargo, los grupos tratados con tianeptina y aquellos tratados con vehículo presentaron comportamientos similares en dicho test. El menor porcentaje de freezing durante el período de recuperación -memoria a largo plazo- de estos animales no guarda una relación evidente con los cambios morfológicos en el HD, así como tampoco con la cantidad de neuronas serotoninérgicas activas en el NDR. Podría inferirse que en este grupo de animales los mecanismos o procesos subyacentes son diferentes a los que acontecen en los animales que experimentan estrés sólo en la vida adulta. Las causas que inciden en la conducta observada se individualizaron en secciones anteriores, e incluyen factores de tipo emocionales o neurobiológicos. Entre los primeros se encuentra la calidad de la atención materna dado que puede modificarse en las madres que son separadas de sus crías (Aguggia et al., 2013). Mientras que a nivel biológico la disminución de los niveles de factores neurotróficos como consecuencia del protocolo de separación (Aisa et al., 2009; Della et al., 2013) y la influencia de alteraciones en estructuras relacionadas a la emocionalidad del test como es el caso del hipocampo ventral o la amígdala (Monroy et al., 2010) pueden acompañar a la separación materna y contribuir a explicar sus efectos sobre la memoria. Sin embargo, aun cuando estos fenómenos pueden dar soporte al comportamiento, como respuesta global e integral, una de las principales consecuencias de la separación materna temprana es la desregulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), o su reprogramación.

La presencia y los cuidados maternos mejoran la respuesta cardíaca, aumentan la secreción de la hormona de crecimiento y regulan el ritmo de sueño/vigilia, a la vez que suprimen la actividad del eje HPA. Los roedores neonatos son hipo responsivos al estrés durante las primeras dos semanas de vida (Levine, 1994; Schmidt et al., 2003). Este período se caracteriza por niveles de corticosterona circulante bajos y estables, y una menor reacción ante estresores que generalmente dispararían profundas respuestas tanto

de ACTH como de corticosterona en un individuo adulto. La hipo responsividad del eje se ha atribuido a la presencia de la madre, dado que los niveles basales de ACTH y corticosterona aumentan lentamente si las crías se separan durante un único episodio de 24 h de sus madres, alcanzando niveles máximos después de 8 h (Levine, 1994), por lo que el período de hipo respuesta se interrumpe y la secreción adrenal de corticosterona comienza a responder ante estresores de mediana intensidad y ante ACTH exógena (Schmidt et al., 2002). En suma, los factores metabólicos y sensoriales proporcionados por la madre contribuyen a dar forma al fenotipo de la cría, determinando su susceptibilidad ante el estrés. En la literatura existen numerosos reportes acerca de alteraciones que ocurren en los niveles de ACTH o de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), o la redistribución que sufren los receptores de glucocorticoides GR y MR en el hipocampo tras la separación materna, cuando los animales son adultos (Aise et al., 2009; Ladd et al., 2005). Adicionalmente, para el adecuado almacenamiento y expresión de la información contextual se necesita un ajuste fino en los niveles de estos receptores (Harris et al., 2013; Souza et al., 2014). Durante el estrés como sucede en el test de miedo condicionado, la corticosterona promueve, a través de los receptores MR, la defensa contra el estresor, mientras que los efectos mediados por GR facilitan el afrontamiento ante el estresor y el almacenamiento de los eventos estresantes en la memoria (Oitzl et al., 2010). Concretamente, el bloqueo de los receptores MR antes de la recuperación puede reducir de manera significativa la expresión de la memoria contextual en el test de miedo condicionado (Zhou et al., 2011). La privación materna de 24 hs en el día post natal (DPN) 3 produce consecuencias a largo plazo disminuyendo la expresión de receptores tanto GR como MR en el hipocampo (Sutanto et al., 1996), y la separación materna repetida conjuntamente con otros procedimientos que perturban el sistema serotoninérgico generan una disminución en la expresión del mRNA del receptor MR en la amígdala (Sachs et al., 2015). El balance MR/GR puede modificarse entonces mediante eventos que programan la vida temprana como el estrés prenatal y las interacciones madre-cría. Otro mecanismo a través del cual la separación materna puede vulnerar al eje HPA es la activación de procesos epigenéticos específicos relacionados con los promotores de GR en el hipocampo (Oitzl et al., 2010; Weaver, 2007).

Por todo lo anterior, es posible que la alteración del eje HPA constituya un pilar fundamental para interpretar nuestros resultados con respecto a la memoria contextual en estos animales. En una revisión realizada por Tractenberg et al. (2016) acerca de los efectos conductuales de la separación materna temprana en roedores (teniendo en cuenta trabajos que emplearon en sus diseños distintas cepas de ratones), en la cual se analizaron aspectos relacionados con la ansiedad, la depresión y la memoria, el hallazgo con mayor consistencia a través de todos los estudios abordados es el de la asociación entre la separación materna y los déficits de rendimiento en la memoria (Tractenberg et al., 2016). Por lo tanto, nuestros resultados enfatizan la importancia de la experiencia de la vida temprana en la modulación del comportamiento a largo plazo, específicamente con respecto a la memoria contextual de miedo.



La presente tesis tuvo como objetivo averiguar si el estrés de separación materna era suficiente como para incrementar la vulnerabilidad para desarrollar depresión ante un estrés crónico e impredecible durante la adultez. Para ello, nos basamos en el marco teórico de la teoría de diátesis-estrés, herramienta conceptual que permite comprender cómo ciertos factores predisponentes aumentan la susceptibilidad y, finalmente, crean condiciones suficientes para el desarrollo de este trastorno. Estudiamos variables tanto neurobiológicas como conductuales, asociadas a la depresión en nuestros grupos experimentales para analizar la interacción que se produce entre el ambiente temprano y el adulto bajo estas situaciones adversas y crónicas. Sin embargo, cuando se trata de los efectos provocados por estos estímulos o factores predisponentes sobre la salud, existen dos visiones contrapuestas: la teoría acumulativa del estrés o doble golpe (Cotella et al., 2014) y la teoría del ajuste-desajuste (*match/mismatch*). En el caso de los animales sometidos a un historial de estrés consecutivo, es decir separados de la madre en la edad temprana y luego estresados en la adultez en forma impredecible, algunas de las variables de estudio alcanzaron valores similares a los animales controles, a favor de la segunda hipótesis. Este fue el caso de la cantidad de neuronas serotoninérgicas activas en el NDR a -8,04 mm desde el bregma y los niveles de *freezing* durante la etapa de post-condicionamiento en el test de memoria utilizado. Si bien la memoria contextual fue evaluada en función de las posibles modificaciones en el volumen del HD, como ya hemos discutido, el circuito serotoninérgico también es capaz de modular la conducta de miedo ante el contexto. Las estructuras involucradas en el aprendizaje y la expresión de conductas de miedo, incluidas la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal, contienen concentraciones densas de receptores para 5HT (Bauer 2015). Particularmente, el hipocampo recibe inervación serotoninérgica desde el NDR (Gaspar & Lillesaar, 2012; McQuade & Sharp, 1997), donde genera tanto la despolarización de neuronas inhibitorias como la reducción de la excitabilidad de las neuronas piramidales (Burghardt & Bauer, 2013).

La 5HT modula los circuitos y las neuronas que intervienen en el aprendizaje del miedo ante el contexto de una manera compleja (Bauer, 2015), debido a que cualquiera de los distintos subtipos de receptores proveniente de las siete familias (5HT<sub>1-7</sub>) puede estar presente tanto en células glutamatérgicas como GABAérgicas, y más de un subtipo de receptor de 5HT puede estar presente en una única neurona. Por otra parte, la 5HT puede generar efectos diferenciales en el comportamiento dependiendo de la región del cerebro a la cual se dirige (Bauer, 2015). Respecto a la relación entre los niveles de 5HT y el condicionamiento del miedo, los datos muestran que tanto los aumentos como disminuciones en los niveles de 5HT mediante modificaciones genéticas se asocian con un mayor porcentaje de *freezing* ante el contexto (Homberg, 2012). Posiblemente, esto indica que existe una relación en forma de U entre los niveles de 5HT y el condicionamiento (Figura 27), de manera tal que niveles demasiado bajos o demasiado altos de 5HT facilitan este proceso, mientras que el rango normal de niveles de 5HT es menos efectivo (Homberg, 2012). Según nuestros resultados, en los animales sometidos a ambos protocolos de estrés, los niveles de neuronas serotoninérgicas activas se asemejan a los valores controles, y durante la

etapa de postcondicionamiento los porcentajes de freezing ante el contexto también están aparejados, indicando una posible asociación entre estas variables.



**Figura 27.** Relación entre los niveles de 5HT y el miedo condicionado. La bibliografía sugiere que tanto niveles considerablemente altos como considerablemente bajos incrementan el aprendizaje asociativo y fortalecen la vinculación entre el estímulo condicionado y el shock.

Los mecanismos a través de los cuales la 5HT interviene en la expresión de la memoria de miedo pueden involucrar en primer término al sistema CRH en el NDR, que a su vez proyecta hacia regiones cerebrales relacionadas con el procesamiento del miedo (Hornberg, 2012). De hecho, Ohmura y colaboradores (2010) encontraron que una inyección de un antagonista del receptor  $CRH_2$  pero no del antagonista del receptor  $CRH_1$  dentro del NDR suprime significativamente la expresión del freezing ante el contexto empleando el test de miedo condicionado (Ohmura et al., 2010). En segundo término, se encuentran los distintos subtipos de receptores de 5HT que participan en sus acciones excitatorias e inhibitorias (Burghardt & Bauer, 2013). Por ejemplo, la inyección sistémica de un agonista del receptor  $5HT_{2A}$  - presente en gran medida en el hipocampo, la corteza prefrontal medial y en el núcleo lateral de la amígdala- inmediatamente después del condicionamiento, facilita el freezing ante el contexto en ratones, sugiriendo una importante influencia en la consolidación de las memorias de miedo (Zhang et al., 2013). A diferencia de los receptores  $5HT_{2A}$ , el receptor  $5HT_{1A}$  se expresa como un autorreceptor en el NDR y como heterorreceptor en las regiones del cerebro anterior, cada uno de los cuales media diferentes aspectos de la señalización de 5HT. Como autorreceptor, el receptor  $5HT_{1A}$  limita la liberación de 5HT en las terminales nerviosas y reduce el tono serotoninérgico general. La infusión de un agonista de  $5HT_{1A}$  en el núcleo del rafe reduce los niveles de freezing ante el contexto (Borelli et al., 2005; Silva et al., 2004). Como heterorreceptor, la infusión de un agonista de  $5HT_{1A}$  en el hipocampo o en la amígdala basolateral también disminuye la expresión de freezing ante el contexto (Song et al., 2006; Stiedl et al., 2000). Por último, el sistema serotoninérgico puede estar influenciado por variaciones genéticas. La variación del gen serotoninérgico más estudiada es el 5-HTTLPR, un polimorfismo en la región promotora del gen del transportador de 5HT (SERT). La variante s-alélica se asocia con una transcripción disminuida del gen en comparación con el alelo largo (l), así como una función reducida de SERT. Presumiblemente, esto conduce a un aumento de los niveles de 5HT extracelular. De acuerdo con lo descrito, se ha reportado



que los portadores del alelo *s* exhiben mayores porcentajes de freezing ante el contexto (Garpenstrand et al., 2001).

En base a nuestros resultados, consideramos que la separación materna temprana puede haber modificado alguno de los citados mecanismos, constituyendo verdaderos medios de programación que modificarían la conducta registrada durante el test de condicionamiento en los animales que luego fueron sometidos al estrés crónico e impredecible. Para ejemplificar estos supuestos, la separación materna produce: una redistribución de receptores CRH<sub>1</sub> y CRH<sub>2</sub> en el NDR (Bravo et al., 2011); variaciones en la sensibilidad del autorreceptor 5HT<sub>1A</sub> (Gartside et al., 2003) y en su expresión (Bravo et al., 2014) en el NDR; y aumentos en la expresión del transportador de 5HT en la amígdala (Vicentic et al., 2006). Todas estas mediciones se llevaron a cabo en animales adultos.

En los animales sometidos tanto a separación materna como al protocolo de estrés en la adultez, los efectos sobre el volumen del HD y sus áreas fueron dependientes del antidepresivo tianeptina. Los resultados de la utilización de este antidepresivo fueron diferentes dependiendo del estresor, dado que en las ratas separadas tendió a incrementar el volumen de los estratos apicales de CA1, CA2/3 y el estrato molecular del giro dentado, mientras que en las ratas separadas y estresadas en la adultez su efecto fue el contrario. Estimamos que este comportamiento disímil de tianeptina se debe a sus características farmacológicas y a su mecanismo de acción, dado que los últimos hallazgos revelan que es un agonista de los receptores de opioides de tipo mu y en menor medida delta (Gassaway et al., 2014). Las tres clases bien definidas de receptores opioides (delta, kappa y mu) se han estudiado en relación a la fisiopatología de la depresión y a su tratamiento (Lutz & Kieffer, 2013; Richards et al., 2016). Los ratones que carecen del receptor opioide delta a lo largo de la vida demuestran niveles aumentados de conductas relacionadas con la ansiedad y la depresión (Filiol et al., 2000) y los agonistas a este receptor tienen propiedades antidepresivas en modelos preclínicos (Naidu et al., 2007; Torregrossa et al., 2006).

Varios descubrimientos previos pueden clarificar las acciones de tianeptina reflejadas en este trabajo. Desde lo general a lo particular, en primer lugar el sistema de opioides contribuye a la mediación, modulación y regulación de las respuestas de estrés tanto endócrinas (sobre el eje HPA), autonómicas y de comportamiento (Drolet et al., 2001). En efecto, la expresión de los receptores de opioides en el hipocampo es modificada por un protocolo de estrés crónico por inmovilización (Randesi et al., 2018). En segundo lugar, la activación de receptores de opioides en el hipocampo genera cambios morfológicos relacionados con la conectividad y plasticidad sináptica en esta estructura. Particularmente, los receptores mu-opioides se expresan en gran medida en el hipocampo, y su activación disminuye la actividad de las interneuronas inhibitoras, desinhibiendo así a las neuronas glutamatérgicas en el área CA1 (Svoboda et al., 1999) en forma consistente con los reportes de los efectos potenciadores de la tianeptina sobre la excitabilidad y la plasticidad sináptica en CA1 (McEwen et al., 2010). Cabe agregar también que los opioides endógenos son capaces de incrementar la expresión del ARNm para el factor neurotrófico



derivado del cerebro (BDNF) a través de los receptores mu y delta (Zhang et al., 2006). En tercer lugar, el sistema de péptidos opioides endógeno no está completamente desarrollado en el momento del nacimiento, por lo que es susceptible de alterarse a corto y/o largo plazo mediante manipulaciones del entorno postnatal. De hecho, el sistema de opioides es sensible a los efectos de la separación materna, que se manifiestan en áreas relacionadas con el estrés y el sistema de la recompensa (Gustafsson et al., 2008) alterando la densidad de sus receptores delta en amígdala (Floj & Nylander, 2003), o la expresión de genes implicados en las vías de señalización de los opioides endógenos (Sachs et al., 2018). Adicionalmente, la activación de los receptores de opioides podría mediar los circuitos neurales de las conductas de apego. Éstas implican la exhibición de comportamientos afiliativos, el establecimiento del vínculo entre la madre y la cría, y la manifestación de la angustia emocional durante los períodos de separación (Moles et al., 2004). La conducta de apego es el contacto íntimo con la madre que permite el desarrollo normal de los comportamientos sociales y emocionales (Lutz & Kieffer, 2013). En este orden de ideas, ratones knock-out para el receptor de opioides mu emitieron menos vocalizaciones ultrasónicas que los controles cuando fueron separados de sus madres y no mostraron preferencias ante las señales maternas (Moles et al., 2004), acentuando el rol de estos receptores -a los que se une tianeptina- en el establecimiento del vínculo madre-cría, y en la atenuación de la respuesta al estrés inducida por la separación materna. Una posible explicación con respecto a los efectos de tianeptina en los animales separados, podría deberse a la unión de este antidepresivo con su ligando (receptor mu), aumentando el volumen de los estratos apicales en el HD. Esto último debido a los efectos de la activación de los receptores mu sobre el BDNF, afectando al volumen de los animales sometidos a los dos protocolos de estrés. Soportando esta hipótesis, García-Gutiérrez y colaboradores observaron reducciones en los niveles de BDNF en el hipocampo de ratones separados de la madre, pero incrementos de los receptores de mu-opiáceos en esta estructura (García-Gutiérrez et al., 2016).

Una de las mayores limitaciones de este trabajo fue que las variables analizadas no fueron testeadas en ratas hembra, dado que se conoce que existen diferencias de género con respecto al desarrollo de psicopatologías como la depresión, con un mayor riesgo en el caso de las hembras (Gater et al., 1998; Weissman et al., 1993). Además en algunos casos la cantidad de animales empleada durante el desarrollo experimental condujo a resultados con altos niveles de error, y por consiguiente algunos efectos no alcanzaron significación estadística. Este trabajo instala nuevos interrogantes para estudios posteriores, concretamente a nivel volumétrico. Por ejemplo: cuál es la longitud de las reducciones de las dendritas apicales y cuántas son las ramas que se encogen de las neuronas piramidales en las áreas hipocámpales estudiadas, cuántas sinapsis disminuyen o bien si estas remodelaciones dendríticas afectan la densidad de espinas y/o el proceso de neurogénesis ante los tratamientos efectuados.

En los últimos años, las investigaciones han logrado un progreso significativo en la comprensión de cómo las exposiciones ambientales interactúan con los genotipos y fenotipos para moldear de manera diferencial el desarrollo de los organismos. Los individuos con diferentes características varían no solo en



cuánto se ven afectados negativamente (en términos de salud mental definidos convencionalmente) por factores ambientales estresantes y adversos, sino también en la medida en que reciben una influencia positiva del medio ambiente. Notablemente, ciertas características de los individuos que los hacen vulnerables a la adversidad también pueden volverlos propensos a beneficiarse del contexto. Las diferencias individuales en la susceptibilidad neurobiológica ante el ambiente son adaptativas en el sentido evolutivo y se han conservado mediante presiones selectivas fluctuantes que generan diferentes aptitudes para desempeñarse en diferentes contextos ambientales (Ellis et al., 2011). Desde este punto de vista, mientras que el resultado neto de los cambios funcionales provocados por el estrés crónico a través de una variedad de sistemas neuroconductuales en el cerebro podría ser desadaptativo, es necesario considerar el contexto del individuo (Herman, 2013). La mayoría de las respuestas al estrés crónico son adaptativas, es decir, beneficiosas para la supervivencia del animal. Por ejemplo, los cambios observados en la inmovilidad de los roedores en la prueba de natación forzada -comúnmente vinculados a fenotipos depresivos- pueden interpretarse como un medio de conservación de los recursos durante etapas críticas o desafiantes (Herman, 2013). Cuando un animal se encuentra en entornos estresantes, no necesariamente se perturba su desarrollo en forma directa, sino que se regula produciendo estrategias que se adaptan a las condiciones estresantes. Es necesario, sin embargo, considerar que la adaptación óptima (en el sentido evolutivo) a ciertos entornos amenazantes no sucede sin sus costos, dado que algunas de estas estrategias pueden ser perjudiciales en términos del bienestar a largo plazo del individuo (Ellis et al., 2011; Herman, 2013).

Michael Meaney y sus colegas realizaron un extenso trabajo experimental mostrando que bajos niveles de cuidados maternos (Licking and grooming) altera la respuesta al estrés de las crías y su morfología cerebral. Pese a que estos efectos parecen desventajosos (aumento de los niveles de corticosterona, menor cantidad de ramificaciones y longitud dendrítica y menor densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo) producen beneficios incrementando el desempeño en los procesos de memoria y aprendizaje bajo condiciones estresantes en la adultez (Champagne et al., 2008). Más aún, los cambios fisiológicos y morfológicos median el impacto del comportamiento materno sobre las estrategias defensivas y reproductivas de su descendencia: defensa ante las amenazas, exploración en un campo abierto, desarrollo puberal, comportamiento sexual y crianza (Cameron et al., 2008; Cameron et al., 2005). Desde una perspectiva evolucionista, los mecanismos que ocurren durante el desarrollo empleando las experiencias tempranas para guiar o moldear ciertos procesos neurobiológicos posteriores deberían evolucionar en ambientes en los cuales el futuro está relacionado de manera coherente con el pasado (Figliucci, 2005). Boyce y Ellis formularon la hipótesis de que (a) la exposición a entornos tempranos extremadamente estresantes aumenta la sensibilidad biológica ante el entorno, lo que eleva la tendencia de los individuos a detectar y responder ante los peligros y amenazas ambientales; (b) la exposición a ambientes tempranos especialmente favorables también regula la sensibilidad biológica al ambiente, pero de una manera beneficiosa: aumentando la susceptibilidad para detectar los recursos

provechosos del mismo; y (c) por contraste, la exposición a ambientes tempranos que no son extremos en ninguna dirección regula negativamente la sensibilidad biológica ante el ambiente, amortiguando los efectos de los factores estresantes crónicos en los individuos ante condiciones futuras que no son ni altamente amenazantes ni completamente seguras. Esta sensibilidad biológica que da lugar a resultados opuestos, puede ocurrir debido a diferencias sistemáticas en la función o estructura en múltiples niveles de complejidad, jerárquicamente organizados: genéticos, epigenéticos, neurales, neuroendocrinos y de comportamiento, algunos de los cuales fueron analizados en esta tesis.

Retomando la hipótesis del ajuste-desajuste y las ideas previamente expuestas, aquellos individuos que se desarrollaron en entornos similares durante la edad temprana y adulta, exhibieron valores semejantes en algunas de las variables estudiadas en este trabajo. Contrariamente, los grupos sometidos solamente a un entorno hostil en alguna de estas etapas de la vida exhibieron resultados en aspectos conductuales o neurales disminuidos con respecto a los controles. La experiencia temprana de separación pudo haber actuado programando a los animales en alguno de los niveles mencionados, si bien el volumen de HD o la actividad de neuronas serotoninérgicas activas no son significativamente afectados cuando únicamente se presenta el estrés de separación. Otros mecanismos no estudiados aquí podrían haberse alterado, dando origen a una memoria contextual deficiente. De hecho, en presencia de un estrés crónico e impredecible en la adultez, los animales separados muestran comportamientos y niveles de activación de neuronas serotoninérgicas similares a los controles (también programados por la experiencia favorable de la presencia de las madres durante el desarrollo). Los efectos de la exposición al estrés emocional dependen, en gran medida, de las condiciones ambientales futuras en la vida del individuo y viceversa. Este trabajo contribuye a la literatura científica en lo referido a la programación adaptativa del sustrato neurobiológico como consecuencia del estrés temprano y su impacto sobre las respuestas conductuales en la vida adulta.

*"El mundo nos rompe a todos, y después muchos se vuelven más fuertes en los lugares rotos."*

Ernest Hemingway. Adiós a las armas (1929)

## 6. CONCLUSIONES FINALES

La depresión es una enfermedad mental severa definida por un conjunto específico de síntomas entre los cuales el bajo estado de ánimo y la anhedonia constituyen las dos dimensiones principales de la enfermedad. Los estudios sugieren que es el resultado de un desequilibrio entre los sistemas cerebrales involucrados en el procesamiento y la regulación de la información afectiva y emocional. Con el objeto de lograr una mayor comprensión de su etiología y tratamiento, es necesario profundizar el conocimiento de los mecanismos implicados en su fisiopatología, y en la acción de los antidepresivos clínicamente efectivos.

El estrés crónico es un factor precipitante frecuente en la depresión que recluta vías neurobiológicas similares. Debido a su impacto en la regulación emocional durante la edad temprana, la separación materna repercute en la respuesta al estrés que se experimenta más adelante en la vida. El análisis de las consecuencias del estrés temprano proporciona una ventana para interpretar los fenómenos de adaptación, así como la base de la resiliencia o bien la vulnerabilidad para el desarrollo de trastornos como la depresión.

Utilizando un modelo animal, este trabajo muestra que el estrés crónico e impredecible: (a) afecta negativamente a la activación serotoninérgica, (b) tiende a disminuir el volumen del hipocampo dorsal y (c) deteriora el desempeño en tareas relacionadas con la memoria contextual. Por otra parte, la separación materna afecta la memoria contextual a largo plazo; mientras que la separación materna combinada con el estrés crónico: (a) reproduce los valores de los controles en cuanto a la activación del sistema serotoninérgico (b) produce una menor reducción del volumen del hipocampo dorsal que el estrés crónico y (c) reproduce los valores de los controles en relación a la memoria contextual. Por último, el antidepresivo tianeptina genera efectos diferenciales sobre el volumen del hipocampo dorsal: reduciéndolo cuando se aplica una combinación de separación materna y estrés impredecible, en comparación con la aplicación de un único estrés de separación. Como limitación, estos resultados analizados son aplicables únicamente a ratas machos y podrían ser diferentes en hembras.

La alteración del ambiente perinatal mediante un estrés emocional como el de la separación materna temprana, produce repercusiones que acompañarán el desarrollo del individuo e interaccionarán con su respuesta al estrés crónico en la adultez implicando adaptaciones que contribuyen al bienestar futuro.

Esta investigación denota cómo el estrés crónico durante la adultez, cuando es impredecible, puede generar consecuencias tanto neurobiológicas como conductuales semejantes a las que se observan en la depresión.





Por último, el reconocimiento emergente de la capacidad del cerebro para transformar su arquitectura y su función a través de estas adaptaciones, en donde los agentes farmacéuticos o las intervenciones del entorno posibilitan cierta plasticidad biológica, otorga esperanza para redirigir las trayectorias individuales negativas en una dirección más positiva, hacia una mejor salud mental.

#### TRABAJOS PUBLICADOS VINCULADOS CON ESTA TESIS DOCTORAL

Pollano A., Trujillo V., Suárez M.M. How does early maternal separation and chronic stress in adult rats affect the immunoreactivity of serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus?. *Stress*. 2017; 21(1):59-68. ISSN: 1025-3890.

Pollano A., Zalosnik M.I., Durando P.E., Suárez M.M. Differential effects of tianeptine on the dorsal hippocampal volume of rats submitted to maternal separation followed by chronic unpredictable stress in adulthood. *Stress*. 2016;19(6):599-608. ISSN: 1025-3890.

Zalosnik M.I., Pollano A., Trujillo V., Suárez M. M., Durando P. E. Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: evidence for the match-mismatch hypothesis. *Stress*. 2014; 16:1-19. ISSN: 1025-3890.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams JK, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD, Shekhar A, Lowry CA. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*. 2005;133(4):983-997. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.03.025.
- Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, Lowry CA. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1018:46-57. Doi: 10.1196/annals.1296.005.
- Aguggia JP, Suarez MM, Rivarola MA. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res*. 2013;248:25-31. Doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.040.
- Ahmad A, Rasheed N, Banu N, Palit G. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress*. 2010;13(4):355-364. Doi: 10.3109/10253891003667862.
- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus*. 2009;19(12):1222-1231. Doi: 10.1002/hipo.20586.
- Aisa B, Gil-Bea FJ, Marcos B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(10):1495-1505. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.003.
- Akirav I, Richter-Levin G. Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *J Neurosci*. 1999;19(23):10530-10535. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.10530-99.2000
- Akirav I, Sandi C, Richter-Levin G. Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *Eur J Neurosci*. 2001;14(4):719-725. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.10530-99.2000
- Afonso J, Frick LR, Silberman DM, Palumbo ML, Genaro AM, Frasch AC. Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol Psychiatry*. 2006;59(3):244-251. Doi: 10.1016/j.biopsych.2005.06.036.
- Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM. Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(1):72-83. Doi: 10.1021/cn3002174.
- Alves SE, Hoskin E, Lee SJ, Brake WG, Ferguson D, Luine V, Allen PB, Greengard P, McEwen BS. Serotonin mediates CA1 spine density but is not crucial for ovarian steroid regulation of synaptic plasticity in the adult rat dorsal hippocampus. *Synapse*. 2002;45(2):143-151. Doi: 10.1002/syn.10093.
- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*. 2001;11(1):8-17. Doi: 10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7.



- Andersen SL. Exposure to early adversity: Points of cross-species translation that can lead to improved understanding of depression. *Dev Psychopathol.* 2015;27(2):477-491. Doi: 10.1017/S0954579415000103.
- Anderson MI, Jeffery KJ. Heterogeneous modulation of place cell firing by changes in context. *J Neurosci.* 2003;23(26):8827-8835. Doi:
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol.* 1999;160(1):1-12. Doi:
- Amett MG, Pan MS, Doak W, Cyr PE, Muglia LM, Muglia LJ. The role of glucocorticoid receptor-dependent activity in the amygdala central nucleus and reversibility of early-life stress programmed behavior. *Transl Psychiatry.* 2015;5:e542. Doi: 10.1038/tp.2015.35.
- Baddeley A, Bueno O, Cahill L, Fuster JM, Izquierdo I, McGaugh JL, Morris RG, Nadel L, Routtenberg A, Xavier G, Da Cunha C. The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(9):993-1002. Doi:
- Bambico FR, Nguyen NT, Gobbi G. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT1A autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009;19(3):215-228. Doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.11.005.
- Banasr M, Duman RS. Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007;6(5):311-320. Doi:
- Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull.* 2000;53(1):95-104. Doi:
- Bannerman DM, Grubb M, Deacon RM, Yee BK, Feldon J, Rawlins JN. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res.* 2003;139(1-2):197-213. Doi:
- Bauer EP. Serotonin in fear conditioning processes. *Behav Brain Res.* 2015;277:68-77. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.028.
- Belsky J, Pluess M. Beyond diathesis stress: differential susceptibility to environmental influences. *Psychol Bull.* 2009;135(6):885-908. Doi: 10.1037/a0017376.
- Belzung C, Bilette de Villemeur E. The design of new antidepressants: can formal models help? A first attempt using a model of the hippocampal control over the HPA-axis based on a review from the literature. *Behav Pharmacol.* 2010;21(8):677-689. Doi: 10.1097/FBP.0b013e328340d630.
- Bernier BE, Lacagnina AF, Ayoub A, Shue F, Zemelman BV, Krasne FB, Drew MR. Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. *J Neurosci.* 2017;37(26):6359-6371. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.3029-16.2017.
- Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pego JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Front Behav Neurosci.* 2009;3:1. Doi: 10.3389/neuro.08.001.2009.



- Bock J, Rether K, Groger N, Xie L, Braun K. Perinatal programming of emotional brain circuits: an integrative view from systems to molecules. *Front Neurosci.* 2014;8:11. Doi: 10.3389/fnins.2014.00011.
- Boldrini M, Santiago AN, Hen R, Dwork AJ, Rosoklija GB, Tamir H, Arango V, John Mann J. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(6):1068-1077. Doi: 10.1038/hpp.2013.5.
- Borelli KG, Gargaro AC, dos Santos JM, Brandao ML. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neurosci Lett.* 2005;387(2):105-110. Doi: 10.1016/j.neulet.2005.07.031.
- Bourtchuladze R, Fengueli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva A.J. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell.* 1994;79(1):59-68. Doi:
- Bouwknicht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull.* 2007;72(1):32-43. Doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.12.009.
- Bowman RE, Beck KD, Luine VN. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav.* 2003;43(1):48-59. Doi:
- Brandao ML, Zanoveli JM, Ruiz-Martinez RC, Oliveira LC, Landeira-Fernandez J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behav Brain Res.* 2008;188(1):1-13. Doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.018.
- Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. Alterations in the central CRF system of two different rat models of comorbid depression and functional gastrointestinal disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14(5):666-683. Doi: 10.1017/S1461145710000994.
- Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Front Mol Neurosci.* 2014;7:24. Doi: 10.3389/fnmol.2014.00024.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry.* 2000;157(1):115-118. Doi: 10.1176/ajp.157.1.115.
- Burghardt NS, Bauer EP. Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: implications for underlying fear circuits. *Neuroscience.* 2013;247:253-272. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.050.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34(2):446-457. Doi: 10.1038/hpp.2008.75.
- Caldji C, Diorio J, Meaney MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry.* 2000;48(12):1164-1174. Doi:



- Callaghan BL, Graham BM, Li S, Richardson R. From resilience to vulnerability: mechanistic insights into the effects of stress on transitions in critical period plasticity. *Front Psychiatry*. 2013;4:90. Doi: 10.3389/fpsy.2013.00090.
- Cameron HA, Schoenfeld TJ. Behavioral and structural adaptations to stress. *Front Neuroendocrinol*. 2018; Doi: 10.1016/j.yfrne.2018.02.002.
- Cameron N, Del Corpo A, Diorio J, McAllister K, Sharma S, Meaney MJ. Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic-pituitary-gonadal function in the female rat. *PLoS One*. 2008;3(5):e2210. Doi: 10.1371/journal.pone.0002210.
- Cameron NM, Champagne FA, Parent C, Fish EW, Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):843-865. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.022.
- Castanon N, Korsman JP, Medina C, Chauvet N, Dantzer R. Chronic treatment with the antidepressant tianeptine attenuates lipopolysaccharide-induced Fos expression in the rat paraventricular nucleus and HPA axis activation. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28(1):19-34. Doi:
- Claessens SE, Daskalakis NP, van der Veen R, Oitzl MS, de Kloet ER, Champagne DL. Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;214(1):141-154. Doi: 10.1007/s00213-010-2118-y.
- Clausen F, Lewen A, Marklund N, Olsson Y, McArthur DL, Hillered L. Correlation of hippocampal morphological changes and morris water maze performance after cortical contusion injury in rats. *Neurosurgery*. 2005;57(1):154-163; discussion 154-163. Doi:
- Cobb JA, Simpson J, Mahajan GJ, Overholser JC, Jurjus GJ, Dieter L, Herbst N, May W, Rajkowska G, Stockmeier CA. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. *J Psychiatr Res*. 2013;47(3):299-306. Doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.10.020.
- Conrad CD. The Relationship between Acute Glucocorticoid Levels and Hippocampal Function Depends upon Task Aversiveness and Memory Processing Stage. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*. 2005;3(1):57-78. Doi: 10.2201/nonlin.003.01.004.
- Conrad CD. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev*. 2006;5(1):41-60. Doi: 10.1177/1534582306289043.
- Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(5):742-755. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.11.003.
- Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*. 1999;113(5):902-913. Doi:





- Conrad CD, MacMillan DD, 2nd, Tsekhanov S, Wright RL, Baran SE, Fuchs RA. Influence of chronic corticosterone and glucocorticoid receptor antagonism in the amygdala on fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;81(3):185-199. Doi: 10.1016/j.nlm.2004.01.002.
- Conrad CD, McLaughlin KJ, Huynh TN, El-Ashmawy M, Sparks M. Chronic stress and a cyclic regimen of estradiol administration separately facilitate spatial memory: relationship with hippocampal CA1 spine density and dendritic complexity. *Behav Neurosci.* 2012;126(1):142-156. Doi: 10.1037/a0025770.
- Conrad CD, Ortiz JB, Judd JM. Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations. *Physiol Behav.* 2017;178:66-81. Doi: 10.1016/j.physbeh.2016.11.017.
- Cotella EM, Durando PE, Suarez MM. A double-hit model of stress dysregulation in rats: implications for limbic corticosteroid receptors and anxious behavior under amitriptyline treatment. *Stress.* 2014;17(3):235-246. Doi: 10.3109/10253890.2014.910649.
- Crawford LK, Craige CP, Beck SG. Increased intrinsic excitability of lateral wing serotonin neurons of the dorsal raphe: a mechanism for selective activation in stress circuits. *J Neurophysiol.* 2010;103(5):2652-2663. Doi: 10.1152/jn.01132.2009.
- Czeh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2007;257(5):250-260. Doi: 10.1007/s00406-007-0728-0.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12796-12801. Doi: 10.1073/pnas.211427898.
- Champagne DL, Bagot RC, van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, de Kloet ER, Joels M, Krugers H. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci.* 2008;28(23):6037-6045. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.0526-08.2008.
- Chao HM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. The effect of social stress on hippocampal gene expression. *Mol Cell Neurosci.* 1993;4(6):543-548. Doi: 10.1006/mcne.1993.1067.
- Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.* 1994;640(1-2):56-67. Doi:
- Chocyk A, Przyborowska A, Makuch W, Majcher-Maslerka I, Dudys D, Wedzony K. The effects of early-life adversity on fear memories in adolescent rats and their persistence into adulthood. *Behav Brain Res.* 2014;264:161-172. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.01.040.
- Choy KH, de Visser Y, Nichols NR, van den Buuse M. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus.* 2008;18(7):655-667. Doi: 10.1002/hipo.20425.



- Chu CC, Wang JJ, Chen KT, Shieh JP, Wang LK, Shui HA, Ho ST. Neurotrophic effects of tianeptine on hippocampal neurons: a proteomic approach. *J Proteome Res*. 2010;9(2):936-944. Doi: 10.1021/pr900799b.
- Chung S, Son GH, Park SH, Park E, Lee KH, Geum D, Kim K. Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring. *Endocrinology*. 2005;146(7):3202-3210. Doi: 10.1210/en.2004-1458.
- Das A, Rai D, Dikshit M, Palit G, Nath C. Nature of stress: differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats. *Life Sci*. 2005;77(18):2299-2311. Doi: 10.1016/j.lfs.2005.02.020.
- Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ, Vinkers CH, de Kloet ER. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(9):1858-1873. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.008.
- Daskalakis NP, Oitzl MS, Schachinger H, Champagne DL, de Kloet ER. Testing the cumulative stress and mismatch hypotheses of psychopathology in a rat model of early-life adversity. *Physiol Behav*. 2012;106(5):707-721. Doi: 10.1016/j.physbeh.2012.01.015.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):463-475. Doi: 10.1038/nrn1683.
- Della FP, Abelaira HM, Reus GZ, Santos MA, Tomaz DB, Antunes AR, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J. Treatment with tianeptine induces antidepressive-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. *Metab Brain Dis*. 2013;28(1):93-105. Doi: 10.1007/s11011-012-9375-x.
- Denenberg VH, Ottinger DR, Stephens MW. Effects of maternal factors upon growth and behavior of the rat. *Child Dev*. 1962;33:65-71. Doi:
- Diehl LA, Pereira Nde S, Laureano DP, Benitz AN, Noschang C, Ferreira AG, Scherer EB, Machado FR, Henriques TP, Wyse AT, Molina V, Dalmaz C. Contextual fear conditioning in maternal separated rats: the amygdala as a site for alterations. *Neurochem Res*. 2014;39(2):384-393. Doi: 10.1007/s11064-013-1230-x.
- Donner NC, Siebler PH, Johnson DT, Villarreal MD, Mani S, Matti AJ, Lowry CA. Serotonergic systems in the balance: CRHR1 and CRHR2 differentially control stress-induced serotonin synthesis. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;63:178-190. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.09.024.
- Donohue HS, Gabbott PL, Davies HA, Rodriguez JJ, Cordero MI, Sandi C, Medvedev NI, Popov VI, Coyer FM, Peddie CJ, Stewart MG. Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience*. 2006;140(2):597-606. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.072.

- Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S, Trottier JF. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001;25(4):729-741. Doi:
- Dudai Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16(2):174-178. Doi: 10.1016/j.conb.2006.03.010.
- Duhr F, Deleris P, Raynaud F, Severo M, Morisset-Lopez S, Mannoury la Cour C, Millan MJ, Bockaert J, Marin P, Chaumont-Dubel S. Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT6 receptors to promote neurite growth. *Nat Chem Biol*. 2014;10(7):590-597. Doi: 10.1038/nchembio.1547.
- Duvarci S, Pare D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J Neurosci*. 2007;27(16):4482-4491. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.0680-07.2007.
- Edgar N, Sibille E. A putative functional role for oligodendrocytes in mood regulation. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e109. Doi: 10.1038/tp.2012.34.
- Eland L, McEwen BS. Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. *Hippocampus*. 2012;22(1):82-91. Doi: 10.1002/hipo.20862.
- Ellis BJ, Boyce WT, Belsky J, Bakermans-Kranenburg MJ, van Ijzendoorn MH. Differential susceptibility to the environment: an evolutionary-neurodevelopmental theory. *Dev Psychopathol*. 2011;23(1):7-28. Doi: 10.1017/S0954579410000611.
- Fanselow MS. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res*. 2000;110(1-2):73-81. Doi:
- Fanselow MS, Bolles RC. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1979;93(4):736-744. Doi:
- Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(6):821-834. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.09.002.
- Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ. Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res*. 1993;34(6):689-706. Doi: 10.1002/jnr.490340612.
- Ferreira TA, Iacono LL, Gross CT. Serotonin receptor 1A modulates actin dynamics and restricts dendritic growth in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 2010;32(1):18-26. Doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07283.x.
- Filiol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet*. 2000;25(2):195-200. Doi: 10.1038/76061.
- Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9(1):128-134. Doi:



- Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2007;26(1):47-55. Doi: 10.1016/j.nbd.2006.11.015.
- Frodl T, Jager M, Smajstrlova I, Born C, Bottlender R, Palladino T, Reiser M, Moller HJ, Meisenzahl EM. Effect of hippocampal and amygdala volumes on clinical outcomes in major depression: a 3-year prospective magnetic resonance imaging study. *J Psychiatry Neurosci.* 2008;33(5):423-430. Doi:
- Fuchs E, Flugge G, Czeh B. Remodeling of neuronal networks by stress. *Front Biosci.* 2006;11:2746-2758. Doi:
- Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED. 5-HT<sub>1A</sub> [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231(4):623-636. Doi: 10.1007/s00213-013-3389-x.
- Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Aracil A, Bartoll A, Martinez-Gras I, Lanciego JL, Rubio G, Marzanas J. Increased vulnerability to ethanol consumption in adolescent maternal separated mice. *Addict Biol.* 2016;21(4):847-858. Doi: 10.1111/adb.12266.
- Gardner KL, Hale MW, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Adverse early life experience and social stress during adulthood interact to increase serotonin transporter mRNA expression. *Brain Res.* 2009;1305:47-63. Doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.065.
- Gardner KL, Thirvikraman KV, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. *Neuroscience.* 2005;136(1):181-191. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.042.
- Garpenstrand H, Annas P, Ekblom J, Oreland L, Fredrikson M. Human fear conditioning is related to dopaminergic and serotonergic biological markers. *Behav Neurosci.* 2001;115(2):358-364. Doi:
- Gartside SE, Johnson DA, Leitch MM, Troakes C, Ingram CD. Early life adversity programs changes in central 5-HT neuronal function in adulthood. *Eur J Neurosci.* 2003;17(11):2401-2408. Doi:
- Gaspar P, Lillesaar C. Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1601):2382-2394. Doi: 10.1098/rstb.2011.0378.
- Gassaway MM, Rives ML, Kruegel AC, Javitch JA, Sames D. The atypical antidepressant and neurorestorative agent tianeptine is a mu-opioid receptor agonist. *Transl Psychiatry.* 2014;4:e411. Doi: 10.1038/tp.2014.30.
- Gater R, Tansella M, Korten A, Tiemens BG, Mavreas VG, Olatawura MO. Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. *Arch Gen Psychiatry.* 1998;55(5):405-413. Doi:
- Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL. 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.* 2006;138(4):1067-1081. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.002.





- Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007;19(1):1-19. Doi: 10.1002/ajhb.20590.
- Goel N, Innala L, Vau V. Sex differences in serotonin (5-HT) 1A receptor regulation of HPA axis and dorsal raphe responses to acute restraint. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;40:232-241. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.11.020.
- Gomez-Lira G, Trillo E, Ramirez M, Asai M, Sitges M, Gutierrez R. The expression of GABA in mossy fiber synaptosomes coincides with the seizure-induced expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse. *Exp Neurol.* 2002;177(1):276-283. Doi:
- Gourand AM, Matuszewich L. The effects of chronic unpredictable stress on male rats in the water maze. *Physiol Behav.* 2005;86(1-2):21-31. Doi: 10.1016/j.physbeh.2005.06.027.
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;54(1):129-141. Doi:
- Griebel G, Simiand J, Steinberg R, Jung M, Guly D, Roger P, Geslin M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P. 4-[2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl]-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(1):333-345. Doi:
- Guderian S, Dzieciol AM, Gadian DG, Jentschke S, Doeller CF, Burgess N, Mishkin M, Vargha-Khadem F. Hippocampal Volume Reduction in Humans Predicts Impaired Allocentric Spatial Memory in Virtual-Reality Navigation. *J Neurosci.* 2015;35(42):14123-14131. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.0801-15.2015.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96(5):379-394. Doi:
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 1987;147(Pt 3):229-263. Doi:
- Gupta D, Radhakrishnan M, Kurhe Y. 5HT3 receptor antagonist (ondansetron) reverses depressive behavior evoked by chronic unpredictable stress in mice: modulation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical and brain serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;124:129-136. Doi: 10.1016/j.pbb.2014.05.024.
- Gustafsson L, Oreland S, Hoffmann P, Nylander I. The impact of postnatal environment on opioid peptides in young and adult male Wistar rats. *Neuropeptides.* 2008;42(2):177-191. Doi: 10.1016/j.npep.2007.10.006.
- Gutman DA, Nemeroff CB. Neurobiology of early life stress: Rodent studies. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry.* 2002;7(2):89-95. Doi: 10.1053/scnp.2002.31781.

- Haase J, Brown E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? *Pharmacol Ther.* 2015;147:1-11. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.10.002.
- Hagemeyer J, Woodward MR, Rafique UA, Amrutkar CV, Bergsland N, Dwyer MG, Benedict R, Zivadinov R, Szgeti K. Odor identification deficit in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease is associated with hippocampal and deep gray matter atrophy. *Psychiatry Res Neuroimaging.* 2016;255:87-93. Doi: 10.1016/j.psychresns.2016.08.003.
- Hale MW, Lowry CA. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;213(2-3):243-264. Doi: 10.1007/s00213-010-2089-z.
- Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 2012;32(5):695-708. Doi: 10.1007/s10571-012-9827-1.
- Harlow HF, Zimmermann FR. Affectional responses in the infant monkey; orphaned baby monkeys develop a strong and persistent attachment to inanimate surrogate mothers. *Science.* 1959;130(3373):421-432. Doi:
- Harris AP, Holmes MC, de Kloet ER, Chapman KE, Seckl JR. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(5):648-658. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.08.007.
- Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem.* 2006;13(6):809-819. Doi: 10.1101/lm.334306.
- Heinrichs SC, Stenzel-Poore MP, Gold LH, Battenberg E, Bloom FE, Koob GF, Vale WW, Pich EM. Learning impairment in transgenic mice with central overexpression of corticotropin-releasing factor. *Neuroscience.* 1996;74(2):303-311. Doi:
- Henningsen K, Andreasen JT, Bouzinova EV, Jayatissa MN, Jensen MS, Redrobe JP, Wiborg O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like responses. *Behav Brain Res.* 2009;198(1):136-141. Doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.039.
- Herman JP. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci.* 2013;7:61. Doi: 10.3389/fnbeh.2013.00061.
- Herman JP, Adams D, Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology.* 1995;61(2):180-190. Doi: 10.1159/000126839.
- Herman JP, McKivern JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol.* 2016;6(2):603-621. Doi: 10.1002/cphy.c150015.



- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(8):1201-1213. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.08.006.
- Hernandez-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Perez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ. The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;90(3):553-559. Doi: 10.1016/j.nlm.2008.06.008.
- Hill MN, Hellemans KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(9):2085-2117. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.07.001.
- Hollis JH, Evans AK, Bruce KP, Lightman SL, Lowry CA. Lipopolysaccharide has indomethacin-sensitive actions on Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons. *Brain Behav Immun*. 2006;20(6):569-577. Doi: 10.1016/j.bbi.2006.01.006.
- Hornberg JR. Serotonergic modulation of conditioned fear. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:821549. Doi: 10.6064/2012/821549.
- Hosseini-Sharifabad M, Nyengaard JR. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Methods*. 2007;162(1-2):206-214. Doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.01.009.
- Huang Y, Coupland NJ, Lebel RM, Carter R, Seres P, Wilman AH, Malykhin NV. Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*. 2013;74(1):62-68. Doi: 10.1016/j.biopsych.2013.01.005.
- Huerta PT, Sun LD, Wilson MA, Tonegawa S. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*. 2000;25(2):473-480. Doi:
- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, den Boer JA, Meerlo P. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res*. 2011;216(2):552-560. Doi: 10.1016/j.bbr.2010.08.038.
- Hunsaker MR, Kesner RP. Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(1):61-69. Doi: 10.1016/j.nlm.2007.08.016.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res*. 2002;950(1-2):52-63. Doi:
- Hutchinson KM, McLaughlin KJ, Wright RL, Bryce Ortiz J, Anouti DP, Mika A, Diamond DM, Conrad CD. Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. *Neurobiol Learn Mem*. 2012;97(2):250-260. Doi: 10.1016/j.nlm.2012.01.003.



- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(11):2395-2404. Doi: 10.1038/sj.npp.1301041.
- Kanatsou S, Fearey BC, Kull LE, Lucassen PJ, Harris AP, Seckl JR, Krugers H, Joels M. Overexpression of Mineralocorticoid Receptors Partially Prevents Chronic Stress-Induced Reductions in Hippocampal Memory and Structural Plasticity. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142012. Doi: 10.1371/journal.pone.0142012.
- Karg K, Burmeister M, Shedden K, Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(5):444-454. Doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.189.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1981;5(2):247-251. Doi:
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*. 2002;52(2):135-143. Doi: 10.1002/ana.10262.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 1999;156(6):837-841. Doi: 10.1176/ajp.156.6.837.
- Kerman IA, Shabrang C, Taylor L, Akil H, Watson SJ. Relationship of presympathetic-premotor neurons to the serotonergic transmitter system in the rat brainstem. *J Comp Neurol*. 2006;499(6):882-896. Doi: 10.1002/cne.21129.
- Kesner RP, Lee I, Gilbert P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci*. 2004;15(5):333-351. Doi:
- Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol*. 1997;48:191-214. Doi: 10.1146/annurev.psych.48.1.191.
- Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*. 2013;77(5):955-968. Doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.038.
- Kim EJ, Pellmar B, Kim JJ. Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn Mem*. 2015;22(9):411-416. Doi: 10.1101/lm.037291.114.
- Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(6):453-462. Doi: 10.1038/nrn849.
- Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 1992;256(5057):675-677. Doi:
- Kim JJ, Lee HJ, Welday AC, Song E, Cho J, Sharp PE, Jung MW, Blair HT. Stress-induced alterations in hippocampal plasticity, place cells, and spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18297-18302. Doi: 10.1073/pnas.0708644104.



- Kim YJ, Shin MC, Kim SA, Chung JH, Kim EH, Kim CJ. Modulation of tianeptine on ion currents induced by inhibitory neurotransmitters in acutely dissociated dorsal raphe neurons of Sprague-Dawley rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002;12(5):417-425. Doi:
- Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116-1121. Doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049.
- Kole MH, Swan L, Fuchs E. The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats. *Eur J Neurosci*. 2002;16(5):807-816. Doi:
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgolfo A, Steiner T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(5):1291-1301. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.02.003.
- Korosi A, Veening JG, Kozicz T, Henckens M, Dederen J, Groenink L, van der Gugten J, Olivier B, Roubos EW. Distribution and expression of CRF receptor 1 and 2 mRNAs in the CRF over-expressing mouse brain. *Brain Res*. 2006;1072(1):46-54. Doi: 10.1016/j.brainres.2005.12.034.
- Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ. Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res*. 2006;1087(1):142-150. Doi: 10.1016/j.brainres.2006.03.009.
- Kraus C, Castren E, Kasper S, Lanzenberger R. Serotonin and neuroplasticity - Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;77:317-326. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.03.007.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*. 2003;467(4):455-463. Doi: 10.1002/cne.10945.
- Kruegers HJ, Lucassen PJ, Karst H, Joels M. Chronic stress effects on hippocampal structure and synaptic function: relevance for depression and normalization by anti-glucocorticoid treatment. *Front Synaptic Neurosci*. 2010;2:24. Doi: 10.3389/fnsyn.2010.00024.
- Kuroda Y, Watanabe Y, McEwen BS. Tianeptine decreases both serotonin transporter mRNA and binding sites in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1994;268(1):R3-5. Doi:
- Ladd CO, Thirvikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(6):520-533. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.12.004.
- LeDoux J. Emotional networks and motor control: a fearful view. *Prog Brain Res*. 1996;107:437-446. Doi:
- Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig*. 2010;7(4):231-235. Doi: 10.4306/pi.2010.7.4.231.
- Lee I, Kesner RP. Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus*. 2004;14(3):301-310. Doi: 10.1002/hipo.10177.





- Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res.* 2007;58(1):32-39. Doi: 10.1016/j.neures.2007.01.008.
- Lee T, Jarome T, Li SJ, Kim JJ, Helmstetter FJ. Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport.* 2009;20(17):1554-1558. Doi: 10.1097/WNR.0b013e328332bb09.
- Leventopoulos M, Russig H, Feldon J, Pryce CR, Opacka-Juffry J. Early deprivation leads to long-term reductions in motivation for reward and 5-HT1A binding and both effects are reversed by fluoxetine. *Neuropharmacology.* 2009;56(3):692-701. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.12.005.
- Levine ME. Sickness and satiety: physiological mechanisms underlying perceptions of nausea and stomach fullness. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005;7(4):280-288. Doi:
- Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science.* 1957;126(3270):405. Doi:
- Levine S. Infantile stimulation and adaptation to stress. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1966;43:280-291. Doi:
- Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;746:275-288; discussion 289-293. Doi:
- Levine S, Lewis GW. Critical period for effects of infantile experience on maturation of stress response. *Science.* 1959;129(3340):42-43. Doi:
- Lin YE, Lin SH, Chen WC, Ho CT, Lai YS, Panyod S, Sheen LY. Antidepressant-like effects of water extract of *Gastrodia elata* Blume in rats exposed to unpredictable chronic mild stress via modulation of monoamine regulatory pathways. *J Ethnopharmacol.* 2016;187:57-65. Doi: 10.1016/j.jep.2016.04.032.
- Little K, Olsson CA, Youssef GJ, Whittle S, Simmons JG, Yucal M, Sheeber LB, Foley DL, Allen NB. Linking the serotonin transporter gene, family environments, hippocampal volume and depression onset: A prospective imaging gene x environment analysis. *J Abnorm Psychol.* 2015;124(4):834-849. Doi: 10.1037/abn0000101.
- Liu W, Shu XJ, Chen FY, Zhu C, Sun XH, Liu LJ, Ai YX, Li YG, Zhao H. Tianeptine reverses stress-induced asymmetrical hippocampal volume and N-acetylaspartate loss in rats: an in vivo study. *Psychiatry Res.* 2011;194(3):385-392. Doi: 10.1016/j.psychresns.2011.02.007.
- Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature.* 2012;484(7394):381-385. Doi: 10.1038/nature11028.
- Lowry CA. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 2002;14(11):911-923. Doi:
- Lowry MT, Gault L, Yamamoto BK. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem.* 1993;61(5):1957-1960. Doi:

- Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry*. 2004;55(8):789-796. Doi: 10.1016/j.biopsych.2003.12.014.
- Lucassen PJ, Pruessner J, Sousa N, Almeida OF, Van Dam AM, Rajkowska G, Swaab DF, Czeh B. Neuropathology of stress. *Acta Neuropathol*. 2014;127(1):109-135. Doi: 10.1007/s00401-013-1223-5.
- Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res*. 1994;639(1):167-170. Doi:
- Luo Y, Cao Z, Wang D, Wu L, Li Y, Sun W, Zhu Y. Dynamic study of the hippocampal volume by structural MRI in a rat model of depression. *Neurol Sci*. 2014;35(11):1777-1783. Doi: 10.1007/s10072-014-1837-y.
- Lutz PE, Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci*. 2013;36(3):195-206. Doi: 10.1016/j.tins.2012.11.002.
- Magarinos AM, Deslandes A, McEwen BS. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol*. 1999;371(2-3):113-122. Doi:
- Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*. 1995;69(1):89-98. Doi:
- Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*. 1996;16(10):3534-3540. Doi:
- Maier SF, Watkins LR. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):829-841. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.021.
- Malagie I, Deslandes A, Gardier AM. Effects of acute and chronic tianeptine administration on serotonin outflow in rats: comparison with paroxetine by using *in vivo* microdialysis. *Eur J Pharmacol*. 2000;403(1-2):55-65. Doi:
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20(24):9104-9110. Doi:
- Maletic V, Robinson M, Oakes T, Iyengar S, Ball SG, Russell J. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract*. 2007;61(12):2030-2040. Doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01602.x.
- Maras PM, Baram TZ. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci*. 2012;35(5):315-324. Doi: 10.1016/j.tins.2012.01.005.

- Maren S, Fanselow MS. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;67(2):142-149. Doi: 10.1006/nlme.1996.3752.
- Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(6):417-428. Doi: 10.1038/nrn3492.
- Martsova E, Solas M, Horrillo I, Ortega JE, Meana JJ, Tordera RM, Ramirez MJ. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 2012;62(5-6):1944-1953. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.12.019.
- McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:105-122. Doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.105.
- McEwen BS. Early life influences on life-long patterns of behavior and health. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2003;9(3):149-154. Doi: 10.1002/mrdd.10074.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci.* 2006;8(4):367-381. Doi:
- McEwen BS. Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1204 Suppl:E38-59. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05568.x.
- McEwen BS. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 2017;1Doi: 10.1177/2470547017692328.
- McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 2015;18(10):1353-1363. Doi: 10.1038/nn.4086.
- McEwen BS, Chattarji S. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004;14 Suppl 5:S497-502. Doi: 10.1016/j.euroneuro.2004.09.008.
- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, Fuchs E. The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry.* 2010;15(3):237-249. Doi: 10.1038/mp.2009.80.
- McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology.* 2012;62(1):3-12. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.014.
- McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol.* 1995;5(2):205-216. Doi:
- McGuire J, Herman JP, Horn PS, Sailee FR, Sah R. Enhanced fear recall and emotional arousal in rats recovering from chronic variable stress. *Physiol Behav.* 2010;101(4):474-482. Doi: 10.1016/j.physbeh.2010.07.013.
- McKittrick CR, Magarinos AM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter

- sites. *Synapse*. 2000;36(2):85-94. Doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(200005)36:2<85::AID-SYN1>3.0.CO;2-Y.
- McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res*. 2007;1161:56-64. Doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.042.
- McMillan PJ, Wilkinson CW, Greenup L, Raskind MA, Peskind ER, Leverenz JB. Chronic cortisol exposure promotes the development of a GABAergic phenotype in the primate hippocampus. *J Neurochem*. 2004;91(4):843-851. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02760.x.
- McQuade R, Sharp T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem*. 1997;69(2):791-796. Doi:
- Meloni EG, Reedy CL, Cohen BM, Carlezon WA, Jr. Activation of raphe efferents to the medial prefrontal cortex by corticotropin-releasing factor: correlation with anxiety-like behavior. *Biol Psychiatry*. 2008;63(9):832-839. Doi: 10.1016/j.biopsych.2007.10.016.
- Mennini T, Mocaer E, Garattini S. Tianeptine, a selective enhancer of serotonin uptake in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1987;336(5):478-482. Doi:
- Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HW. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*. 2008;172:233-264. Doi: 10.1016/S0079-6123(08)00912-6.
- Moles A, Kieffer BL, D'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science*. 2004;304(5679):1983-1986. Doi: 10.1126/science.1095943.
- Molet J, Maras PM, Kinney-Lang E, Harris NG, Rashid F, Ivy AS, Solodkin A, Oberaus A, Baram TZ. MRI uncovers disrupted hippocampal microstructure that underlies memory impairments after early-life adversity. *Hippocampus*. 2016;26(12):1618-1632. Doi: 10.1002/hipo.22661.
- Monroe SM, Simons AD. Diathesis-stress theories in the context of life stress research: implications for the depressive disorders. *Psychol Bull*. 1991;110(3):406-425. Doi: 10.1037/0033-2909.110.3.406.
- Monroy E, Hernandez-Torres E, Flores G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat*. 2010;40(2):93-101. Doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.05.005.
- Moore CL, Wong L, Daum MC, Leclair OU. Mother-infant interactions in two strains of rats: implications for dissociating mechanism and function of a maternal pattern. *Dev Psychobiol*. 1997;30(4):301-312. Doi:
- Morais M, Santos PA, Mateus-Pinheiro A, Patricio P, Pinto L, Sousa N, Pedroso P, Almeida S, Filipe A, Bessa JM. The effects of chronic stress on hippocampal adult neurogenesis and dendritic plasticity are reversed by selective MAO-A inhibition. *J Psychopharmacol*. 2014;28(12):1178-1183. Doi: 10.1177/0269881114553646.



- Moreira PS, Almeida PR, Leite-Almeida H, Sousa N, Costa P. Impact of Chronic Stress Protocols in Learning and Memory in Rodents: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163245. Doi: 10.1371/journal.pone.0163245.
- Morrisette DA, Stahl SM. Modulating the serotonin system in the treatment of major depressive disorder. *CNS Spectr*. 2014;19 Suppl 1:57-67; quiz 54-57, 68. Doi: 10.1017/S1092852914000613.
- Moser E, Moser MB, Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*. 1993;13(9):3916-3925. Doi:
- Naidu PS, Lichtman AH, Archer CC, May EL, Harris LS, Aceto MD. NIH 11082 produces anti-depressant-like activity in the mouse tail-suspension test through a delta-opioid receptor mechanism of action. *Eur J Pharmacol*. 2007;566(1-3):132-136. Doi: 10.1016/j.ejphar.2007.03.031.
- Nederhof E. The mismatch hypothesis of psychiatric disease. *Physiol Behav*. 2012;106(5):689-690. Doi: 10.1016/j.physbeh.2012.02.014.
- Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci*. 2014;8:166. Doi: 10.3389/fnins.2014.00166.
- O'Connor RM, Pusceddu MM, Dinan TG, Cryan JF. Impact of early-life stress, on group III mGlu receptor levels in the rat hippocampus: effects of ketamine, electroconvulsive shock therapy and fluoxetine treatment. *Neuropharmacology*. 2013;66:236-241. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.006.
- O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*. 1976;51(1):78-109. Doi:
- Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KJ, Takahashi K. 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. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994;49(4):961-967. Doi:
- Ohi F, Michaels T, Vollmann-Honsdorf GK, Kirschbaum C, Fuchs E. Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews. *Psychoneuroendocrinology*. 2000;25(4):357-363. Doi:
- Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Tsutsui-Kimura I, Yoshida T, Yoshioka M. The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the ventral hippocampus is involved in the retrieval of fear memory through the corticotropin-releasing factor type 2 receptor. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(6):1271-1278. Doi: 10.1038/npp.2009.229.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(6):853-866. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.07.006.
- Oliveira AC, Pereira MC, Santana LN, Fernandes RM, Teixeira FB, Oliveira GB, Fernandes LM, Fontes-Junior EA, Prediger RD, Crespo-Lopez ME, Gomes-Leal W, Lima RR, Mala Cdo S. Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional





- and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. *J Psychopharmacol.* 2015;29(6):712-724. Doi: 10.1177/0269881115581960.
- Oomen CA, Soeters H, Audureau N, Vermunt L, van Hasselt FN, Manders EM, Joels M, Lucassen PJ, Krugers H. Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *J Neurosci.* 2010;30(19):6635-6645. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.0247-10.2010.
- Oosterhof CA, El Mansari M, Merali Z, Blier P. Altered monoamine system activities after prenatal and adult stress: A role for stress resilience? *Brain Res.* 2016;1642:409-418. Doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.032.
- Pariante CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry.* 2001;49(5):391-404. Doi: 10.1016/S0006-3223(00)01088-X.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th ed ed: Elsevier; 2007. 456 p.
- Pereda-Perez I, Popovic N, Ojalora BB, Popovic M, Madrid JA, Rol MA, Venero G. Long-term social isolation in the adulthood results in CA1 shrinkage and cognitive impairment. *Neurobiol Learn Mem.* 2013;106:31-39. Doi: 10.1016/j.nlm.2013.07.004.
- Pessoa L. On the relationship between emotion and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(2):148-158. Doi: 10.1038/nrn2317.
- Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 1992;106(2):274-285. Doi:
- Pickering C, Gustafsson L, Cebere A, Nylander I, Lijquist S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Res.* 2006;1099(1):101-108. Doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.136.
- Pigliucci M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol Evol.* 2005;20(9):481-486. Doi: 10.1016/j.tree.2005.06.001.
- Pineyro G, Deveault L, Blier P, Dennis T, de Montigny C. Effect of acute and prolonged tianeptine administration on the 5-HT transporter: electrophysiological, biochemical and radioligand binding studies in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1995;351(2):111-118. Doi:
- Pinheiro RM, de Lima MN, Portal BC, Busato SB, Falavigna L, Ferreira RD, Paz AC, de Aguiar BW, Kapczinski F, Schroder N. Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J Neural Transm (Vienna).* 2015;122(5):709-719. Doi: 10.1007/s00702-014-1303-2.
- Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(1):88-109. Doi: 10.1038/sj.npp.1301574.
- Plaisant F, Dommergues MA, Spedding M, Cecchelli R, Brillault J, Kato G, Munoz C, Gressens P. Neuroprotective properties of tianeptine: interactions with cytokines. *Neuropharmacology.* 2003;44(6):801-809. Doi:



- Ploj K, Nylander I. Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats. *Neurosci Lett*. 2003;345(3):195-197. Doi:
- Przuntek H, Conrad B, Dichgans J, Kraus PH, Krauseneck P, Pergande G, Rinne U, Schirrig K, Schnitker J, Vogel HP. SELEDO: a 5-year long-term trial on the effect of selegiline in early Parkinsonian patients treated with levodopa. *Eur J Neurol*. 1999;6(2):141-150. Doi:
- Radley JJ, Sawchenko PE. Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. *J Comp Neurol*. 2015;523(18):2769-2787. Doi: 10.1002/cne.23815.
- Rana S, Pugh PC, Jackson N, Clinton SM, Kerman IA. Inborn stress reactivity shapes adult behavioral consequences of early-life maternal separation stress. *Neurosci Lett*. 2015;584:146-150. Doi: 10.1016/j.neulet.2014.10.011.
- Randesi M, Zhou Y, Mazid S, Odell SC, Gray JD, Correa da Rosa J, McEwen BS, Milner TA, Kreek MJ. Sex differences after chronic stress in the expression of opioid-, stress- and neuroplasticity-related genes in the rat hippocampus. *Neurobiol Stress*. 2018;8:33-41. Doi: 10.1016/j.ynstr.2018.01.001.
- Renard GM, Rivarola MA, Suarez MM. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25(6):373-379. Doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.07.001.
- Renard GM, Rivarola MA, Suarez MM. Gender-dependent effects of early maternal separation and variable chronic stress on vasopressinergic activity and glucocorticoid receptor expression in adult rats. *Dev Neurosci*. 2010;32(1):71-80. Doi: 10.1159/000280102.
- Revesz D, Tjernstrom M, Ben-Menachem E, Thorlin T. Effects of vagus nerve stimulation on rat hippocampal progenitor proliferation. *Exp Neurol*. 2008;214(2):259-265. Doi: 10.1016/j.expneurol.2008.08.012.
- Ricon T, Toth E, Leshem M, Braun K, Richter-Levin G. Unpredictable chronic stress in juvenile or adult rats has opposite effects, respectively, promoting and impairing resilience. *Stress*. 2012;15(1):11-20. Doi: 10.3109/10253890.2011.572207.
- Richards EM, Mathews DC, Luckenbaugh DA, Ionescu DF, Machado-Vieira R, Niciu MJ, Duncan WC, Nolan NM, Franco-Chaves JA, Hudzik T, Maciag C, Li S, Cross A, Smith MA, Zarate CA, Jr. A randomized, placebo-controlled pilot trial of the delta opioid receptor agonist AZD2327 in anxious depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(6):1119-1130. Doi: 10.1007/s00213-015-4195-4.
- Rojas PS, Neira D, Munoz M, Lavandero S, Fiedler JL. Serotonin (5-HT) regulates neurite outgrowth through 5-HT1A and 5-HT7 receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 2014;92(8):1000-1009. Doi: 10.1002/jnr.23390.



- Roozendaal B, McGaugh JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem.* 1996;65(1):1-8. Doi: 10.1006/nlme.1996.0001.
- Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci.* 1997;9(1):76-83. Doi:
- Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun.* 2015; Doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.017.
- Roth TC, 2nd, Brodin A, Smulders TV, LaDage LD, Pravosudov VV. Is bigger always better? A critical appraisal of the use of volumetric analysis in the study of the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1542):915-931. Doi: 10.1098/rstb.2009.0208.
- Roy A, Campbell MK. A unifying framework for depression: bridging the major biological and psychosocial theories through stress. *Clin Invest Med.* 2013;36(4):E170-190. Doi:
- Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC. Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci.* 2002;116(4):530-538. Doi:
- Sachs BD, Rodriguiz RM, Tran HL, Iyer A, Wetsel WC, Caron MG. Serotonin deficiency alters susceptibility to the long-term consequences of adverse early life experience. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;53:69-81. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.12.019.
- Sachs BD, Tran HL, Folse E, Caron MG. Brain-region-specific Molecular Responses to Maternal Separation and Social Defeat Stress in Mice. *Neuroscience.* 2018;373:122-136. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.018.
- Sampath D, Sabitha KR, Hegde P, Jayakrishnan HR, Kutty BM, Chattarji S, Rangarajan G, Laxmi TR. A study on fear memory retrieval and REM sleep in maternal separation and isolation stressed rats. *Behav Brain Res.* 2014;273:144-154. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.034.
- Sandi C. Stress and cognition. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci.* 2013;4(3):245-261. Doi: 10.1002/wcs.1222.
- Sandi C, Merino JJ, Cordero MI, Touyarot K, Venero C. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience.* 2001;102(2):329-339. Doi:
- Sapolsky RM. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci.* 2015;18(10):1344-1346. Doi: 10.1038/nn.4109.
- Schmidt MV. Molecular mechanisms of early life stress -lessons from mouse models. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;34(6):845-852. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.002.
- Schmidt MV. Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(3):330-338. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.07.001.



- Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21(3):125-132. Doi: 10.1016/j.neurosci.2003.05.013.
- Schmidt MV, Oitzl MS, Levine S, de Kloet ER. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002;139(1):39-49. Doi: 10.1016/j.brainresdev.2002.05.002.
- Schoenfeld T.J, McCausland HC, Morris HD, Padmanaban V, Cameron HA. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biol Psychiatry*. 2017;82(12):914-923. Doi: 10.1016/j.biopsych.2017.05.013.
- Schwabe L, Joels M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS. Stress effects on memory: an update and integration. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(7):1740-1749. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.07.002.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*. 2003;160(8):1516-1518. Doi: 10.1176/appi.ajp.160.8.1516.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):3908-3913. Doi: 10.1073/pnas.93.9.3908.
- Silva RC, Gargaro AC, Brandao ML. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behav Brain Res*. 2004;151(1-2):93-101. Doi: 10.1016/j.bbr.2003.08.015.
- Slomianka L, West MJ. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. *Neuroscience*. 2005;136(3):757-767. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.086.
- Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;83(2):186-193. Doi: 10.1016/j.pbb.2006.01.004.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000;97(2):253-266. Doi: 10.1016/S0304-3940(00)01111-1.
- Sousa N, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res*. 1998;794(2):199-210. Doi: 10.1016/S0169-3280(98)00111-1.
- Souza RR, Dal Bo S, de Kloet ER, Oitzl MS, Carobrez AP. Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task. *Neuropharmacology*. 2014;79:201-211. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.017.
- Staub DR, Spiga F, Lowry CA. Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res*. 2005;1044(2):176-189. Doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.080.

- Stevenson CW, Spicer CH, Mason R, Marsden CA. Early life programming of fear conditioning and extinction in adult male rats. *Behav Brain Res.* 2009;205(2):505-510. Doi: 10.1016/j.bbr.2009.08.005.
- Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky W, Peddie CJ, Rodriguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL, Popov VI. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience.* 2005;131(1):43-54. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.031.
- Stiedl O, Misane I, Spiess J, Ogren SO. Involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. *J Neurosci.* 2000;20(22):8515-8527. Doi:
- Suárez M, Molina S, Rivarola MA, Perassi NI. Effects of maternal deprivation on adrenal and behavioural responses in rats with anterodorsal thalamic nuclei lesions. *Life Sci.* 2002;71(10):1125-1137. Doi:
- Sun XM, Tu WQ, Shi YW, Xue L, Zhao H. Female-dependent impaired fear memory of adult rats induced by maternal separation, and screening of possible related genes in the hippocampal CA1. *Behav Brain Res.* 2014;267:111-118. Doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.022.
- Sutanto W, Rosenfeld P, de Kloet ER, Levine S. Long-term effects of neonatal maternal deprivation and ACTH on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;92(2):156-163. Doi:
- Svenningsson P, Bateup H, Qi H, Takamiya K, Huganir RL, Spedding M, Roth BL, McEwen BS, Greengard P. Involvement of AMPA receptor phosphorylation in antidepressant actions with special reference to tianeptine. *Eur J Neurosci.* 2007;26(12):3509-3517. Doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05952.x.
- Svoboda KR, Adams CE, Lupica CR. Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *J Neurosci.* 1999;19(1):85-95. Doi:
- Swanson LW, Cowan WM. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1977;172(1):49-84. Doi: 10.1002/cne.901720104.
- Tanahashi S, Yamamura S, Nakagawa M, Motomura E, Okada M. Effect of lamotrigine and carbamazepine on corticotropin-releasing factor-associated serotonergic transmission in rat dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;220(3):599-610. Doi: 10.1007/s00213-011-2506-y.
- Tata DA, Anderson BJ. The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiol Behav.* 2010;99(2):186-193. Doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.008.
- Toda H, Boku S, Nakagawa S, Inoue T, Kato A, Takamura N, Song N, Nibuya M, Koyama T, Kusumi I. Maternal separation enhances conditioned fear and decreases the mRNA levels of the neurotensin receptor 1 gene with hypermethylation of this gene in the rat amygdala. *PLoS One.* 2014;9(5):e97421. Doi: 10.1371/journal.pone.0097421.





- Torregrossa MM, Jutkiewicz EM, Mosberg HI, Balboni G, Watson SJ, Woods JH. Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. *Brain Res.* 2006;1069(1):172-181. Doi: 10.1016/j.brainres.2005.11.005.
- Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Rolthmann LG, Hoffmann ES, Brenhouse H, Grassi-Oliveira R. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;68:489-503. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.021.
- Trujillo V, Durando PE, Suarez MM. Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. *Stress.* 2015:1-13. Doi: 10.3109/10253890.2015.1105958.
- Trujillo V, Durando PE, Suarez MM. Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. *Stress.* 2016;19(1):91-103. Doi: 10.3109/10253890.2015.1105958.
- Tynan RJ, Beynon SB, Hirwood M, Johnson SJ, Nilsson M, Woods JJ, Walker FR. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol.* 2013;126(1):75-91. Doi: 10.1007/s00401-013-1102-0.
- Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Funato H, Hobara T, Otsuki K, Yamagata H, McEwen BS, Watanabe Y. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci.* 2010;30(45):15007-15018. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.1436-10.2010.
- Van den Hove DL, Leibold NK, Strackx E, Martinez-Claros M, Lesch KP, Steinbusch HW, Schruers KR, Prickaerts J. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(4):595-607. Doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.09.006.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 1999;2(3):266-270. Doi: 10.1038/6368.
- Vander Weele CM, Saenz C, Yao J, Correia SS, Goosens KA. Restoration of hippocampal growth hormone reverses stress-induced hippocampal impairment. *Front Behav Neurosci.* 2013;7:66. Doi: 10.3389/fnbeh.2013.00066.
- Vasic N, Walter H, Hose A, Wolf RC. Gray matter reduction associated with psychopathology and cognitive dysfunction in unipolar depression: a voxel-based morphometry study. *J Affect Disord.* 2008;109(1-2):107-116. Doi: 10.1016/j.jad.2007.11.011.
- Vazquez DM, Lopez JF, Van Hoers H, Watson SJ, Levine S. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. *Brain Res.* 2000;855(1):76-82. Doi:
- Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep.* 2013;65(6):1451-1461. Doi:



- Vicentic A, Francis D, Moffett M, Lakatos A, Rogge G, Hubert GW, Harley J, Kuhar MJ. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience*. 2006;140(1):355-365. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.008.
- Vivinetto AL, Suarez MM, Rivarola MA. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res*. 2013;240:110-118. Doi: 10.1016/j.bbr.2012.11.014.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 2002;22(15):6810-6818. Doi: 20026655.
- Walker AK, Nakamura T, Byrne RJ, Naicker S, Tynan RJ, Hunter M, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(10):1515-1525. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.010.
- Walker FR, Nilsson M, Jones K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets*. 2013;14(11):1262-1276. Doi:
- Wang L, Jiao J, Dulawa SC. Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology*. 2011;216(2):207-218. Doi: 10.1007/s00213-011-2209-4.
- Waselus M, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Collateralized dorsal raphe nucleus projections: a mechanism for the integration of diverse functions during stress. *J Chem Neuroanat*. 2011;41(4):266-280. Doi: 10.1016/j.jchemneu.2011.05.011.
- Watanabe Y, Gould E, Daniels DC, Cameron H, McEwen BS. Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 1992;222(1):157-162. Doi:
- Watanabe Y, Sakai RR, McEwen BS, Mendelson S. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT1A and 5-HT2 receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res*. 1993;615(1):87-94. Doi:
- Watson JB, Rayner R. Conditioned emotional reactions. 1920. *Am Psychol*. 2000;55(3):313-317. Doi:
- Weaver IC. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off. *Epigenetics*. 2007;2(1):22-28. Doi:
- Weininger O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science*. 1954;119(3087):285-286. Doi:
- Weissman MM, Bland R, Joyce PR, Newman S, Wells JE, Wittchen HU. Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives. *J Affect Disord*. 1993;29(2-3):77-84. Doi:
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005;52(2):90-110. Doi: 10.1159/000087097.
- Willner P, Scheel-Kruger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(10 Pt 1):2331-2371. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.12.007.

- Winciewicz D, Braszko JJ. Angiotensin II AT1 receptor blockade by telmisartan reduces impairment of spatial maze performance induced by both acute and chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(3):495-505. Doi: 10.1177/1470320314526269.
- Wirth A, Holst K, Ponimaskin E. How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Prog Neurobiol.* 2017;151:35-56. Doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.03.007.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;911:1-24. Doi:
- Won E, Kim YK. Stress, the Autonomic Nervous System, and the Immune-kynurenine Pathway in the Etiology of Depression. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(7):665-673. Doi:
- Wong ML, Kling MA, Munson PJ, Listwak S, Licinio J, Prolo P, Karp B, McCutcheon IE, Geraciotti TD, Jr., DeBellis MD, Rice KC, Goldstein DS, Veldhuis JD, Chrousos GP, Oldfield EH, McCann SM, Gold PW. Pronounced and sustained central hyperadrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):325-330. Doi:
- Woo YS, Bahk WM, Jeong JH, Lee SH, Sung HM, Pae CU, Koo BH, Kim W. Tianeptine combination for partial or non-response to selective serotonin re-uptake inhibitor monotherapy. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2013;67(4):219-227. Doi: 10.1111/pcn.12042.
- Woolley CS, Gould E, McEwen BS. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 1990;531(1-2):225-231. Doi:
- Xi G, Hui J, Zhang Z, Liu S, Zhang X, Teng G, Chan KC, Wu EX, Nie B, Shan B, Li L, Reynolds GP. Learning and memory alterations are associated with hippocampal N-acetylaspartate in a rat model of depression as measured by 1H-MRS. *PLoS One.* 2011;6(12):e28686. Doi: 10.1371/journal.pone.0028686.
- Xiong GJ, Yang Y, Cao J, Mao RR, Xu L. Fluoxetine treatment reverses the intergenerational impact of maternal separation on fear and anxiety behaviors. *Neuropharmacology.* 2015;92:1-7. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.026.
- Yau SY, Lau BW, Tong JB, Wong R, Ching YP, Qiu G, Tang SW, Lee TM, So KF. Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behaviour in stressed rats. *PLoS One.* 2011;6(9):e24263. Doi: 10.1371/journal.pone.0024263.
- Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem.* 2010;114(6):1840-1851. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06893.x.
- Zhang H, Petit GH, Gaughwin PM, Hansen C, Ranganathan S, Zuo X, Smith R, Roybon L, Brundin P, Mobley WC, Li JY. NGF rescues hippocampal cholinergic neuronal markers, restores neurogenesis, and improves the spatial working memory in a mouse model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis.* 2013;2(1):69-82. Doi: 10.3233/JHD-120026.

- Zhang H, Torregrossa MM, Jutkiewicz EM, Shi YG, Rice KC, Woods JH, Watson SJ, Ko MC. Endogenous opioids upregulate brain-derived neurotrophic factor mRNA through delta- and micro-opioid receptors independent of antidepressant-like effects. *Eur J Neurosci.* 2006;23(4):984-994. Doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04621.x.
- Zhang X, Wang B, Jin J, An S, Zeng Q, Duan Y, Yang L, Ma J, Cao X. Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. *Brain Res Bull.* 2014;108:44-50. Doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.08.005.
- Zhou M, Kindt M, Joels M, Krugers HJ. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PLoS One.* 2011;6(10):e26220. Doi: 10.1371/journal.pone.0026220.
- Zhu S, Wang J, Zhang Y, Li V, Kong J, He J, Li XM. Unpredictable chronic mild stress induces anxiety and depression-like behaviors and inactivates AMP-activated protein kinase in mice. *Brain Res.* 2014;1576:81-90. Doi: 10.1016/j.brainres.2014.06.002.
- Zoladz PR, Fleshner M, Diamond DM. Differential effectiveness of tianeptine, clonidine and amitriptyline in blocking traumatic memory expression, anxiety and hypertension in an animal model of PTSD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;44:1-16. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.01.001.

