

Estudio del impacto de la malnutrición temprana sobre la anhedonia y la depresión : un abordaje experimental © 2022 by Gutiérrez, María Cecilia is licensed under Creative Commons [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



# **Estudio del impacto de la malnutrición temprana sobre la anhedonia y la depresión. Un abordaje experimental**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

María Cecilia Gutiérrez

Farmacéutica

Directora: Dra. Analía Valdomero

*Universidad Nacional de Córdoba*

*Facultad de Ciencias Químicas*

*Departamento de Farmacología Otto Orsingher*

*Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET)*

*Córdoba, Argentina*

2022

## **Comisión de tesis**

### **Directora:**

Dra. Analía Valdomero

### **Miembros:**

Dr. Gabriel Ricardo Cuadra<sup>1</sup>

Dr. Pablo Héctor Horacio López<sup>2</sup>

Dr. Santiago Quiroga<sup>2</sup>

### **Evaluador externo:**

Dr. Fernando Gabriel Correa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET).

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET).

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFBO-CONICET).

El presente trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Farmacología Otto Orsingher de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET), de acuerdo con la reglamentación vigente en dicha Facultad para optar por el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Durante la ejecución de este estudio, la tesista obtuvo una Beca de Doctorado otorgada por la Secretaría de Ciencia y Tecnología (SeCyT, 2016-2021), seguida por una Beca de Finalización de Doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, 2021-2023). La autora se desempeñó como Profesora Asistente del Departamento de Farmacología Otto Orsingher, Facultad de Ciencias Químicas (2016-2022).

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por SeCyT y CONICET.

A mi novio  
y a mis padres,  
con mucho amor y cariño

## **Agradecimientos**

A la Dra. Analía Valdomero, por guiar esta etapa de mi formación académica con dedicación, valioso asesoramiento y enorme apoyo. Gracias Ana por confiar en mí, por tu alegría que contagia, cariño y paciencia, por siempre incentivar me a seguir adelante a pesar de las dificultades y por tus enseñanzas que me ayudaron a crecer como profesional y persona.

A los miembros de la comisión de tesis Dr. Gabriel Cuadra, Dr. Pablo López y Dr. Santiago Quiroga, por sus sugerencias y el seguimiento a lo largo de estos años.

Al Dr. Fernando Correa por aceptar la evaluación de este trabajo.

Al Departamento de Farmacología Otto Orsingher por haberme facilitado el lugar de trabajo para la realización de esta tesis.

A SeCyT y CONICET por el apoyo económico brindado.

Al Dr. Gastón Calfa y a Ramiro Comas Mutis, por su colaboración en la realización de los experimentos para el análisis de la plasticidad estructural.

A la Dra. Andrea Cragolini, por su colaboración con los experimentos de Western Blot y su enseñanza de la técnica.

A la Dra. Silvia Bustos, por sus aportes durante la escritura de la tesis y por el cariño siempre brindado.

A todos aquellos investigadores, becarios y secretarios del departamento que de una forma u otra me han ayudado durante esta etapa.

A Elsa Pereyra, por la asistencia técnica y por sus enseñanzas en los principios de mi trabajo en el laboratorio, siempre acompañadas de risas.

A Estela Salde, Lorena Mercado y Leandro Oliveros, por la asistencia técnica brindada en los experimentos realizados y su excelente predisposición.

A Javier Reparaz por su trabajo en el mantenimiento de los animales en el bioterio.

A Cecilia Perondi, gracias por tu amistad, compañerismo, colaboración con los experimentos e invaluable ayuda tanto dentro como fuera del ámbito laboral.

A todo el grupo de la "Sucu" Ana, Gabriel, Elsa, Ceci y Otto, por todos los lindos momentos compartidos y por las enseñanzas que me llevo de cada uno de ustedes.

A mis padres, Sergio y Leonor, por el apoyo constante durante estos años, por todo su esfuerzo y las oportunidades que me han brindado, pero sobre todo por enseñarme a ser mejor persona con su ejemplo.

A mis hermanos Agu, Euge, Sol, Gime, Cele, Gabi, Tomi y Belén, por estar siempre que los necesité y levantarme el ánimo.

A Iván, por su amistad y por el arreglo exprés de mi computadora para terminar la tesis.

A Nicolás, mi compañero de vida, por su comprensión, enorme ayuda, paciencia y amor incondicional. Tu apoyo y confianza constante me dieron la fuerza que necesitaba para dejar plasmado en este escrito mi trabajo. Gracias por iluminar cada uno de mis días, por las sonrisas que sacas en mí y por lo feliz que soy de tenerte a mi lado. Te amo.

*“Nosotros somos culpables de muchos errores y muchas faltas, pero nuestro peor crimen es el abandono de los niños negándoles la fuente de la vida. Muchas de las cosas que nosotros necesitamos pueden esperar, los niños no pueden, ahora es el momento, sus huesos están en formación, su sangre también lo está y sus sentidos se están desarrollando, a él nosotros no podemos contestarle mañana, su nombre es hoy”*

Gabriela Mistral

## Índice

Siglas y acrónimos.....	X
<b>Resumen</b> .....	1
Abstract .....	4
<b>Introducción</b> .....	6
Malnutrición y depresión: definiciones y prevalencia.....	7
<i>Malnutrición</i> .....	7
<i>Trastorno depresivo mayor</i> .....	14
<i>Relación desnutrición-depresión</i> .....	18
Malnutrición y desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) .....	18
Etiología de la depresión.....	23
Circuito neuronal de la depresión .....	25
Hipótesis sobre el desarrollo del trastorno depresivo mayor .....	29
<i>Hipótesis de deficiencia de neurotransmisores-Teoría monoaminérgica</i> .....	29
<i>Disfunción del eje HPA</i> .....	30
<i>Hipótesis neuroinflamatoria</i> .....	31
<i>Hipótesis neurotrófica</i> .....	33
BDNF, señalización y su alteración en la depresión .....	37
<i>Estructura, vías de señalización y funciones del receptor TrkB</i> .....	37
<i>Alteraciones de BDNF en el circuito neuronal de la depresión</i> .....	40
Anhedonia.....	41
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	43
<b>Materiales y métodos</b> .....	47
Animales.....	48
Esquema de hiponutrición proteica perinatal .....	49
Protocolo de separación materna .....	49
Grupos experimentales.....	50
Evaluaciones conductuales .....	53
Estudios moleculares .....	58
Análisis de la plasticidad estructural .....	62
Estudio de la reversión conductual .....	64
Análisis estadístico .....	68

<b>Resultados</b> .....	69
Impacto de la hiponutrición proteica perinatal en el peso corporal y cerebral de animales de 70 días de edad .....	70
Consecuencias conductuales de la hiponutrición proteica perinatal.....	71
Participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en la facilitación de la anhedonia inducida por el déficit nutricional temprano .....	76
Efecto de la injuria nutricional perinatal en la plasticidad estructural en NAc e hipocampo.....	81
Estudio de la reversión de la anhedonia facilitada por la hiponutrición proteica perinatal.....	85
<b>Discusión</b> .....	90
Impacto de la malnutrición proteica perinatal en el peso corporal y cerebral de animales adultos .....	92
Influencia de la hiponutrición proteica perinatal sobre el desarrollo de conductas tipo depresivas .....	94
Participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en la anhedonia facilitada por el déficit proteico perinatal .....	98
Impacto de la hiponutrición proteica perinatal en la densidad espinal de neuronas de NAc e hipocampales .....	103
<b>Conclusión</b> .....	107
<b>Bibliografía</b> .....	109
<b>Producción científica</b> .....	127

## **Siglas y acrónimos**

**5-HT:** 5-Hidroxitriptamina-Serotonina

**ACTH:** Hormona adrenocorticotropina (del inglés *Adrenocorticotropic Hormone*)

**ANOVA:** Análisis de la varianza (del inglés *Analysis of Variance*)

**AP:** Anteroposterior

**ATV:** Área Tegmental Ventral

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

**C:** Control (dieta con 24% de caseína)

**CA:** Cuerno de Amón

**COVID-19:** Enfermedad del coronavirus de 2019 (del inglés *Coronavirus Disease*)

**CPF:** Corteza Prefrontal

**CREB:** Proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc (del inglés *cAMP Response Element-Binding protein*)

**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina (del inglés *Corticotropin-Releasing Hormone*)

**CRS:** Estrés de inmovilidad (del inglés *Chronic Restraint Stress*)

**CSDS:** Estrés crónico de derrota social (del inglés *Chronic Social Defeat Stress*)

**CUMS/CMS:** Estrés crónico leve e impredecible (del inglés *Chronic Unpredictable Mild Stress*)

**DA:** Dopamina

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

**DPN:** Día Postnatal

**DSM:** Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

**DV:** Dorsoventral

**ECL:** Quimioluminiscencia (del inglés *Enhanced Chemiluminescence*)

**EEM:** Error Estándar de la Media

**ERK:** Proteína quinasa regulada por señal extracelular (del inglés *Extracellular signal Regulated Kinase*)

**GD:** Giro Dentado

**GSK-3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (del inglés *Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* )

**H:** Hiponutrido (dieta con 8% de caseína)

**HPA:** Eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal

**IHME:** Instituto de Sanimetría y Evaluación Sanitaria (del inglés *Institute for Health Metrics and Evaluations*)

**IL:** Interleuquina

**i.p.:** Intraperitoneal

**IP3:** Inositol trifosfato (del inglés *Inositol trisphosphate*)

**L:** Lateral

**LH:** Indefensión aprendida (del inglés *Learned Helplessness*)

**LPS:** Lipopolisacárido

**LTP:** Potenciación a largo plazo (del inglés *Long-Term Potentiation*)

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

**MPE:** Malnutrición Proteico-Energética

**MSN:** Del inglés *Medium Spiny Neurons*

**NA:** Noradrenalina

**NAc:** Núcleo Accumbens

**NGF:** Factor de crecimiento neuronal (del inglés *Nerve Growth Factor*)

**NSM:** No Separado de la Madre

**NT:** Neurotrofina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**p75<sup>NTR</sup>:** Receptor p75 de neurotrofinas

**PFA:** Paraformaldehído

**PI3K:** Fosfatidilinositol-3-quinasa (del inglés *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)

**PLC:** Fosfolipasa C (del inglés *Phospholipase C*)

**p-TrkB:** Forma fosforilada del receptor TrkB

**PVDF:** Difluoruro de polivinilideno (del inglés *Polyvinylidene Difluoride*)

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*)

**SM:** Separado de la madre

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**Trk:** Familia de receptores tirosina quinasa

**TrkB:** Receptor tirosina quinasa de BDNF

**TrkB-FL:** Forma *full-length* del receptor TrkB

**TrkB-T:** Forma truncada del receptor TrkB

---

---

# *Resumen*

---

---

La desnutrición infantil y los desórdenes psiquiátricos de naturaleza depresiva representan importantes problemas con alto impacto socioeconómico y sanitario a nivel mundial, dado los millones de niños que sufren algún grado de desnutrición y el incremento expansivo de individuos que padecen depresión.

Diversas evidencias experimentales han demostrado que una dieta inadecuada durante la ontogénesis del SNC, puede causar alteraciones anatómicas, neurofisiológicas, neuroquímicas y conductuales irreversibles, aún luego de largos periodos de recuperación nutricional. Estudios clínicos indican que individuos afectados por malnutrición durante la niñez presentan manifestaciones de patologías psiquiátricas en un porcentaje mayor al resto de la población. A fin de investigar si la hiponutrición proteica perinatal facilita la aparición de conductas tipo depresivas inducidas por un estímulo estresante temprano, ratas adultas controles (C) e hiponutridas (H) sujetas a separación materna, fueron sometidas a diferentes paradigmas conductuales a fin de evaluar anhedonia, alteraciones cognitivas, desesperanza y ansiedad. Los resultados obtenidos demostraron que la injuria nutricional *per se* facilita el desarrollo de las conductas tipo depresivas evaluadas, sin producir cambios durante la evaluación de ansiedad.

La anhedonia es considerada un síntoma particularmente relevante de la depresión. Se define como la incapacidad para experimentar placer y experimentalmente se pone de manifiesto como una menor preferencia a sacarosa en relación al consumo de agua. Con el objetivo de dilucidar posibles mecanismos neurobiológicos que subyacen a la conducta anhedónica, se evaluaron los niveles de BDNF, de su receptor de alta afinidad (TrkB) y su forma fosforilada (p-TrkB) en núcleo accumbens (NAc) e hipocampo de animales C y H una vez finalizada la prueba de preferencia a sacarosa. Considerando que BDNF tiene un rol importante en la neuroplasticidad, estudiamos el impacto del insulto nutricional temprano en la densidad de espinas dendríticas en neuronas de NAc (*core* y *shell*) y de hipocampo (área CA1). Los hallazgos moleculares y morfológicos mostraron un patrón de alteración área cerebral dependiente. Mientras en NAc de animales H se observó un incremento en los niveles de BDNF y de la relación p-TrkB/TrkB, acompañado de un aumento en la densidad de espinas dendríticas de su población neuronal, los mencionados parámetros se encontraron disminuidos en hipocampo.

Finalmente, la infusión bilateral del antagonista selectivo del receptor TrkB (ANA-12), produjo efectos diferenciales dependiendo la estructura blanco y la condición nutricional. Así, se observó una reversión del déficit hedónico tras su administración en NAc *shell* de ratas H, ausencia de este efecto antidepresivo cuando se inyectó en NAc *core* e inducción de la conducta anhedónica en animales C luego de su infusión en CA1. En conjunto, los hallazgos obtenidos demuestran que la malnutrición proteica temprana facilita la aparición de conductas depresivas en la edad adulta e incrementa el riesgo de anhedonia, sugiriendo un rol clave de la vía de señalización BDNF-TrkB en NAc e hipocampo en el mecanismo neurobiológico que subyace a dicho síntoma. Las modificaciones en la vía BDNF-TrkB serían responsables de disturbios morfológicos que podrían afectar la capacidad adaptativa del cerebro e incrementar el riesgo de aparición de conductas depresivas.

Extrapolados al género humano, nuestros resultados sugieren que individuos con antecedentes de episodios de desnutrición infantil son más vulnerables al desarrollo de anhedonia y trastornos depresivos durante la edad adulta.

**Abstract**

Childhood undernutrition and depressive-like disorders are major worldwide problems with a high socioeconomic and health impact, given the millions of children suffering from some degree of malnutrition and the expansive increase of individuals affected by depression.

Several experimental evidence have shown that an inadequate dietary intake, coinciding with the CNS ontogenesis process, has the potential to cause irreversible anatomical, neurophysiological, neurochemical and behavioral alterations, even after a long nutritional recovery period. Clinical studies indicate that individuals who experienced early malnutrition present manifestations of psychiatric disorders in a higher percentage than the rest of the population. To evaluate whether perinatal protein undernutrition facilitates the onset of early stress-induced depressive-like behaviors, well-nourished (C) and protein undernourished (H) adult rats submitted to maternal separation, were subjected to different behavioral tests to evaluate anhedonia, cognitive alterations, behavioral despair and anxiety. The results obtained demonstrated that nutritional injury *per se* facilitates the depressive-like behaviors evaluated, without affecting behavioral parameters related to anxiety.

Anhedonia, a relevant symptom of depression, is defined as the inability to experience pleasure. Experimentally, it is evidenced as a lower preference for sucrose in relation to water consumption. In order to elucidate possible neurobiological mechanisms underlying the anhedonic-like behavior observed in H-rats, we evaluated BDNF protein, the high affinity receptor of BDNF (TrkB) and its phosphorylated form (p-TrkB) levels in the nucleus accumbens (NAc) and the hippocampus of C- and H-animals immediately after the sucrose preference test. Bearing in mind that BDNF plays a key role in the neural plasticity, we studied the impact of early nutritional insult on the dendritic spine density at NAc (core and shell) and hippocampal CA1 neurons. Molecular and morphological findings showed a pattern of brain area-dependent alteration. Whereas in the NAc of H-animals we observed an increase in the levels of BDNF and the p-TrkB/TrkB ratio, together with an increase in the density of dendritic spines at its neuronal population, these parameters were decreased in the hippocampus.

Finally, bilateral infusion of the selective antagonist of TrkB receptor ANA-12, produced different effects depending on the target structure and nutritional condition. Briefly, we observed: a) a reversal of the hedonic deficit after administration into the NAc shell of H-rats, b) an absence of the antidepressant effect into the NAc core and c) an induction of anhedonic-like behavior in C-animals after infusion intra-CA1.

Altogether, these findings demonstrate that early protein malnutrition facilitates the onset of depressive-like behaviors and anhedonia in adulthood, suggesting a key role of the NAc and hippocampus BDNF-TrkB pathway in the neurobiological mechanism underlying this symptom. Moreover, alterations in the BDNF-TrkB pathway might induce morphological changes responsible for a lower coping ability of H-animals' brain and a higher risk of developing depressive-like behaviors.

Our results suggest that individuals subjected to malnutrition episodes during childhood are more vulnerable to develop anhedonia and depressive disorders during adulthood.

---

---

# *Introducción*

---

---

## **Malnutrición y depresión: definiciones y prevalencia**

### ➤ *Malnutrición*

De acuerdo a las normas internacionales de derechos humanos, todo individuo tiene derecho a una alimentación adecuada <sup>1)</sup>. Realizando un énfasis especial en la infancia, establecen que todos y cada uno de los niños deben tener garantizado el acceso a alimentos de calidad, enriquecidos en nutrientes y en cantidad suficiente. Esto es fundamental, ya que una apropiada nutrición es esencial para el desarrollo físico, mental, emocional y social <sup>(2)</sup>. La Convención sobre los Derechos del Niño establece que los Estados Parte garantizarán en la máxima medida posible la supervivencia y el desarrollo del niño <sup>(3)</sup>. No obstante, la malnutrición sigue siendo una de las principales amenazas para la salud, el crecimiento y el desarrollo de las capacidades de millones de infantes, así como también, para su supervivencia <sup>(2)</sup>.

Una nutrición adecuada implica un equilibrio entre el suministro y los requerimientos del organismo de nutrientes-energía, necesario para garantizar su crecimiento, desarrollo, mantenimiento, y funcionalidad <sup>(4; 5)</sup>. La malnutrición es entonces, consecuencia de un consumo deficiente, desequilibrado o excesivo de nutrientes y calorías o bien puede ser resultado de una mala asimilación de los alimentos, a causa de enfermedades subyacentes que impiden que el individuo utilice plenamente los alimentos que ingiere <sup>(6-8)</sup>.

La malnutrición abarca tres grandes grupos de afecciones: deficiencia de micronutrientes, sobrepeso y desnutrición. La coexistencia de estas múltiples formas en las que se manifiesta la malnutrición, es lo que se conoce como triple carga de la malnutrición <sup>(9)</sup>.

Una vertiente de la malnutrición es la deficiencia de micronutrientes, la cual aparece cuando el organismo no recibe cantidad suficiente de vitaminas y minerales esenciales. La carencia de los micronutrientes tiene consecuencias sobre la supervivencia, crecimiento, inmunidad y desarrollo cerebral del niño. Dado que este tipo de carencia es identificada generalmente cuando la deficiencia está muy avanzada y es más complicado revertir sus consecuencias, es que se la conoce como el hambre oculta <sup>(7; 9; 10)</sup>.

El sobrepeso y la obesidad, ocurren cuando las calorías obtenidas de la ingesta de alimentos y bebidas exceden los requerimientos energéticos del niño. Se ponen de manifiesto, como resultado no sólo de una ingesta excesiva de alimentos con alto contenido en grasas y azúcares sino también debido a un estilo de vida sedentario. El sobrepeso y la obesidad en la infancia incrementan el riesgo de aparición temprana de enfermedades no transmisibles como la diabetes tipo II, enfermedades coronarias y depresión. Si bien este tipo de malnutrición era prevalente en países desarrollados, se ha observado un inquietante aumento de su incidencia en países de bajos y medianos ingresos. Esto evidencia la mayor disponibilidad en diferentes países de alimentos ultra procesados, ricos en calorías, pero pobres en nutrientes, a un costo más accesible (7; 9; 10).

Existe una paradoja a nivel mundial: mientras la prevalencia del sobrepeso-obesidad se incrementa de manera alarmante y hay comida suficiente para que toda la población pueda alimentarse apropiadamente, decenas de millones de niños continúan teniendo un escaso acceso a los alimentos, viéndose afectados por la tercer vertiente de la malnutrición, la desnutrición (2; 11).

La desnutrición es el resultado de una alimentación inadecuada, donde la ingesta o absorción insuficiente de nutrimentos no permite satisfacer las necesidades del organismo (2; 6; 7). Si bien la desnutrición afecta a todos los grupos etarios, los niños son particularmente vulnerables a sus consecuencias a corto y largo plazo. Una alimentación inapropiada en cantidad y calidad durante los primeros 1000 días (desde la gestación hasta los dos años de vida) produce daños irreversibles sobre el desarrollo físico y cognitivo, afectando al niño por el resto de su vida (2; 7; 12). Razón por la que, este periodo es crítico para la implementación de intervenciones que permitan prevenir y reducir las consecuencias de una alimentación insuficiente. La desnutrición infantil puede manifestarse de distintas formas:



La desnutrición aguda se presenta con emaciación, lo cual refiere a un peso corporal que se encuentra por debajo del valor estándar de referencia para la estatura que posee el niño. Está asociada a una insuficiencia grave de nutrientes debido a un periodo reciente de ingesta inadecuada de alimentos y/o al padecimiento de enfermedades. Esto produce pérdida de tejido graso y muscular llevando a una rápida pérdida de peso en un breve periodo de tiempo o a la

imposibilidad de aumentar de peso. Estos niños son más susceptibles a retrasos en su crecimiento y desarrollo, tienen un sistema inmunológico más débil con mayor probabilidad de contraer enfermedades y un riesgo de muerte incrementado.



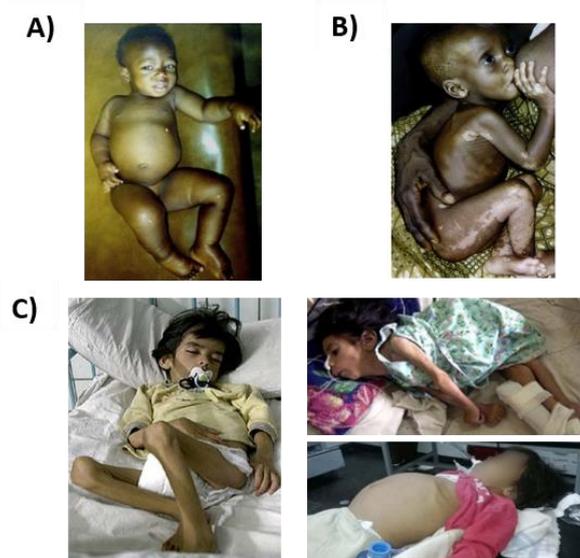
La desnutrición crónica involucra una nutrición inapropiada durante largos períodos de tiempo. Puede ser resultado de una nutrición materna inadecuada, una ingesta deficiente de nutrientes en la primera infancia y/o infecciones y enfermedades recurrentes. En consecuencia, se produce un retraso del crecimiento y del desarrollo físico y cognitivo, efectos que pueden ser permanentes. Los niños con retraso en el crecimiento presentan una talla que es inferior al valor recomendado para su edad. Mujeres que sufrieron desnutrición crónica durante su infancia tienen una mayor probabilidad de dar a luz niños prematuros o con bajo peso al nacer, los cuales, a su vez, tendrán un riesgo aumentado de sufrir retraso en el crecimiento (2; 6; 7; 9; 10; 13).

Un tipo de desnutrición importante a definir debido a su alta prevalencia en países en vías de desarrollo, a sus alarmantes consecuencias a largo plazo y a las altas tasas de mortalidad infantil que tiene asociada, es la malnutrición proteico-energética (MPE). La MPE aparece cuando la dieta no proporciona la cantidad suficiente de proteínas, energía (calorías) o ambas, para satisfacer las necesidades nutricionales del organismo. En algunos casos, esta carencia proteico-calórica se acompaña también de una deficiencia de vitaminas y minerales esenciales. Sus condiciones clínicas más severas incluyen al kwashiorkor, marasmo y a estados intermedios, el kwashiorkor marásmico (7; 14; 15).

Kwashiorkor es una palabra ghanesa que significa “enfermedad del niño desplazado”. Recibió esta denominación debido a que es común que aparezca en niños pequeños que son privados de la lactancia materna debido al nacimiento de un nuevo hermano, conduciendo a un destete temprano. Frecuentemente, estos niños suelen recibir dietas ricas en carbohidratos y bajas en proteínas. Si bien puede aparecer a cualquier edad, se observa más comúnmente en infantes de uno a tres años. La característica distintiva de los niños con kwashiorkor es la presencia de un abdomen protuberante y de edema generalizado que suele iniciar en los pies y piernas, pudiendo extenderse a las manos y cara con el avance de la patología (Figura 1 A). Presentan falta de crecimiento y el peso puede ser relativamente normal para la edad, aunque muchas veces el edema dificulta

detectar la presencia de emaciación. En estos niños, aparecen con frecuencia complicaciones como anemia, diarrea e infecciones respiratorias y cutáneas <sup>(4; 7; 14-16)</sup>.

El marasmo ocurre con mayor frecuencia en niños menores de 5 años, principalmente durante el primer año de vida. Es el resultado de una privación severa de calorías y nutrientes en general, debido a que el niño no recibe cantidad suficiente de leche materna o de alimentos. Los niños con marasmo poseen un peso muy por debajo de los estándares normales para su edad, pudiendo ser hasta un 60% menos de lo esperado. El aporte energético no puede compensar las necesidades del organismo, de manera que la grasa corporal y las proteínas musculares se utilizan como sustrato de energía. Como consecuencia, los niños presentan una importante pérdida muscular y de grasa subcutánea. Los menores con marasmo se describen con una apariencia de “piel y huesos”, en donde se observa que las costillas sobresalen, las extremidades inferiores son muy delgadas y la cara tiene una característica simiesca (Figura 1 B). En contraste con el kwashiorkor, no hay presencia de edema. A menudo muestran complicaciones como gastroenteritis aguda, deshidratación, anemias e infecciones. Por otra parte, hay niños que presentan un cuadro mixto que combina características clínicas del marasmo y kwashiorkor (kwashiorkor marásmico), cuyas principales manifestaciones son la presencia de edema acompañado de emaciación y pérdida muscular y de grasa subcutánea <sup>(4; 7; 14-16)</sup>.



**Figura 1.** Imagen de un niño con kwashiorkor (A) y marasmo (B). Reproducido de: Grover y Ee <sup>(16)</sup>. C) Niños con desnutrición en el norte argentino.

Si bien las causas inmediatas de cualquier tipo de desnutrición son la falta de una alimentación adecuada y/o la presencia de enfermedades e infecciones que causan pérdida anormal de nutrientes afectando su absorción y aprovechamiento, existen múltiples factores biológicos, socioeconómicos, ambientales y políticos que provocan que la desnutrición siga siendo un problema relevante a nivel mundial con mayor prevalencia en países de bajos y medianos ingresos <sup>(7; 15)</sup>.

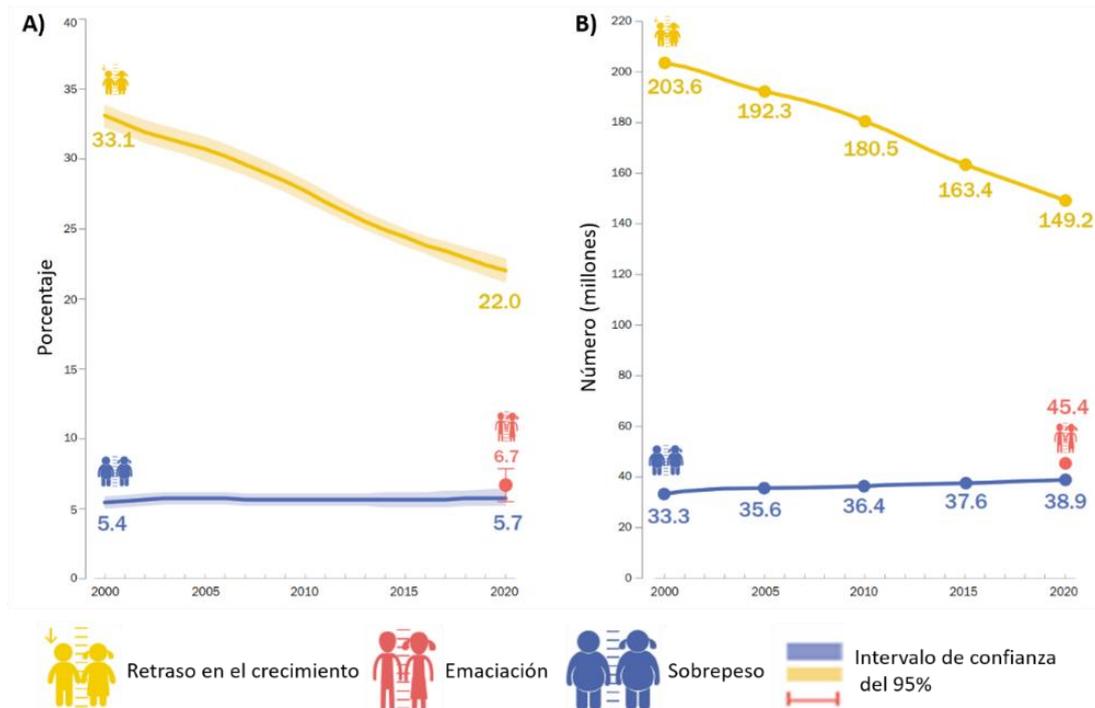
Un buen estado nutricional durante el embarazo es fundamental, ya que ello determina el peso al nacer, la salud, el estado nutricional y el pronóstico de vida del recién nacido. La desnutrición materna puede resultar en una nutrición intrauterina inapropiada y en el nacimiento de bebés con un peso inferior al adecuado, aumentando la posibilidad de desnutrición en las generaciones siguientes, provocando un círculo vicioso <sup>(7; 17)</sup>. La desnutrición infantil también se asocia a una lactancia materna inapropiada. La leche de la madre contiene todos los nutrientes y factores inmunológicos que los bebés necesitan para mantener una salud y un crecimiento óptimo <sup>(18)</sup>. Contrario a las recomendaciones, se estima que sólo 2 de cada 5 lactantes menores de seis meses son alimentados exclusivamente con leche materna. Preocupa el bajo porcentaje de lactancia materna durante este periodo, la reducción en la duración de la lactancia natural como así también la rápida introducción del uso de sustitutos de la leche de la madre que no proporcionan los mismos beneficios <sup>(9; 19)</sup>. Los recursos de la familia es otro factor importante que influye en el desarrollo del niño, ya que determinan las posibilidades de tener acceso a los alimentos, a sistemas de agua y saneamiento salubres y a atención sanitaria. El costo es un obstáculo que impide a muchas familias consumir una alta variedad de alimentos ricos en nutrientes. En este sentido, la situación de pobreza se considera una de las causas principales de la desnutrición. En familias pobres, sus bajos ingresos conducen a elegir alimentos de baja calidad y de menor costo <sup>(20)</sup>. Estos niños no sólo tienen mayor posibilidad de estar mal alimentados, sino también, de enfermar, de no terminar la escuela, de vivir en condiciones de hacinamiento sin saneamiento adecuado, de no tener acceso a agua apta para el consumo y de no obtener servicios sanitarios preventivos y atención médica cuando están enfermos <sup>(7; 9)</sup>. Por otra parte, la desnutrición puede aparecer en grandes grupos de población ya sea debido a desastres naturales relacionados con el clima, como sequías e inundaciones, o bien debido a desastres inducidos por el hombre, como guerras y migraciones forzadas. Estas afectan

la calidad, el precio, el acceso y la disponibilidad de los alimentos, produciendo generalmente escasez de los mismos <sup>(7; 9)</sup>.

Las consecuencias de una mala nutrición pueden ser severas y duraderas, tanto para los niños que la padecen como para las comunidades de las que forman parte. La desnutrición durante la primera infancia es un obstáculo para el crecimiento y desarrollo de las capacidades del niño, lo cual impacta a nivel de la salud, la educación y la productividad, con importantes consecuencias económicas. Existe una estrecha relación entre la desnutrición y el desarrollo intelectual, una nutrición deficiente durante los primeros 1000 días se asocia a un desarrollo cognitivo limitado que afecta el rendimiento escolar <sup>(4; 21)</sup>. Estudios realizados en diversos países indican que los niños malnutridos empiezan la escuela más tarde de lo normal, presentan mayor probabilidad de repetir cursos y de abandonar los estudios, limitando de esta manera sus posibilidades a futuro <sup>(9)</sup>. Otro impacto social de la desnutrición son los efectos que genera sobre la salud. La malnutrición no sólo puede causar enfermedades crónicas, cardiovasculares o metabólicas, sino que además genera una alteración en la función del sistema inmune, aumentando la predisposición a infecciones y contribuyendo sustancialmente a la morbilidad y mortalidad infantil <sup>(2; 5)</sup>. Las consecuencias de una nutrición inapropiada impactan también a nivel de la economía, ya que se generan mayores costos para el sistema de salud y educación como para las familias. La desnutrición limita las capacidades de los niños para prosperar en la sociedad y contribuir al progreso de su comunidad y de su país. El menor nivel educativo, el estado físico deficiente, las enfermedades relacionadas a la desnutrición y la mortalidad prematura generan una pérdida de la capacidad productiva, afectando las posibilidades de desarrollo económico de los países <sup>(2; 7)</sup>.

Las últimas estimaciones de desnutrición infantil realizadas en conjunto por el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (Unicef), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Grupo Banco Mundial (*World Bank Group*) fueron publicadas en el año 2021. El informe comunica la prevalencia a nivel mundial de la desnutrición crónica y aguda en niños menores de 5 años de edad y las estimaciones se basan, casi en su totalidad, en datos recopilados antes del 2020 debido a las políticas de distanciamiento físico, de manera que no consideran el impacto de la pandemia de COVID-19 (*coronavirus disease*). El retraso en el crecimiento afectó a 149.2 millones de niños, lo que representa

un 22% de la población de este rango etario, mientras que la emaciación siguió amenazando la vida de aproximadamente 45.4 millones de niños, equivalente a un 6.7% (22) (Figura 2).



**Figura 2. (A) Porcentaje y (B) número de niños menores de 5 años afectados por las distintas variantes de la malnutrición entre el periodo 2000-2020, a nivel mundial. Nótese la mayor prevalencia de niños con desnutrición, a pesar de una disminución en sus valores a lo largo de los años. Adaptado de: UNICEF, WHO, World Bank Group Joint Malnutrition Estimates, 2021 edition (22).**

En Argentina, el 1,6% (59,9 mil) y el 7,9% (291,5 mil) de los niños menores de 5 años se ven afectados por la desnutrición aguda y crónica respectivamente (22; 23).

Debido a las consecuencias económicas y sociales de la pandemia de COVID-19, se espera que la crisis sanitaria exacerbe todas las formas de malnutrición (9; 12; 24), siendo una de las condiciones más afectadas la desnutrición aguda (24). Considerando que los niveles de pobreza e indigencia en Argentina se vieron afectados de manera regresiva por la emergencia sanitaria (25), podría esperarse una mayor prevalencia de la desnutrición infantil respecto a la estimada en el 2019, con las devastadoras consecuencias a largo plazo.

Respecto a la incidencia de la MPE, el Instituto de Sanimetría y Evaluación Sanitaria (IHME por sus siglas del inglés *Institute for Health Metrics and Evaluations*) informó en

el año 2019, una prevalencia del 10.46 % (59.8 millones) y del 2.82% (76 mil) en niños menores de 5 años en todo el mundo y en Argentina respectivamente <sup>(26)</sup>.

El Instituto de Investigación Social Económica y política Ciudadana (ISEPCI) realizó un relevamiento en comedores y merenderos comunitarios de Argentina entre diciembre del 2020 y febrero del 2021, informando que en Córdoba un 3.5% de los niños y adolescentes menores de 18 años se ven afectados por un bajo peso y un 8.5% por una talla baja <sup>(27)</sup>.

➤ *Trastorno depresivo mayor*

Además de la desnutrición infantil, otra preocupación a nivel mundial son los problemas de salud mental. La salud mental hace referencia a un estado de bienestar emocional, psíquico y social que le permite al individuo hacer frente a los desafíos de la vida, utilizar sus habilidades, trabajar productivamente y contribuir al desarrollo de la comunidad de la que forma parte <sup>(28; 29)</sup>. Si bien existe una alta diversidad de trastornos mentales, en términos generales se caracterizan por pensamientos, emociones, comportamientos y relaciones sociales anormales <sup>(28)</sup>. Aquellos en los que la alteración del humor es una de las características principales, se los conoce como trastornos del estado de ánimo <sup>(30)</sup>. Estos incluyen distintas categorías de trastornos o desórdenes depresivos que se distinguen en base a la gravedad, cronicidad y persistencia: trastorno depresivo mayor, trastorno depresivo persistente (distimia) y trastorno no especificado <sup>(31)</sup>. El trastorno depresivo mayor, comúnmente denominado depresión, es uno de los más estudiados debido a su elevada prevalencia. El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5) <sup>(31)</sup> define a este desorden como una enfermedad crónica que afecta negativamente los sentimientos, pensamientos y la forma de actuar de una persona, causando sentimientos persistentes de tristeza y pérdida de interés por actividades que previamente resultaban placenteras.

El curso clínico del trastorno depresivo mayor se caracteriza por uno o más episodios depresivos separados, que se pueden distinguir de la actividad normal de la persona <sup>(30)</sup>. Estos episodios depresivos mayores consisten en la presencia durante la mayor parte del día, casi todos los días, por un periodo mínimo de 2 semanas consecutivas (la mayoría se extiende incluso durante meses), de al menos 5 de los síntomas que se

presentan en la Tabla 1 <sup>(31)</sup>. Es importante destacar que para un diagnóstico de depresión, uno de los síntomas que debe estar presente es: estado de ánimo deprimido y/o anhedonia, definida como una disminución importante del interés o pérdida de la capacidad para experimentar placer, por todas o casi todas las actividades de las que previamente se disfrutaba <sup>(31)</sup>.

Si bien los desórdenes depresivos afectan a personas de cualquier edad y condición social, hay individuos que presentan mayor riesgo de sufrir problemas de salud mental al estar expuestos a determinadas condiciones o situaciones adversas. Se incrementa el riesgo, entre otros, a causa de: pobreza y marginación, padecimiento de patologías crónicas, exposición a maltrato, abandono, discriminaciones y violaciones, problemas debidos al consumo de alcohol o de sustancias, edad avanzada o exposición a desastres naturales, conflictos, emergencias, exceso de trabajo u estrés psicosocial (desempleo, pérdida de un ser querido, divorcio, etc.) <sup>(28; 29; 32)</sup>.

La depresión es una condición discapacitante. Conduce a problemas emocionales y físicos, incrementa el riesgo de padecer otras enfermedades, afecta el desempeño de la persona en su trabajo, escolaridad y vida cotidiana, alterando las relaciones sociales, matrimoniales, familiares, laborales y en cualquier otro ámbito en los que se maneje el individuo y usualmente requiere tratamiento a largo plazo. Es muy frecuente la comorbilidad con síntomas de ansiedad, y suele además asociarse con consumo excesivo de alcohol y otras drogas <sup>(28; 30; 32)</sup>. La OMS define a la depresión como el principal factor que contribuye a la discapacidad mundial (término que abarca pérdida de la salud, limitaciones en las actividades, deficiencias en el rendimiento y restricciones en la participación en cualquier ámbito), y a las muertes por suicidio <sup>(28; 32)</sup>. Las personas depresivas tienen mayor probabilidad de muerte prematura, no sólo debido al suicidio sino también a problemas de salud que en muchos casos no se atienden <sup>(28)</sup>.

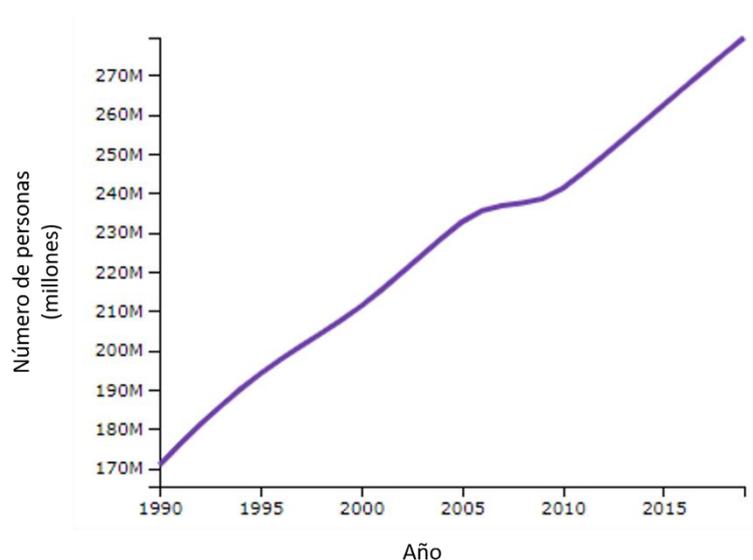
**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de episodio depresivo mayor. Según el *DSM-5* <sup>(31)</sup>.

<p><b>A.</b> Presencia de cinco (o más) de los siguientes síntomas durante un período de 2 semanas, que representan un cambio del funcionamiento previo; al menos uno de los síntomas debe ser (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o de la capacidad para el placer.</p> <p>(1) Estado de ánimo deprimido la mayor parte del día, casi todos los días, según se desprende de la información subjetiva (ej. se siente triste, vacío, sin esperanza) o de la observación por parte de otras personas (ej. se le ve lloroso). (Nota: En niños y adolescentes, el estado de ánimo puede ser irritable).</p> <p>(2) Disminución importante del interés o el placer por todas o casi todas las actividades la mayor parte del día, casi todos los días (como se desprende de la información subjetiva o de la observación).</p> <p>(3) Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso (ej. modificación de más de un 5% del peso corporal en un mes) o disminución o aumento del apetito casi todos los días. (Nota: En los niños, considerar el fracaso para el aumento de peso esperado.)</p> <p>(4) Insomnio o hipersomnia casi todos los días.</p> <p>(5) Agitación o retraso psicomotor casi todos los días (observable por parte de otros, no simplemente la sensación subjetiva de inquietud o de enlentecimiento).</p> <p>(6) Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.</p> <p>(7) Sentimiento de inutilidad o culpabilidad excesiva o inapropiada (que puede ser delirante) casi todos los días (no simplemente el autorreproche o culpa por estar enfermo).</p> <p>(8) Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o para tomar decisiones, casi todos los días (a partir de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas).</p> <p>(9) Pensamientos de muerte recurrentes (no sólo miedo a morir), ideas suicidas recurrentes sin un plan determinado, intento de suicidio o un plan específico para llevarlo a cabo.</p> <p><b>B.</b> Los síntomas causan malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento.</p> <p><b>C.</b> El episodio no se puede atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia o de otra afección médica. Nota: Los Criterios A-C constituyen un episodio de depresión mayor.</p> <p><b>D.</b> El episodio de depresión mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, un trastorno esquizofreniforme, un trastorno delirante, u otro trastorno especificado o no especificado del espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos.</p> <p><b>E.</b> Nunca ha habido un episodio maníaco o hipomaníaco.</p>
--

Las tendencias mundiales reflejan un inquietante aumento en la prevalencia de desórdenes psiquiátricos a lo largo de los años (Figura 3), lo cual trae aparejado no sólo consecuencias para el individuo que lo padece sino para el sistema sanitario, para la sociedad de la que forma parte y para la economía. Las consecuencias económicas de

los trastornos mentales son enormes, conllevan una variedad de costos indirectos asociados a la pérdida de productividad y mayores tasas de desempleo, sumado a los costos directos del tratamiento y de la atención sanitaria <sup>(29)</sup>. De acuerdo a las últimas estimaciones de la OMS y a los datos publicados por el IHME, los desórdenes depresivos afectan a un 3,8% de la población mundial, aproximadamente 280 millones de personas, con una mayor prevalencia en mujeres (4.5 %) que en hombres (2.9%). En particular, un 2.5% de la población mundial padece de trastorno depresivo mayor (185 millones). En Argentina el 2.7% de la población, equivalente a más de 1 millón de personas, se ve afectada por algún tipo de desorden depresivo, de los cuales 863 mil (2.04%) cursa con trastorno depresivo mayor. Diferenciando por sexo, se observa una prevalencia del 2.5% en mujeres respecto a un 1.5% en hombres <sup>(26; 33)</sup>.

Una revisión sistemática publicada en el 2021 (*Global Burden of Disease Study*) estimó que la pandemia de COVID-19 produjo, a nivel mundial, un incremento del 27.6% en los casos de trastorno depresivo mayor, afectando principalmente a las mujeres, los jóvenes de entre 20 y 24 años de edad y los países de bajos y medianos ingresos <sup>(34)</sup>.



**Figura 3.** Incremento de la prevalencia mundial de los desórdenes depresivos con el paso de los años. Obtenido de: Instituto de Sanimetría y Evaluación Sanitaria <sup>(26)</sup>.

➤ *Relación desnutrición-depresión*

La desnutrición infantil y la depresión son dos problemas relevantes y con gran trascendencia a nivel mundial, ya que no sólo constituyen un obstáculo para el desarrollo personal, sino que impactan a nivel social, económico y sanitario.

Diferentes grupos de investigación, analizaron las consecuencias de la hambruna padecida en China (La Gran Hambruna China, 1959-1961 <sup>(35; 36)</sup>) y Holanda (*The Dutch Hunger Winter*, octubre 1944-mayo 1945 <sup>(37; 38)</sup>) sobre el desarrollo de trastornos psiquiátricos. Los resultados demostraron que la exposición prenatal a una alimentación limitada e inapropiada se asoció a una baja calidad de salud mental, indicando un riesgo incrementado de padecer trastornos depresivos, esquizofrenia y desórdenes de personalidad antisocial en la edad adulta <sup>(36; 39-43)</sup>. Por otra parte, se describió una mayor prevalencia de síntomas depresivos durante la adolescencia y adultez en sujetos expuestos a MPE moderada o severa durante el primer año de vida y recuperados nutricionalmente, asegurando un buen estado de salud y nutrición a los 12 años <sup>(44-46)</sup>. Evaluar el impacto de la desnutrición infantil en sí misma resulta complicado debido al inseparable contexto socioeconómico, sanitario, ambiental y educacional que introduce numerosas variables que pueden influir en el desarrollo cerebral, físico y del comportamiento. El empleo de modelos experimentales en animales, permite eliminar o controlar diferentes factores extra nutricionales asociados con la población humana, además de permitir un control preciso de la composición de la dieta facilitando el estudio de un tipo específico de malnutrición. El uso de animales constituye una herramienta adicional para conocer y comprender cómo la malnutrición afecta el desarrollo del cerebro. Esto destaca la relevancia del estudio a nivel experimental, de la posible relación entre la malnutrición perinatal y la vulnerabilidad a desórdenes depresivos en la edad adulta, permitiendo separar los efectos deletéreos de la desnutrición del posible impacto de otras adversidades tempranas.

### **Malnutrición y desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)**

La nutrición tiene un rol esencial en la maduración, organización y funcionalidad del SNC, lo que conlleva a que este sistema sea vulnerable a las deficiencias nutricionales que ocurran durante su desarrollo. Este periodo involucra una secuencia regulada de eventos, entre los que se pueden mencionar procesos de proliferación, migración y

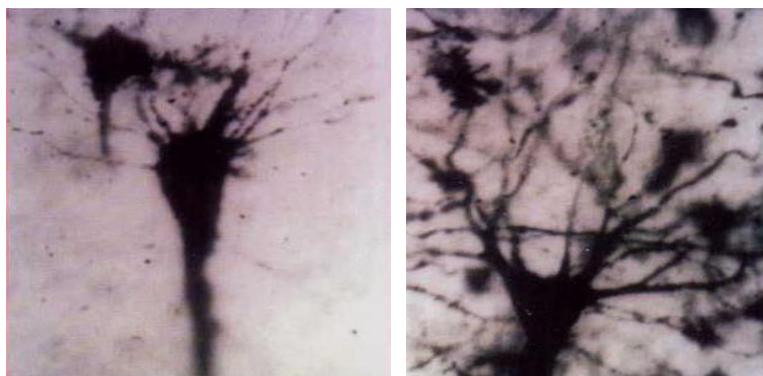
diferenciación celular mediante los cuales se desarrollan las células individuales (neuronas y células gliales), procesos de mielinización, formación de sinapsis, síntesis y liberación de neurotransmisores y muerte celular programada <sup>(47)</sup>. Diversos factores pueden influir en los efectos de una nutrición inapropiada sobre el cerebro <sup>(48)</sup>, entre ellos podemos destacar:

- Tipo de malnutrición: puede deberse a insuficiencia de proteínas, calorías, vitaminas u otros micronutrientes, o bien a una combinación de ellos. Comúnmente se emplea el término hiponutrición para referirse a la condición en la cual los nutrientes requeridos están presentes en la dieta en cantidades insuficientes <sup>(49)</sup>.
- Momento del insulto nutricional: refiere a la etapa del desarrollo cerebral en el que ocurre la deficiencia, pudiendo abarcar el período gestacional, postnatal o a ambos.
- Duración del periodo de hiponutrición
- Severidad de la injuria nutricional

Centrándose en el momento en que ocurre la injuria nutricional, Dobbing <sup>(50)</sup> planteó la hipótesis de período crítico basándose en hallazgos que muestran que los procesos de desarrollo y organización son más fáciles de alterar en el momento en que están sucediendo a mayor velocidad. Definió entonces el crecimiento cerebral explosivo, como el periodo crítico en la ontogénesis del SNC en el cual el cerebro crece a la máxima velocidad posible, gana peso más rápido, y sería más vulnerable a las carencias nutricionales. En el ser humano esta etapa comienza a partir del segundo trimestre de gestación y se extiende hasta los 2 años de edad (periodo que incluye los primeros 1000 días), alcanzando al año de vida el 80% del peso del cerebro adulto <sup>(47; 49; 51)</sup>. En la rata es un evento principalmente postnatal y se extiende durante las 3 primeras semanas luego del nacimiento <sup>(47; 49)</sup>. Diversas evidencias experimentales han demostrado que una dieta inadecuada durante el crecimiento cerebral explosivo, produce alteraciones morfológicas, fisiológicas y neuroquímicas, severas y permanentes. Es decir, aunque luego del déficit nutricional, se realicen largos periodos de recuperación nutricional, ésta no puede revertir los daños producidos por la injuria temprana, lo que puede inducir déficits conductuales y cognitivos que persisten incluso en la edad adulta <sup>(48; 49)</sup>.

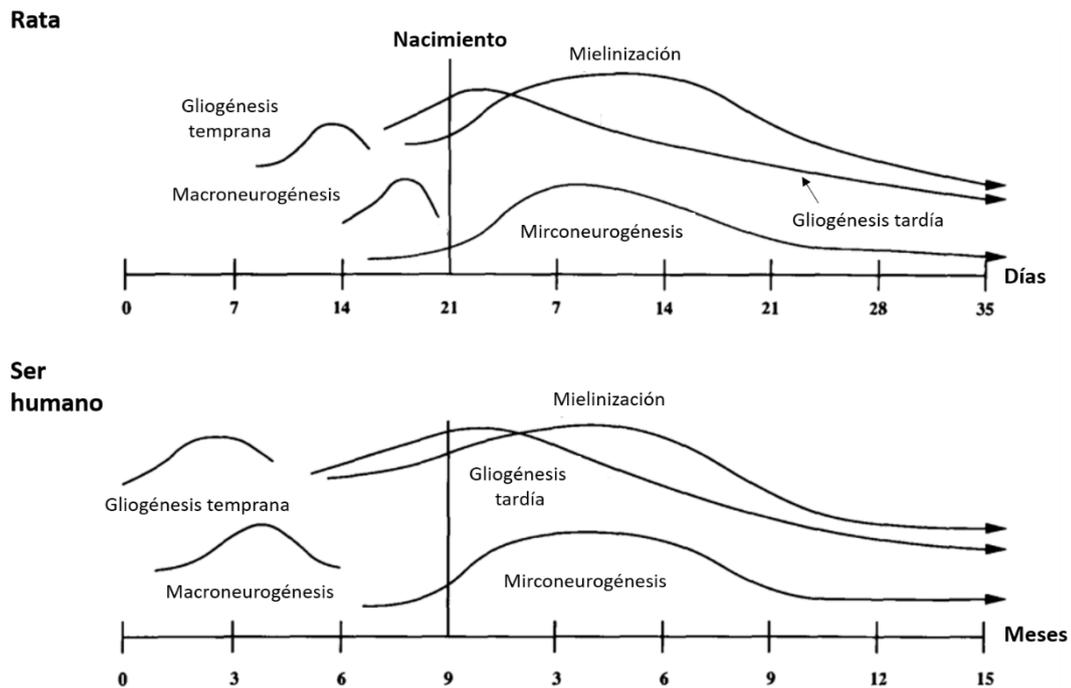
Estudios clínicos, han mostrado que niños con antecedentes de malnutrición temprana, presentan déficits en el desarrollo cognitivo mostrando menores niveles de coeficiente intelectual, problemas de aprendizaje, desórdenes de atención, mayor facilidad de

distracción y un menor rendimiento escolar <sup>(52-54)</sup>. También se describieron consecuencias a nivel conductual. Generalmente se presentan más apáticos, menos activos y con menor control emocional. Estas características sumadas a habilidades expresivas y orales disminuidas contribuyen a una menor integración social <sup>(52-54)</sup>. Además, se describieron modificaciones anatómicas que indican un crecimiento cerebral perturbado en niños malnutridos durante la infancia, incluyendo circunferencia craneana y peso cerebral reducidos <sup>(54; 55)</sup>. La ingesta inadecuada de nutrientes durante la primera infancia puede inducir alteraciones en el desarrollo neuronal como se observa en la Figura 4. En la misma se puede apreciar la marcada reducción en la arborización dendrítica de neuronas pertenecientes a un lactante desnutrido en comparación con un lactante bien alimentado <sup>(56)</sup>. Un estudio longitudinal llevado a cabo por *Galler y col. (The Barbados study)*, describe los efectos a largo plazo de la MPE. En el mismo, siguieron durante más de 30 años a niños recuperados nutricionalmente, que durante su primer año de vida padecieron kwashiorkor o marasmo moderado o severo <sup>(54)</sup>. Durante su niñez, exhibieron problemas de atención, coeficiente intelectual y rendimiento académico significativamente menor junto con déficits conductuales y sociales <sup>(57-59)</sup>. Muchas de las alteraciones cognitivas y conductuales mencionadas persistieron durante la adolescencia, incluyendo déficits del coeficiente intelectual, de atención y problemas del habla, sumado a un aumento de la conducta agresiva <sup>(60-62)</sup>. El deterioro intelectual y el desorden de atención derivados de la hiponutrición temprana se siguieron observando incluso en la edad adulta <sup>(63; 64)</sup>.



**Figura 4.** Preparación histológica de neuronas de un lactante bien nutrido (derecha) y de uno desnutrido (izquierda). Extraído de: *Ortiz-Andrellucchi y col.* <sup>(56)</sup>.

Durante el periodo crítico de desarrollo del SNC se producen principalmente procesos de neurogénesis de microneuronas y gliogénesis de oligodendrocitos seguido de migración y diferenciación, además de formación de mielina y de conexiones celulares <sup>(48)</sup> (Figura 5). Estudios realizados en ratas indican que la malnutrición durante esta etapa disminuye la mielinización, la proliferación dendrítica, la sinaptogénesis, interfiere con la síntesis de proteínas y con la incorporación de lípidos en varias estructuras del cerebro e incluso disminuye el tamaño y número de células cerebrales, cambios asociados a su vez con alteraciones conductuales <sup>(15; 47; 49; 51; 65)</sup>. Durante los procesos de proliferación, migración y diferenciación, las células adquieren su fenotipo neuronal o glial y desarrollan relaciones interneuronales y neuronales-gliales. Se ha observado que la hiponutrición altera las tasas de proliferación de células madres neuronales y gliales, afectando posteriores procesos del desarrollo <sup>(48)</sup>. Las neuronas migran, siguiendo un cronograma temporal rígido, a lo largo de vías específicas para llegar a su ubicación final en una determinada área del cerebro junto con sus aferencias sinápticas <sup>(66)</sup>. Si la proliferación o migración celular se retrasan a causa de alguna injuria, las neuronas no llegan a tiempo para reconocer y recibir las aferencias apropiadas, pudiendo resultar en una organización funcional alterada del área involucrada <sup>(48; 49)</sup>. La diferenciación celular incluye los procesos de arborización dendrítica, extensiones axonales, la formación de circuitos y el desarrollo de la función de los neurotransmisores a través de la generación de enzimas que participan en la síntesis, mecanismos de liberación, sistemas de transporte y receptores específicos <sup>(47; 49)</sup>. La malnutrición pre y postnatal puede producir alteraciones funcionales de larga duración en distintos sistemas de neurotransmisores, incluyendo el GABAérgico, serotoninérgico, colinérgico, opioide y catecolaminérgico <sup>(67; 68)</sup>. En relación a este último, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron alteraciones neuroquímicas y moleculares a nivel de la vía dopaminérgica mesolímbica como consecuencia de una hiponutrición proteica perinatal <sup>(69-72)</sup>. Estas alteraciones podrían afectar los sistemas neuronales responsables de generar cambios neuroadaptativos en respuestas a diferentes estímulos como el estrés, como así también pueden conducir a una respuesta alterada a diferentes tratamientos farmacológicos y drogas cuyos mecanismos de acción involucren a alguno de los sistemas de neurotransmisores mencionados <sup>(67; 68)</sup>.



**Figura 5.** Principales eventos pre y postnatales que ocurren durante la ontogénesis del SNC en la rata y el humano. Las flechas de las curvas de mielinización, gliogénesis tardía y mirconeurogénesis indican que los procesos continúan más allá del periodo postnatal representado. Adaptado de: Morgane y col. <sup>(48)</sup>.

Si bien el periodo de crecimiento cerebral explosivo es crítico en cuanto a que la vulnerabilidad del cerebro a una injuria es máxima, no deben obviarse eventos cruciales para el desarrollo cerebral que ocurren previo a este período y que también son altamente sensibles al insulto nutricional, tales como los procesos de gliogénesis de la glía radial (astrogliogénesis), neurogénesis de macroneuronas, migración y diferenciación neuronal y glial temprana <sup>(48)</sup>.

Diversos factores están relacionados con la etiología de la malnutrición intrauterina, a modo de ejemplo se pueden mencionar alteraciones genéticas, consumo de drogas y alcohol tóxicos para el feto, pobre diferenciación de la placenta, alteraciones en el pasaje de nutrientes y oxígeno al feto debido a un tamaño o vascularización reducidos de la placenta, hiponutrición materna previa o durante el embarazo y enfermedades e infecciones maternas. Dichos factores pueden provocar alteraciones en los principales eventos de la maduración cerebral gestacional <sup>(48)</sup> (Figura 5).

La malnutrición durante la gestación y la lactancia se considera como el principal factor no genético que puede alterar el normal desarrollo y funcionalidad del cerebro en crecimiento, pudiendo inducir cambios permanentes <sup>(47; 48)</sup>. Los nutrientes necesarios

para el feto provienen de los alimentos ingeridos por la madre, los cuales a través del torrente sanguíneo y la placenta alcanzan la sangre del feto. La deficiencia nutricional de la madre se asocia a un subdesarrollo de la placenta, generando una incapacidad para nutrir adecuadamente al feto y como consecuencia final, la hiponutrición del feto y retraso del crecimiento intrauterino<sup>(47; 48)</sup>. Se ha observado que la malnutrición durante el embarazo puede afectar el número de células formadas al reducir la tasa de división celular en todos los órganos fetales incluido el cerebro, perturbar y desincronizar la migración celular, retrasar o bloquear la diferenciación celular e incrementar la muerte celular<sup>(47)</sup>. Estudios clínicos y en animales indican que el impacto de la hiponutrición es más severo cuando afecta el periodo perinatal, que cuando ocurre sólo en uno de los dos períodos, ya sea pre o postnatal<sup>(73)</sup>.

Como se mencionó previamente las consecuencias de la hiponutrición sobre el desarrollo del cerebro está condicionada por el tipo de carencia nutricional. Si bien todos los nutrientes influyen en la maduración del SNC, las proteínas constituyen uno de los componentes más relevantes para un normal desarrollo estructural y funcional. Esto se debe a que las proteínas están constituidas por aminoácidos, los cuales son precursores de enzimas, hormonas y neurotransmisores, e incluso algunos aminoácidos son neurotransmisores *per se*. Además, los aminoácidos son necesarios para la síntesis de proteínas estructurales, esenciales para el crecimiento de tejidos corporales y del cerebro<sup>(48; 73; 74)</sup>. De manera que, la deficiencia proteica podría afectar la biosíntesis de las sustancias mencionadas, y en consecuencia favorecer la aparición de alteraciones funcionales que pueden conducir a trastornos conductuales. Dentro del grupo de los aminoácidos, se encuentran los aminoácidos esenciales, los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben obtenerse a partir de la dieta. Se ha observado que, si se omite un aminoácido esencial de la dieta materna, las consecuencias adversas sobre el desarrollo cerebral fetal son similares a las que produce la omisión de proteínas<sup>(49; 73)</sup>.

### **Etiología de la depresión**

La depresión es considerada un trastorno complejo y multifactorial, cuyas causas y mecanismos involucrados no han sido aún dilucidados completamente. Este desorden sería resultado de la interacción entre factores genéticos predisponentes y diversos

factores ambientales como estrés, trauma emocional, e incluso se ha propuesto que diferentes injurias durante el desarrollo del cerebro tales como infecciones virales, nutrición materna inapropiada y episodios de estrés, estarían implicadas en su etiología (75-77).

La depresión es frecuentemente descrita como un trastorno relacionado al estrés. La participación del estrés en el desarrollo de los desórdenes depresivos ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado, que diferentes eventos estresantes tienen la capacidad de precipitar episodios depresivos, no obstante, no todos los individuos expuestos a niveles equivalentes de estrés desarrollan la patología, sugiriendo que la vulnerabilidad a sufrir desórdenes psiquiátricos varía en gran medida entre los sujetos (78; 79). Es decir, el estrés *per se* no sería suficiente para causar depresión y diversos factores influirían en la susceptibilidad de los sujetos a los efectos depresógenos de la adversidad (75; 76). Si bien se ha estudiado la participación de diferentes genes en la vulnerabilidad a la depresión, quizás debido a la gran complejidad biológica de esta enfermedad, aún permanece sin estar del todo dilucidado qué genes, regiones de ADN nuclear o mitocondrial o qué tipo de mutaciones y polimorfismos genéticos pueden promover o desencadenar la aparición de depresión al afectar la respuesta del cerebro a factores estresantes (80; 81).

A nivel clínico, se ha reportado mayor prevalencia del desorden depresivo mayor y otros trastornos psiquiátricos en individuos que sufrieron algún tipo de experiencia adversa durante la niñez, pudiendo mencionar entre otros, abuso físico, psicológico o sexual, violencia familiar, ausencia de padres y falta de calidez; en comparación con quienes no sufrieron estas experiencias (82-86). Poniendo en evidencia, que antecedentes de experiencias adversas durante la infancia pueden predisponer al desarrollo de desórdenes depresivos en la edad adulta (83; 84).

Concluyendo, la combinación de la exposición a factores o eventos estresantes, traumáticos, junto con una predisposición preexistente ya sea genética o relacionada al ambiente temprano, serían responsables del desarrollo de depresión (79; 87). Al respecto, es importante señalar que una nutrición inapropiada en etapas tempranas del desarrollo está asociada a una sensibilidad aumentada a situaciones estresantes o aversivas (88; 89). Se ha observado mediante estudios clínicos y en animales, que la hiponutrición perinatal disminuye la capacidad de responder apropiadamente ante la exposición a estímulos

estresantes, lo cual podría contribuir o ser responsable del desarrollo de anomalías conductuales <sup>(90; 91)</sup>.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos neuronales que subyacen a la depresión, se han desarrollado diversos modelos animales, sin embargo, modelar completamente la depresión resulta complicado dada la heterogeneidad de esta patología. Considerando que la exposición al estrés incrementa el riesgo de padecer desórdenes depresivos, la gran mayoría de los modelos de depresión en roedores emplean distintos tipos de estresores, tales como estrés crónico leve e impredecible (CUMS o CMS-*chronic unpredictable mild stress*), derrota social (CSDS-*chronic social defeat stress*), inmovilidad (CRS-*chronic restraint stress*) e indefensión aprendida (LH-*learned helplessness*). Estos modelos mostraron en animales conductas tipo depresivas, cambios en la regulación de sistemas endócrinos, cambios histológicos y alteraciones neuroquímicas análogas a las descritas en pacientes depresivos <sup>(92-95)</sup>. Un modelo experimental ampliamente utilizado para estudiar los efectos de experiencias adversas tempranas sobre la conducta y la neurobiología en la edad adulta, es la separación materna, la cual ha sido propuesta como un modelo animal de depresión <sup>(96; 97)</sup>. Se ha demostrado que el estrés prenatal y/o la separación materna temprana incrementan el riesgo de desarrollar conductas depresivas en el animal adolescente y adulto, además de asociarse con alteraciones endócrinas, moleculares y neuroquímicas <sup>(97-101)</sup>. Algunos trabajos emplean la privación materna como experiencia adversa, la cual supone un efecto estresor mayor ya que, a diferencia de la separación materna, implica la manipulación de las crías aislandolas no sólo de su madre sino también de su ambiente familiar <sup>(97; 102; 103)</sup>.

### **Circuito neuronal de la depresión**

En la actualidad, el circuito neuronal que subyace a la depresión no está completamente dilucidado. En base a la función conocida de diversas áreas cerebrales en condiciones normales, se han sugerido los síntomas y aspectos de la depresión a los cuáles podrían contribuir <sup>(76; 104)</sup>.

Gran parte de la investigación en este campo se ha centrado en el hipocampo y corteza prefrontal (CPF). El hipocampo forma parte del sistema límbico y es altamente vulnerable a factores ambientales, destacando al estrés como uno de los principales <sup>(105)</sup>.

Tiene un rol fundamental en el aprendizaje y en la formación y consolidación de la memoria. Más allá de estas funciones cognitivas, se encuentra críticamente involucrado en el procesamiento de información emocional y en la regulación del miedo y ansiedad (106; 107). Se ha postulado que el hipocampo ventral está vinculado a la emoción y afecto, participa en la regulación de la respuesta al estrés y su disfunción podría conducir a desórdenes depresivos; mientras que el hipocampo dorsal es el principal encargado de las funciones cognitivas (106; 108).

La CPF es anatómica y funcionalmente compleja, consiste en varias subregiones que envían y reciben proyecciones de otras áreas tanto corticales como subcorticales. La variedad de regiones con las que se comunica ha permitido que se le atribuyan una gran diversidad de funciones: participación en la memoria del trabajo, atención sensorial, cambio de tareas, toma de decisiones, planificación, resolución de problemas, control motor, autoconocimiento, expresión de la personalidad, regulación emocional y procesamiento cognitivo de estímulos emocionales originados en el sistema límbico (109; 110).

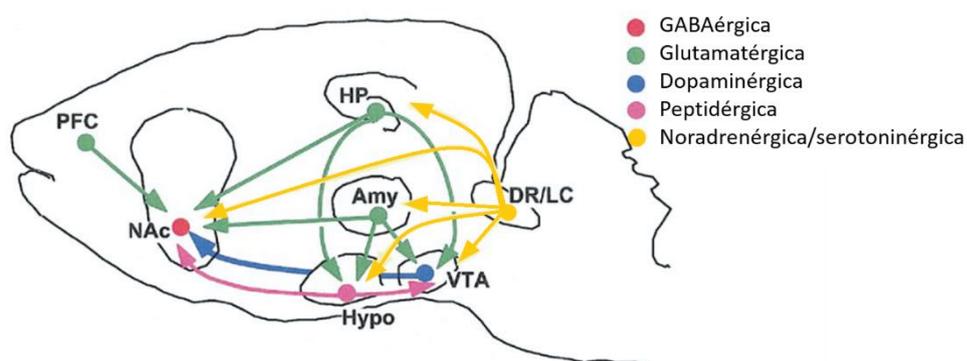
Se ha propuesto entonces, que hipocampo y CPF al regular funciones de aprendizaje, memoria, atención y control del impulso, serían responsables de mediar aspectos cognitivos de la depresión tales como deterioro de la memoria y sentimientos de desesperación, inutilidad, culpa y tendencias suicidas. Mientras que, núcleo accumbens (NAc) y amígdala, áreas que tienen una participación relevante en la memoria emocional, mediarían la anhedonia, la ansiedad y la falta de motivación observadas en individuos depresivos (76; 104; 111).

La amígdala, estructura del sistema límbico, participa en el procesamiento cognitivo y emocional, particularmente el relacionado con el miedo y la ansiedad (105). Interviene en el aprendizaje asociado a estímulos emocionales (112). Se ha observado que pacientes depresivos muestran una mayor activación de la amígdala luego de un estímulo negativo o aversivo en relación a sujetos sanos, lo cual podría explicar la mayor capacidad de codificar y recordar información negativa respecto a la positiva en la depresión (113; 114). Otra estructura relevante en la depresión es NAc, parte del estriado ventral, que junto con sus aferencias dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral (ATV) conforman el sistema dopaminérgico mesolímbico. Esta vía dopaminérgica, forma parte del circuito de recompensa y es el principal sustrato anatómico que media los efectos

reforzantes de la comida, sexo, interacciones sociales y las sustancias de abuso. De esta manera, se ha propuesto un rol fundamental de NAc y ATV en los déficits hedónicos observados en pacientes depresivos <sup>(92; 105; 112)</sup>.

En relación a la participación de hipotálamo en la sintomatología de la depresión, los estudios se han enfocado en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) <sup>(76)</sup>. Investigaciones recientes centraron su estudio en el rol de los núcleos hipotalámicos y sus péptidos transmisores, dado que podrían mediar signos neurovegetativos cruciales para el apetito, sueño y ritmos circadianos que se ven alterados en pacientes depresivos <sup>(76; 104; 111)</sup>.

Las regiones cerebrales mencionadas forman parte de circuitos interconectados y que comienzan a reformular un circuito neuronal involucrado en la depresión <sup>(76; 104)</sup>. Entre las conexiones descritas, resulta importante destacar que tanto ATV como NAc reciben aferencias glutamatérgicas provenientes de CPF, amígdala e hipocampo; ATV envía proyecciones dopaminérgicas no sólo a NAc sino también a CPF, amígdala central y basolateral e hipocampo, entre otras estructuras. ATV, a su vez, recibe proyecciones GABAérgicas provenientes de NAc y los núcleos hipotalámicos envían eferencias a ATV y NAc. Además, se ha determinado que neuronas noradrenérgicas provenientes de locus coeruleus y neuronas serotoninérgicas del núcleo de rafe inervan las estructuras antes mencionadas (Figura 6) <sup>(92; 112; 115)</sup>.



**Figura 6.** Representación simplificada de los principales circuitos neuronales que contribuyen al desarrollo de los trastornos depresivos. Se muestran las áreas participantes junto con algunas de las interconexiones entre ellas. PFC: Corteza prefrontal, HP: Hipocampo, NAc: Núcleo accumbens, Amy: Amígdala, Hypo: Hipotálamo, VTA: Área tegmental ventral, DR: rafe dorsal, LC: locus coeruleus. Adaptado de: Nestler y Carlezon <sup>(112)</sup>.

A los fines del presente trabajo de tesis resulta importante destacar que en NAc se distinguen dos subregiones que pueden diferenciarse en base a sus características histoquímicas y patrones de conexión: la central denominada *core* rodea la comisura anterior, y la periférica *shell* se extiende medial, ventral y lateralmente alrededor de *core* <sup>(116; 117)</sup>. La región del *core* establece conexiones principalmente con los circuitos de control motor de los ganglios basales, incluyendo pálido ventral, núcleo subtalámico y sustancia negra, mientras que el *shell* proyecta preferentemente a las regiones límbicas subcorticales tales como hipotálamo lateral, amígdala centromedial y ATV entre otros. NAc *shell* se considera una zona de transición entre el estriado y la amígdala extendida <sup>(116; 118; 119)</sup>. En base a las diferencias en la conectividad, se ha propuesto una especialización funcional para cada área. Mientras *core* está relacionado con la estimulación-coordinación motora y conducta dirigida a un objetivo, *shell* está fuertemente asociado a funciones emocionales y motivacionales <sup>(116; 119-121)</sup>. A nivel celular, tanto en *core* como en *shell*, la población neuronal principal la constituyen las neuronas GABAérgicas conocidas como *medium spiny neurons* (MSN), a las que se le suman pequeñas poblaciones de interneuronas colinérgicas y GABAérgicas <sup>(122; 123)</sup>. Las MSN se distinguen en dos poblaciones neuronales en base a sus perfiles de expresión de receptores dopaminérgicos. De esta manera, se categorizan en MSN que expresan predominantemente el receptor de dopamina (DA) D1 (D1-MSN) o el receptor D2 (D2-MSN). En relación a su conectividad con ATV, si bien ambos subtipos conectan indirectamente con esta estructura por medio del pálido ventral, las D1-MSN envían principalmente proyecciones directas a ATV <sup>(93; 124; 125)</sup>. Más allá de la conectividad con otras estructuras, interacciones *shell-core* tendrían una importancia funcional. Se han propuesto vías indirectas entre estas áreas a través de proyecciones corticoestriatales y dopaminérgicas como también vías directas recíprocas que son, principalmente, GABAérgicas <sup>(117)</sup>.

Por su parte, anatómicamente, el hipocampo está organizado en el cuerno de Amón (CA), dividido en CA1, CA2 y CA3, el giro dentado (GD) y el complejo subicular <sup>(126)</sup>. La población neuronal principal en estas regiones está constituida por neuronas glutamatérgicas, conformadas por los tipos granular y piramidal en GD y CA1-CA3 respectivamente; además de contar con una vasta red de interneuronas <sup>(107; 127)</sup>. La evidencia experimental indica la presencia de una vía excitatoria hipocampal hacia NAc

<sup>(128)</sup>. Estudios de rastreo de la conectividad de NAc en diferentes especies han mostrado conexiones aferentes desde subículo y desde una zona de CA1 adyacente al subículo ventral <sup>(129-132)</sup>. Resulta interesante destacar que se ha observado reacciones diferentes a influencias externas entre CA1 y GD, siendo CA1 notablemente más vulnerable a los efectos nocivos del estrés, entre otras condiciones <sup>(106; 127)</sup>.

### **Hipótesis sobre el desarrollo del trastorno depresivo mayor**

A lo largo del tiempo, la investigación de la fisiopatología de la depresión ha dado origen a la formulación de múltiples teorías que intentan describir los mecanismos involucrados en su desarrollo. Si bien ninguna de las hipótesis ha logrado explicar de forma completa todos los procesos y síntomas de la depresión, se ha observado que las mismas se solapan y complementan intentando buscar una explicación más integradora <sup>(133)</sup>. A continuación, se describen las características principales de las hipótesis más estudiadas, lo cual no descarta que se hayan especificado otros mecanismos fisiopatológicos adicionales a los aquí mencionados.

#### ➤ *Hipótesis de deficiencia de neurotransmisores-Teoría monoaminérgica*

Gran parte de la investigación sobre la fisiopatología de la depresión durante la segunda mitad del siglo XX se vio influenciada por el surgimiento de drogas que al aumentar la transmisión de monoaminas lograban aliviar síntomas depresivos <sup>(134; 135)</sup>. Entre ellas, surgieron los antidepresivos tricíclicos que bloquean la recaptación presináptica de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y noradrenalina (NA), y los inhibidores de la monoaminoxidasa que actúan inhibiendo la degradación a nivel neuronal de las monoaminas. Ambos mecanismos conducen a un aumento de los niveles disponibles de estos neurotransmisores en la sinapsis <sup>(136)</sup>. En contraposición, se observó que la reserpina, un fármaco que actúa agotando las reservas de catecolaminas, era capaz de inducir síntomas similares a los observados en casos de depresión <sup>(137)</sup>. Estos descubrimientos dieron origen a la hipótesis monoaminérgica de la depresión. La misma postula que los síntomas que experimentan los pacientes depresivos serían consecuencia de una deficiencia de la neurotransmisión cerebral de 5-HT y de las catecolaminas, NA y DA <sup>(135)</sup>. Sin embargo, si bien los antidepresivos actúan

inmediatamente normalizando los niveles de las monoaminas, el efecto terapéutico se observa luego de varias semanas de tratamiento diario <sup>(95; 104; 135)</sup>. La hipótesis de la deficiencia monoaminérgica no puede explicar todos los síntomas de la depresión, como así tampoco el retraso en el inicio de los efectos terapéuticos, el por qué los antidepresivos suelen producir una remisión de los síntomas, pero no la recuperación completa y la razón por la que no todos los individuos responden a los tratamientos antidepresivos disponibles <sup>(81; 135)</sup>. En conclusión, si bien hay descritas numerosas alteraciones que afectan la transmisión monoaminérgica tanto en pacientes depresivos como en modelos animales, involucrando a enzimas que participan en la síntesis, transportadores, receptores y sistemas de segundos mensajeros <sup>(134-136)</sup>; 5-HT, NA y DA no serían las únicas sustancias biológicas involucradas en la etiopatogénesis de la depresión.

#### ➤ *Disfunción del eje HPA*

Una respuesta fisiológica al estrés es la activación de sistemas neuroendocrinos, particularmente del eje HPA <sup>(76; 79)</sup>. La depresión se ha asociado con una incapacidad de generar una adecuada respuesta adaptativa al estrés, debido a una disfunción del eje HPA junto con un déficit en los mecanismos que lo regulan <sup>(138; 139)</sup>.

El núcleo paraventricular del hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual estimula la hipófisis anterior e induce la síntesis y liberación de la adrenocorticotropina (ACTH). Esta hormona finalmente estimula a la corteza adrenal promoviendo la síntesis de glucocorticoides (cortisol) y su liberación hacia la circulación sanguínea. La actividad del eje HPA es controlada por diversas vías: los glucocorticoides liberados producen una respuesta de retroalimentación negativa inhibiendo al hipotálamo y a la glándula pituitaria y por ende a su propia síntesis. Por otra parte, el cortisol puede estimular tanto a la amígdala que ejerce un control excitatorio y al hipocampo que posee una influencia inhibitoria sobre las neuronas hipotalámicas <sup>(76; 79)</sup>.

Bajo condiciones de estrés crónico, se observa liberación aumentada de glucocorticoides. La exposición prolongada a glucocorticoides resulta en una disminución de la expresión o de la funcionalidad del receptor de glucocorticoide, conduciendo a una retroalimentación negativa ineficaz por parte del cortisol y a una

desinhibición del eje HPA a nivel de hipocampo, con el consecuente incremento adicional de cortisol <sup>(79; 81)</sup>. Los niveles elevados de cortisol circulantes promueven la liberación de citoquinas proinflamatorias y una disminución de los niveles cerebrales de 5-HT, NA y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) <sup>(79)</sup>. La exposición crónica a glucocorticoides es tóxica para las células gliales y neuronales, esto último junto con las alteraciones de los niveles de BDNF y de las citoquinas, puede suprimir la neurogénesis en hipocampo y afectar la neuroplasticidad en dicha estructura y en CPF <sup>(79; 81; 136)</sup>. Los cambios observados en estas estructuras podrían contribuir a la aparición de algunos de los síntomas observados en pacientes depresivos <sup>(76; 79; 81)</sup>.

Se ha descrito en sujetos diagnosticados con trastorno depresivo mayor una hipersecreción de cortisol acompañado de niveles aumentados de CRH en líquido cefalorraquídeo y agrandamiento de las glándulas pituitaria y adrenal <sup>(81; 136)</sup>. Sin embargo, no todos los pacientes con depresión muestran un aumento de la actividad del eje HPA o una alteración de los mecanismos de retroalimentación negativa, de hecho, algunos estudios sugieren que la hipercortisolemia sería característica de pacientes con episodios depresivos más severos <sup>(81; 111)</sup>. De manera que, no se puede precisar si la alteración del eje HPA es la causa principal de la depresión o bien sería consecuencia de otra causa inicial <sup>(76)</sup>.

#### ➤ *Hipótesis neuroinflamatoria*

Diversas evidencias experimentales sugieren un rol importante del sistema inmune en la fisiopatología de la depresión. Tanto estímulos ambientales como el estrés y estímulos inflamatorios internos como una infección, trauma o condiciones inflamatorias orgánicas son capaces de activar mediadores proinflamatorios tanto a nivel periférico como central <sup>(140-142)</sup>. Las observaciones más consistentes que permiten establecer una conexión entre el sistema inmune y la depresión incluyen: a) en pacientes depresivos se detectaron mayores niveles de marcadores proinflamatorios en plasma y fluido cerebroespinal, tales como proteína C reactiva, prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias incluyendo al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL)-1, IL-6 y sus correspondientes receptores <sup>(81; 140; 143)</sup>, b) los desórdenes depresivos tienen alta comorbilidad con patologías asociadas con procesos inflamatorios <sup>(81; 140; 142)</sup>,

c) se han observado síntomas depresivos tras la administración de citoquinas proinflamatorias en animales de laboratorio <sup>(81)</sup>, d) algunos antidepresivos tienen propiedades antiinflamatorias, a través de la inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias y estimulación de la síntesis de citoquinas antiinflamatorias <sup>(81; 140)</sup> y e) el bloqueo de las citoquinas o de sus vías de señalización reduce la aparición de síntomas depresivos <sup>(143)</sup>.

Las citoquinas centrales pueden provenir de la síntesis a nivel cerebral, principalmente por parte de la microglía, pero también de astrocitos, neuronas y oligodendrocitos o bien pueden corresponder a citoquinas producidas en la periferia pero que, por diversas vías, acceden al SNC y activan sistemas inmunes locales <sup>(81; 144)</sup>.

Se han descrito una gran variedad de acciones de las citoquinas proinflamatorias. Por un lado, se ha demostrado su participación en la modulación de la actividad del eje HPA, contribuyendo a la hiperactividad del mismo. Hay evidencia que muestra que estos mediadores pueden inducir, por diversos mecanismos moleculares, resistencia de los receptores de glucocorticoides resultando en la pérdida de la retroalimentación negativa de cortisol sobre la liberación de CRH y ACTH, con el consecuente aumento de los niveles sistémicos del glucocorticoide <sup>(140; 145)</sup>. Además, se han asociado las citoquinas con efectos sobre los sistemas de neurotransmisores, pudiendo alterar finalmente a los neurocircuitos que controlan la conducta <sup>(143)</sup>. Pueden activar las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) reduciendo la disponibilidad de 5-HT, al aumentar su recaptación y reducir su síntesis respectivamente <sup>(140; 143; 146)</sup>. La activación de la MAPK afecta también la recaptación de las catecolaminas (NA y DA). La tetrahidrobiopterina, cofactor enzimático de la síntesis de monoaminas, puede ver afectada su disponibilidad por los mediadores proinflamatorios, reduciendo así la síntesis de monoaminas <sup>(143)</sup>. Sumado a estos efectos, las citoquinas pueden aumentar, por diversos mecanismos, la activación de los circuitos glutamatérgicos contribuyendo a la neurotoxicidad inducida por este neurotransmisor <sup>(143; 144)</sup>.

Por último, se ha descrito el impacto negativo de la desregulación de los niveles de citoquinas proinflamatorias sobre la neuroplasticidad, particularmente sobre la neurogénesis <sup>(141)</sup>. Considerando que el BDNF tiene un rol importante como mediador de la plasticidad neuronal, se ha propuesto que un mecanismo que subyace al efecto

perjudicial de las citoquinas es la alteración de la expresión y función de este factor neurotrófico <sup>(141)</sup>. En relación a lo antes mencionado, se ha observado una reducción en la expresión de BDNF en hipocampo y regiones corticales luego de la administración de citoquinas proinflamatorias o de lipopolisacárido (LPS-endotoxina bacteriana) <sup>(141; 146)</sup>. Sin embargo, no se ha establecido claramente el mecanismo por el cual las citoquinas afectan a los factores neurotróficos, pudiendo no haber una relación directa entre ellos, sino que múltiples mecanismos que involucren a sistemas de neurotransmisores o al eje HPA podrían estar implicados <sup>(141)</sup>.

Resumiendo, las citoquinas proinflamatorias además de participar en la respuesta inmune e inflamación, tienen importantes efectos sobre la función endócrina, sistemas de neurotransmisores y sobre la plasticidad neuronal <sup>(139)</sup>. De manera que, su sobreproducción puede alterar diversos circuitos y procesos neuronales involucrados en el desarrollo de síntomas depresivos. Sin embargo, la inflamación no es suficiente para causar depresión ni tampoco es necesaria para que el trastorno ocurra <sup>(140; 144)</sup>.

### ➤ *Hipótesis neurotrófica*

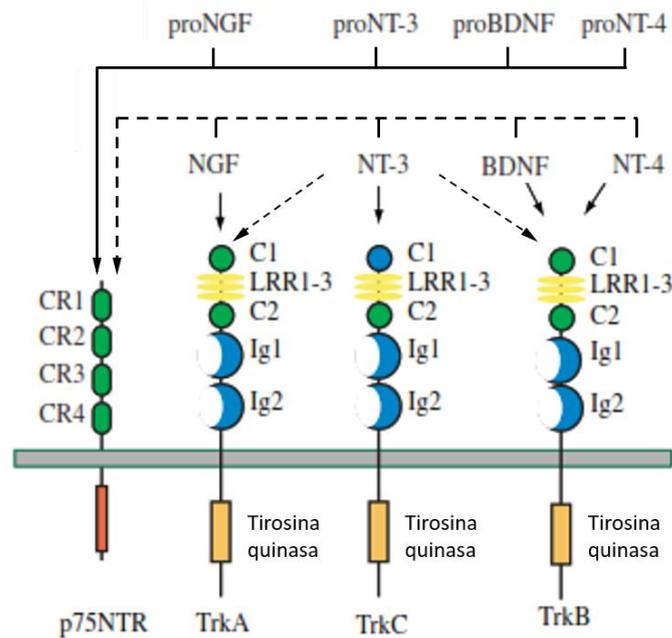
#### Neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas, también llamadas factores neurotróficos, constituyen una familia de proteínas que se expresan desde etapas tempranas de la embriogénesis hasta la edad adulta inclusive, y se encargan de regular una amplia variedad de procesos cruciales en el desarrollo y mantenimiento del SNC. Tienen un rol fundamental en el control de la neurogénesis, sinaptogénesis, migración, diferenciación, supervivencia y muerte celular, además de ser potentes reguladores de la plasticidad neuronal <sup>(134; 147; 148)</sup>. La familia de las neurotrofinas está constituida por el factor de crecimiento neuronal (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*), el BDNF, la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4 (NT-4, también conocida como NT-4/5 <sup>(149)</sup>). Para mediar sus funciones biológicas, dichos factores interactúan con dos categorías de receptores de membrana expresados en las células blanco: la familia de receptores tirosina quinasa (Trk) y el receptor de neurotrofina p75<sup>NTR</sup> (*p75 neurotrophin receptor*), miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral <sup>(139; 147; 148)</sup>.

Las neurotrofinas, se unen con alta afinidad y especificidad a determinados miembros de la familia de receptores Trk: NGF reconoce específicamente al receptor TrkA, BDNF

y NT-4 son ligandos del receptor TrkB, y si bien las principales funciones biológicas de NT-3 son mediadas por TrkC, esta neurotrofina puede unirse también a los receptores anteriormente mencionados <sup>(139; 147; 150)</sup>. En relación a la estructura de los receptores Trk, la misma consiste desde la región N-terminal a la C-terminal, en una región extracelular, un único segmento transmembrana y una región intracelular con un dominio tirosina quinasa. La actividad tirosina quinasa es esencial para la gran mayoría de las respuestas a neurotrofinas mediadas por receptores Trk. El dominio tirosina quinasa se encuentra rodeado por residuos tirosina que actúan como sitios de anclajes, dependientes de la fosforilación, para diversas moléculas de señalización. La zona extracelular consta de tres regiones ricas en leucina, flanqueada por dos regiones ricas en cisteína y seguida de dos dominios tipo inmunoglobulina <sup>(149; 151; 152)</sup> (Figura 7). Las neurotrofinas interactúan con su receptor a través del dominio tipo inmunoglobulina más próximo a la membrana plasmática <sup>(151; 153)</sup>. La unión del factor neurotrófico al receptor induce la dimerización del mismo, seguido de la fosforilación de residuos tirosina ubicados en el dominio intracelular y la consecuente activación de diferentes cascadas de señalización <sup>(147; 150)</sup>. A su vez, todas las neurotrofinas pueden unirse con baja afinidad al receptor p75<sup>NTR</sup>. Este receptor tiene dos funciones fisiológicas principales, por un lado, activa cascadas que regulan la apoptosis o supervivencia celular y también puede interactuar con los receptores Trk, modulando la afinidad por sus ligandos y aumentando o suprimiendo su señalización <sup>(153; 154)</sup>.

Las neurotrofinas son sintetizadas como proteínas precursoras (proneurotrofinas) que se clivan proteolíticamente para dar origen a las formas maduras. La proneurotrofinas son moléculas biológicamente activas que se unen con alta afinidad a p75<sup>NTR</sup> activando su vía de señalización, pero no son ligandos de los receptores Trk. Estos son activados específicamente por las formas maduras <sup>(149; 155; 156)</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura de los receptores de neurotrofinas y sus ligandos. Las líneas de punto representan las uniones de baja afinidad. Cada receptor Trk consta de un dominio tirosina quinasa intracelular, un paso transmembrana y una región extracelular. C1, C2, CR1-4: dominios ricos en cisteína, LRR1-3: regiones ricas en leucina, Ig1-2: dominios tipo inmunoglobulina. Adaptado de: Reichardt <sup>(151)</sup>.

### Rol de las neurotrofinas en la plasticidad neuronal

La plasticidad neuronal refiere a la capacidad del sistema nervioso de responder y adaptarse ante estímulos extrínsecos o intrínsecos, reorganizando su estructura, función y conexiones <sup>(141; 157)</sup>. Involucra diversos mecanismos que pueden conducir al remodelado neuronal (incluyendo arborización y poda de dendritas y axones, y cambios en la densidad espinal), sinaptogénesis y neurogénesis <sup>(105; 141)</sup>. La potenciación a largo plazo (LTP) es el principal mecanismo que media la plasticidad a nivel funcional <sup>(105)</sup>.

Distintos estudios realizados tanto en sujetos depresivos como en modelos animales de depresión, demostraron una diversidad de alteraciones cerebrales, a saber: reducción en el número y densidad de células neuronales y gliales en regiones corticales <sup>(158)</sup>, reducción de la arborización dendrítica y pérdida de espinas en neuronas hipocámpales y de CPF, mayor densidad espinal en neuronas de amígdala basolateral y NAc <sup>(159-161)</sup>, cambios en la morfología de espinas dendríticas en hipocampo <sup>(150)</sup>, disminución en la longitud y número de dendritas apicales en hipocampo y CPF <sup>(162; 163)</sup>, reducción de la neurogénesis en GD de hipocampo <sup>(76; 162)</sup>

y alteraciones en el tamaño de diferentes regiones cerebrales. Se observó un aumento en el volumen de la amígdala <sup>(164; 165)</sup> y una reducción del volumen de hipocampo y CPF con una conectividad neuronal disminuida en estas dos estructuras <sup>(166-168)</sup>. En NAc las observaciones son controversiales, reportando tanto un incremento como una reducción en su volumen <sup>(169-171)</sup>. También se describieron, leves incrementos en la tasa de apoptosis en hipocampo <sup>(104)</sup>, inhibición de LTP y estimulación de LTD (depresión a largo plazo) en células piramidales prefrontales e hipocampales <sup>(105)</sup>, cambios en los circuitos sinápticos, alteración en la conexión sináptica entre el lóbulo frontal y otras regiones cerebrales <sup>(150)</sup> y cambios en la conectividad y actividad cortico-límbica <sup>(172; 173)</sup>. En modelos experimentales de estrés crónico, muchas de estas alteraciones son acompañadas de conductas tipo depresivas <sup>(174; 175)</sup>.

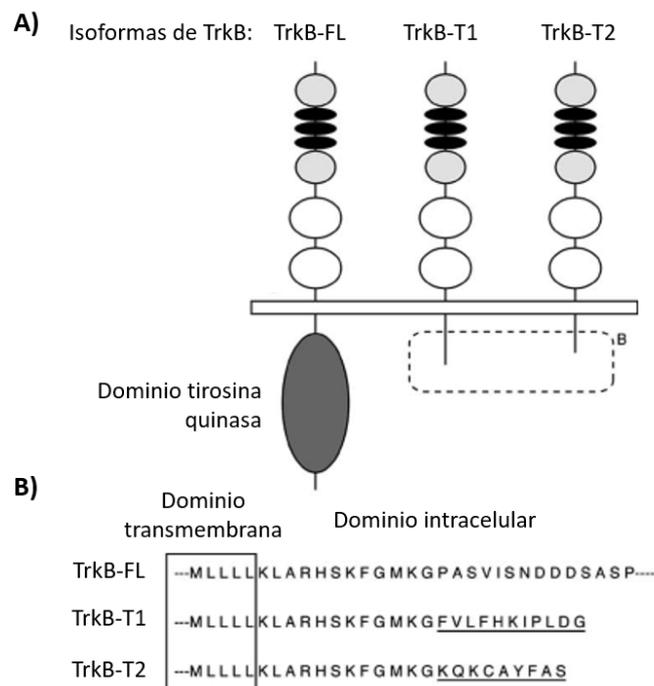
Considerado los efectos perjudiciales sobre la plasticidad a nivel estructural y funcional, observados en diversas estructuras, y el conocido rol de las neurotrofinas en su regulación, la hipótesis neurotrófica postuló que la depresión podría ser consecuencia de un funcionamiento inapropiado de los factores neurotróficos. Perturbaciones en el sistema de factores neurotróficos podría resultar en una plasticidad neuronal alterada y, por lo tanto, ser responsable de una capacidad disminuida del cerebro para realizar respuestas adaptativas adecuadas ante estímulos externos, como el estrés <sup>(139; 150)</sup>. De esta forma, alteraciones en la síntesis y/o liberación de factores neurotróficos durante períodos críticos de la ontogénesis del SNC podría traducirse en una desorganización estructural en donde las conexiones neuronales se establecen de manera inapropiada. En el individuo adulto, este soporte neurotrófico inadecuado podría incrementar la vulnerabilidad al estrés y por ende al desarrollo de desórdenes depresivos <sup>(176)</sup>.

La hipótesis neurotrófica se ha enfocado en el BDNF ya que constituye la neurotrofina más abundante en el SNC y se ha postulado que su funcionamiento inadecuado podría contribuir al desarrollo de trastornos psiquiátricos <sup>(176; 177)</sup>.

## BDNF, señalización y su alteración en la depresión

### ➤ Estructura, vías de señalización y funciones del receptor TrkB

Como se mencionara anteriormente, BDNF influye en diversos procesos de desarrollo y mantenimiento del SNC mediante la activación de su receptor de alta afinidad, TrkB. Existen distintas isoformas de este receptor, la isoforma TrkB *full-length* (TrkB-FL) cuya estructura se describió anteriormente, en el apartado “Neurotrofinas y sus receptores”, y dos isoformas truncadas. En humanos, estas isoformas se denominan TrkB-T1 y TrkB-Shc, y en roedores se las conoce como TrkB-T1 y TrkB-T2<sup>(156; 178)</sup>. El receptor TrkB-T2, se ha detectado sólo en ratas y en forma minoritaria<sup>(147; 179)</sup>. Las isoformas truncadas contienen el mismo dominio extracelular, región transmembrana y secuencia inicial de 12 aminoácidos intracelulares que TrkB-FL, pero carecen del dominio tirosina quinasa. Tienen una secuencia C-terminal que es específica para cada isoforma, con 11 y 9 aminoácidos adicionales para T1 y T2 respectivamente<sup>(147; 152; 156; 179)</sup> (Figura 8).



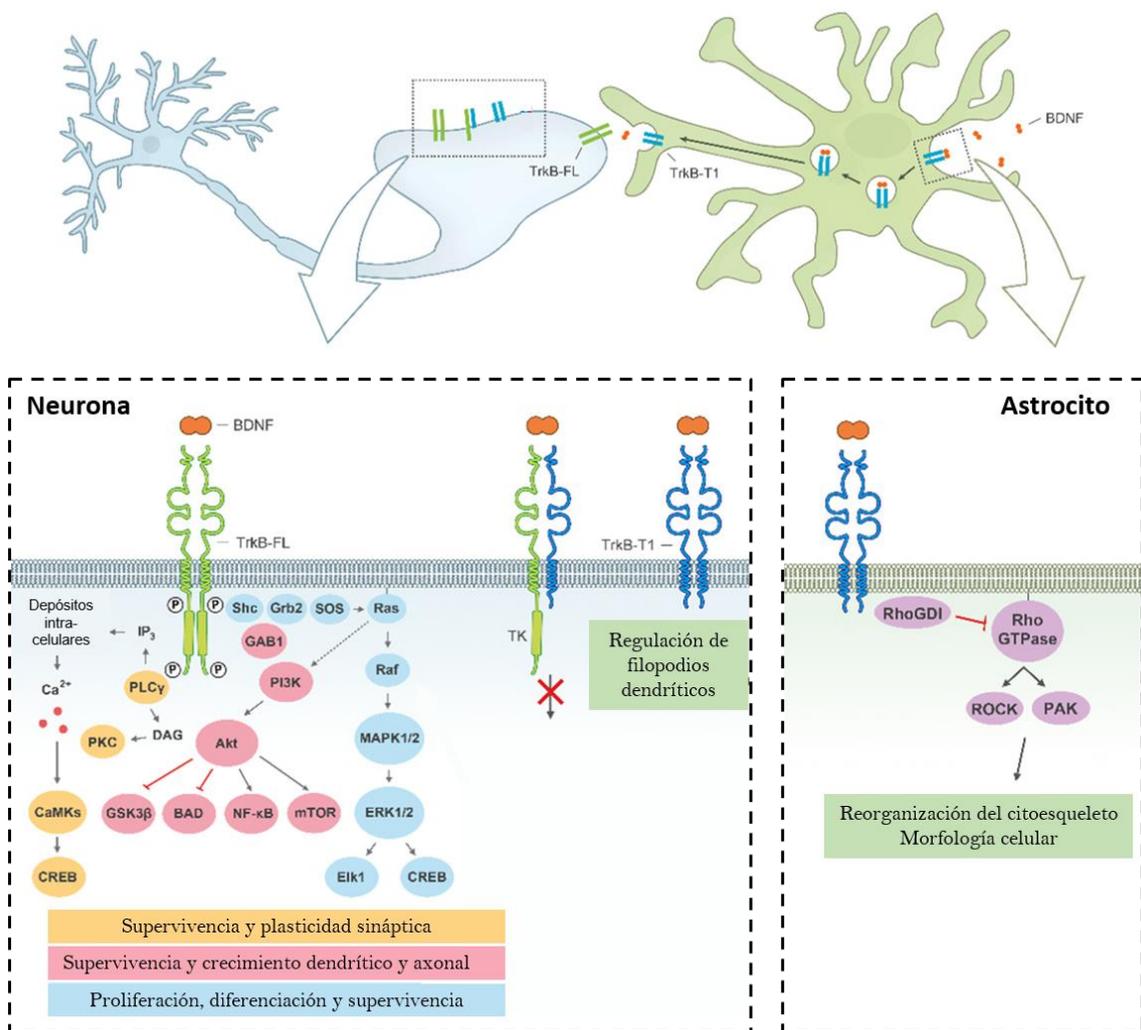
**Figura 8. A)** Estructura de las isoformas de TrkB. Comparten dominio extracelular (2 regiones ricas en cisteína, 3 en leucina y 2 dominios tipo inmunoglobulina), región transmembrana y 12 aminoácidos intracelulares. **B)** Secuencia de aminoácidos transmembrana e intracelular de cada una de las isoformas. Adaptado de: Ohira y Hayashi<sup>(147)</sup>. FL: *full-length*, T: truncado.

El receptor de BDNF se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, siendo las formas predominantes TrkB-FL y TrkB-T1. Si bien, estas dos isoformas se expresan en neuronas, TrkB-T1 puede encontrarse también en células gliales como astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann <sup>(147; 180; 181)</sup>.

La unión de BDNF a la superficie extracelular del receptor TrkB-FL induce su dimerización, aumento de la actividad catalítica del dominio intracelular, fosforilación de residuos tirosina que se encuentran dentro del *loop* de activación y fosforilación de tirosinas situadas fuera del dominio catalítico. Cuando se fosforilan estos residuos forman los sitios de unión de moléculas dianas que propagan las señales intracelulares <sup>(149; 151; 182)</sup>. Se han descrito tres vías de señalización principales: 1) activación de fosfolipasa C $\gamma$  (PLC) que resulta en la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) con el consecuente aumento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático y la activación de la vía de la proteína quinasa C (PKC) respectivamente, lo cual promueve la plasticidad sináptica; 2) la activación de la proteína Shc induce la activación de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-Akt que regula supervivencia celular al controlar la actividad de varias proteínas esenciales para ello, tales como BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*) y GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) y 3) la proteína Shc puede activar también la vía Ras-MAPK-ERK (*extracellular signal regulated kinase*) que promueve el crecimiento y la diferenciación neuronal <sup>(147; 151; 181; 183)</sup> (Figura 9). A su vez, cada una de estas vías de señalización regulan la transcripción de genes al afectar la activación de factores de transcripción, tales como NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) y CREB (*cAMP response element-binding protein*) <sup>(151; 181)</sup> (Figura 9).

Las funciones del receptor TrkB-T1 en el SNC no están completamente esclarecidas. Se ha demostrado que en células neuronales actúa como dominante negativo de la isoforma FL al generarse heterodímeros inactivos que previenen la señalización de BDNF <sup>(181; 184; 185)</sup>. Por otra parte, TrkB-T1 presente en las células gliales actúa secuestrando la neurotrofina del espacio extracelular <sup>(185)</sup> (Figura 9). Considerando que BDNF no sería degradado en las células gliales, se ha postulado que éstas podrían actuar como un reservorio que regula la concentración de BDNF en el medio extracelular <sup>(181; 186)</sup>. Una liberación lenta al espacio extracelular desde las células no neuronales, restringe la difusión de la neurotrofina y mantiene niveles locales más altos de BDNF cuando se necesiten por ejemplo para el crecimiento y supervivencia neuronal <sup>(186)</sup>. Por último,

TrkB-T1 posee vías de señalización propias <sup>(147)</sup>. Está involucrado en la regulación de la morfología celular en neuronas y glía <sup>(181)</sup>. La unión de BDNF al receptor truncado en astrocitos, induce la formación del homodímero de TrkB-T1 que interactúa con RhoGDI1, lo cual disminuye la actividad de moléculas de señalización al inhibir RhoGTPasas, alterando finalmente la morfología de los astrocitos <sup>(147; 151)</sup> (Figura 9). Por otra parte, en astrocitos y células neuronales, la estimulación de TrkB-T1 induce liberación de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares vía PLC-IP3 <sup>(147; 151)</sup>. Considerando que la vía de la PLC participa en la plasticidad neuronal, se ha sugerido que TrkB-T1 podría estar implicado en este proceso <sup>(147)</sup>.



**Figura 9.** Funciones de la vía de señalización BDNF-TrkB en el SNC. La unión de BDNF a TrkB-FL en neuronas (panel izquierdo) induce la dimerización y activación del receptor, desencadenando tres rutas principales de señalización: MAPK/ERK (celeste), PI3K (rosa) y PLCγ (naranja). TrkB-T1 puede formar heterodímeros con TrkB-FL y bloquear sus cascadas de señalización. TrkB-T1 regula la concentración local de BDNF (panel superior) y la morfología celular en neuronas y astrocitos (panel izquierdo y derecho respectivamente). P: sitios de fosforilación. Adaptado de: Tejada y Diaz-Guerra <sup>(181)</sup>.

➤ *Alteraciones de BDNF en el circuito neuronal de la depresión*

BDNF y su receptor se expresan en las diferentes estructuras cerebrales que conforman el circuito neuronal de la depresión. Se ha propuesto un rol diferencial de BDNF de acuerdo a su localización en el mencionado circuito <sup>(104)</sup>.

Se ha demostrado que diversas formas de estrés, como separación materna, CUMS y CSDS, entre otros, disminuyen la expresión de BDNF en hipocampo y CPF, lo cual se asoció con el desarrollo de conductas tipo depresivas <sup>(104; 187-189)</sup>. Por su parte, el tratamiento crónico con diferentes antidepresivos incrementa significativamente la expresión de la neurotrofina en estas áreas cerebrales y revierte las alteraciones conductuales <sup>(104; 187; 190; 191)</sup>. Además, se describieron efectos antidepresivos en diversas pruebas conductuales tras la infusión de BDNF en mesencéfalo e hipocampo <sup>(192; 193)</sup>. En cuanto a observaciones realizadas en pacientes depresivos, se han descrito menores niveles séricos de BDNF respecto a sujetos controles y a aquellos que empleaban antidepresivos <sup>(194-196)</sup>. Estudios post mortem, mostraron mayores niveles de BDNF en hipocampo de sujetos tratados con antidepresivos en relación a individuos no medicados <sup>(197)</sup>. Se ha sugerido que el aumento en la expresión de BDNF resultado de la administración crónica de antidepresivos podría revertir o prevenir el daño neuronal que se produce como consecuencia de la exposición a estímulos aversivos <sup>(76; 198)</sup>. De esta manera, el tiempo requerido para el inicio de los efectos terapéuticos de los antidepresivos podría deberse al tiempo necesario para que los niveles de BDNF aumenten y ejerza sus efectos neurotróficos <sup>(76)</sup>. Adicionalmente, estudios post mortem en víctimas de suicidio, previamente diagnosticadas con depresión, desorden bipolar, ansiedad y/o trastorno esquizoafectivo, mostraron niveles disminuidos de BDNF y de TrkB-FL en hipocampo y CPF <sup>(199-201)</sup>.

Por su parte, la amígdala ha sido estudiada ampliamente en desórdenes de ansiedad, estrés postraumático y en la adicción a sustancias, mientras que en el campo de la depresión ha recibido menor atención. No obstante, estudios preclínicos han observado un incremento de BDNF en esta estructura en respuesta al estrés y se ha asociado con cambios estructurales como incremento en la densidad espinal y con conductas principalmente del tipo ansiosas, muchas veces presentes en individuos depresivos <sup>(104; 177; 202)</sup>.

Por otra parte, se ha descrito un rol prodepresivo de la vía de señalización BDNF-TrkB a nivel de la vía ATV-NAc. Se observaron mayores niveles de BDNF, en muestras post mortem de NAc de pacientes depresivos como así también en NAc de animales expuestos a estrés crónico <sup>(203-205)</sup>. En este sentido, la terapia electroconvulsiva, uno de los tratamientos más efectivos de la depresión, induce una reducción de la expresión de BDNF en ATV promoviendo su efecto antidepresivo <sup>(206)</sup>. En animales, la infusión local de BDNF en ATV o NAc induce conductas tipo depresivas <sup>(204; 207)</sup> y, por el contrario, la inhibición de la señalización de BDNF en estas estructuras ejerce un efecto antidepresivo <sup>(203-206)</sup>, sugiriendo que BDNF en la vía ATV-NAc contribuye al desarrollo de al menos algunos síntomas depresivos <sup>(203; 205; 207)</sup>.

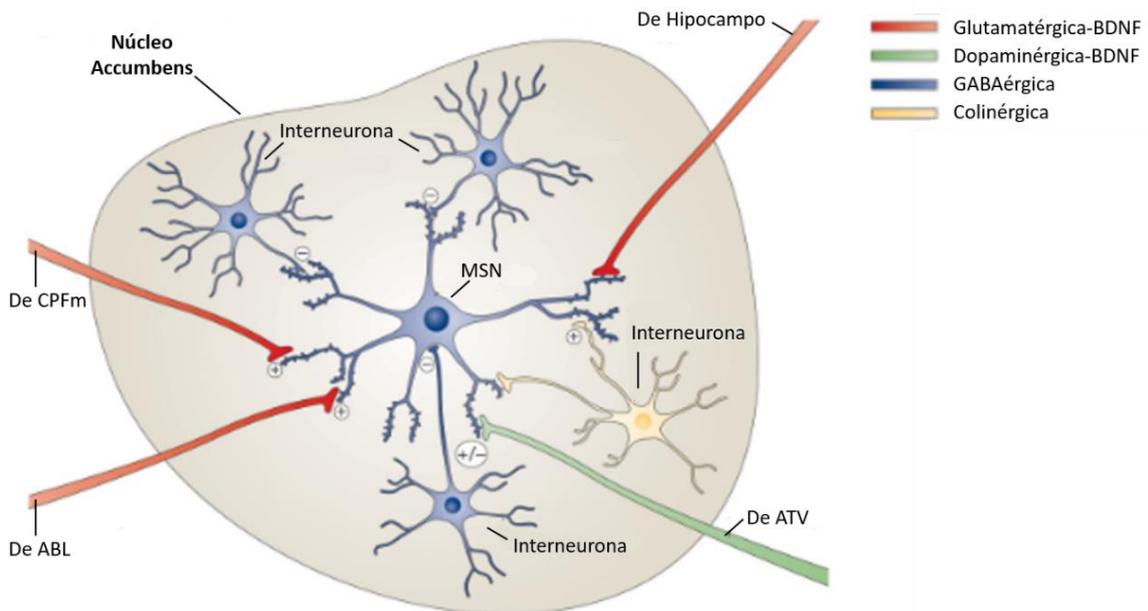
### **Anhedonia**

La anhedonia es considerada un síntoma relevante de diferentes desórdenes psiquiátricos. El hecho que el DSM-5 <sup>(31)</sup> determine a la anhedonia como un síntoma central de la depresión y establezca que un estado de ánimo deprimido y/o anhedonia debe estar presente en el paciente para ser diagnosticado con depresión, destaca la importancia de dicho síntoma. Incluso, se ha demostrado que la presencia de anhedonia es un factor de pronóstico negativo, tanto en adolescentes <sup>(208)</sup> como en adultos <sup>(209; 210)</sup>. La anhedonia se define como la pérdida de la capacidad para experimentar placer en respuesta a estímulos gratificantes tales como la comida, el sexo y las interacciones sociales, los cuales eran percibidos como recompensantes previo al inicio de la enfermedad <sup>(92; 211)</sup>.

Ha sido propuesto que el desarrollo del déficit hedónico estaría relacionado con una disfunción a nivel de NAc, estructura clave dentro del circuito neuronal de recompensa <sup>(121; 211; 212)</sup>. Debido que la sensación de placer está mediada por la activación de la vía ATV-NAc, se ha sugerido un rol crucial de la misma en la patogénesis de la depresión <sup>(92; 105; 112)</sup>. En este sentido, se ha postulado que alteraciones a nivel de BDNF en la vía dopaminérgica mesolímbica representaría un posible mecanismo neurobiológico que subyace a la anhedonia <sup>(87; 176; 207)</sup>.

BDNF regula el funcionalismo de NAc mediante la activación de receptores TrkB en neuronas GABAérgicas en dicha estructura <sup>(203)</sup>. De acuerdo con la literatura, ATV sería la principal fuente de BDNF en NAc. Esta afirmación está respaldada por el hecho que se

han descrito altos niveles de expresión del ARNm de BDNF en neuronas dopaminérgicas de ATV, los cuales son apenas detectables en NAc<sup>(203; 207; 213; 214)</sup>. Otra fuente de BDNF en NAc, adicional a ATV, la constituyen aferencias glutamatérgicas provenientes de corteza frontal, amígdala e hipocampo (Figura 10)<sup>(112)</sup>. Se ha demostrado que la anhedonia inducida por estrés está asociada con alteraciones en la fuerza de las sinapsis excitatorias de hipocampo a NAc<sup>(173; 215-217)</sup>.



**Figura 10.** Representación esquemática de las aferencias que llegan a neuronas GABAérgicas de NAc. Las neuronas dopaminérgicas de ATV expresan BDNF y constituyen una importante fuente de la neurotrofina a NAc, mientras que las MSN expresan bajos niveles de BDNF, sin definirse su relevancia fisiológica. Una fuente adicional de BDNF son las neuronas glutamatérgicas de Hipocampo, ABL y CPFm. Se muestra, además, la presencia de interneuronas GABAérgicas y colinérgicas que forman parte de esta estructura. MSN: *medium spiny neurons*, ABL: amígdala basolateral, CPFm: corteza prefrontal medial. Adaptado de: Russo y Nestler<sup>(92)</sup>.

---

---

# *Hipótesis y Objetivos*

---

---

## **Hipótesis**

Planteados los dos grandes problemas, desnutrición infantil y depresión; y considerando los antecedentes mencionados, la hipótesis central de nuestra línea de investigación sostiene que la injuria nutricional, en coincidencia con la ontogénesis del SNC, induce alteraciones irreversibles que modificarían la neuroplasticidad en áreas cerebrales del circuito neuronal de depresión, lo cual incrementaría la vulnerabilidad del sujeto adulto al desarrollo de desórdenes psiquiátricos.

Dentro de esta línea de investigación, nos propusimos estudiar si la hiponutrición proteica perinatal facilita la aparición de conductas depresivas, y profundizar la búsqueda de mecanismos neurobiológicos que subyacen a la anhedonia, un síntoma cardinal de depresión.

## **Objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo está dirigido a abordar a nivel experimental el impacto de la hiponutrición proteica perinatal sobre el desarrollo de conductas íntimamente relacionadas a la depresión.

A fin de dilucidar los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la anhedonia, establecer correlatos con alteraciones moleculares y morfológicas a nivel de estructuras cerebrales críticas que podrían alterar la comunicación y plasticidad de las vías neuronales involucradas en la generación de síntomas depresivos.

## **Objetivos específicos**

A partir del objetivo general se establecieron los siguientes objetivos específicos:

**1<sup>er</sup> objetivo:** *Evaluar el impacto de la hiponutrición perinatal sobre la generación de alteraciones comportamentales que mimetizan síntomas depresivos en animales adultos.*

Proponemos a la injuria nutricional perinatal como un factor de riesgo, que promueve cambios neuroadaptativos a nivel del circuito neuronal de depresión, los cuales facilitarían la generación de conductas tipo depresivas en animales adultos. A fin de investigar si la hiponutrición *per se* promueve dichas alteraciones o facilita los efectos de un evento estresante temprano evaluaremos cambios conductuales en animales

sometidos a separación materna. Dado que la depresión no puede ser caracterizada por la aparición de un único síntoma se utilizaron una serie de paradigmas conductuales que permiten evaluar alteraciones relacionadas con síntomas depresivos y ansiedad.

**2<sup>do</sup> objetivo:** *Evaluar modificaciones en la vía de señalización BDNF-TrkB en NAc e hipocampo como posible sustrato neurobiológico de la anhedonia en animales adultos.*

En base a los antecedentes, y la relevancia de NAc e hipocampo en la etiología de la depresión, hipotetizamos que el déficit nutricional temprano alteraría la síntesis y/o liberación de factores neurotróficos a este nivel durante períodos críticos de la ontogénesis del SNC, lo que podría traducirse en una desorganización estructural en la cual las conexiones neuronales se establecen de manera inapropiada. En el individuo adulto, un soporte neurotrófico inadecuado podría ser responsable de una capacidad disminuida del cerebro para responder adecuadamente ante estímulos apetitivos.

**3<sup>er</sup> objetivo:** *Investigar posibles alteraciones morfológicas en NAc e hipocampo de animales adultos.*

Disturbios a nivel de la neuroplasticidad podrían afectar la capacidad adaptativa del cerebro adulto e incrementar el riesgo de aparición de desórdenes depresivos. En la patogénesis de la depresión han sido descritas alteraciones en la densidad y morfología de espinas dendríticas en diferentes estructuras del circuito de depresión <sup>(160; 174)</sup>. Teniendo presente la importancia de la regulación de las espinas dendríticas en la comunicación neuronal y plasticidad sináptica consideramos relevante investigar si la malnutrición temprana induce cambios a nivel de la densidad espinal en la población neuronal presente en NAc e hipocampo.

**4<sup>to</sup> objetivo:** *Estudiar la reversión de los posibles cambios conductuales facilitados por la hiponutrición proteica perinatal.*

Ha sido demostrado que BDNF tiene una participación clave en la fisiopatología de la depresión, sugiriéndose un rol diferencial de acuerdo a las modificaciones en su expresión en el circuito neuronal de la depresión <sup>(104)</sup>. A fin de indagar si la vía de señalización BDNF-TrkB en NAc e hipocampo es relevante para la inducción de la anhedonia, nos propusimos evaluar la reversión de los cambios conductuales

observados mediante la administración directa del bloqueante selectivo del receptor TrkB ANA-12 en ambas estructuras.

Para alcanzar los objetivos planteados, se abordaron estrategias comportamentales, moleculares, morfológicas y farmacológicas en el modelo animal de hiponutrición proteica perinatal ampliamente utilizado en nuestro laboratorio.

---

---

*Materiales y  
Métodos*

---

---

## Animales

Se emplearon ratas adultas macho de la cepa Wistar criadas y mantenidas en el bioterio del Anexo del Departamento de Farmacología Otto Orsingher de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Los animales fueron alojados en grupos de 8 ratas por caja (38 x 58 x 20 cm), con agua y comida disponible *ad libitum*. El bioterio se mantuvo bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (iniciando el ciclo de luz a las 7 a.m.) y a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Los animales fueron habituados al contacto con el experimentador, mediante sesiones de manipulación de no más de 2 min por rata, por al menos 5 días previos al inicio de los experimentos. Todos los grupos experimentales estuvieron conformados por animales provenientes de distintas camadas, a fin de evitar que estuviesen constituidos preponderantemente por sujetos consanguíneos.

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la FCQ, UNC bajo Resolución N° 1646/17; y se realizaron conforme a las normas establecidas por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*NIH-National Institute of Health*). Es importante destacar, que se realizaron los esfuerzos necesarios para minimizar el número y el sufrimiento de los animales empleados.

Nuestro diseño experimental se realizó en ratas macho, y probablemente este aspecto pueda representar una debilidad o limitación en el mismo. No obstante, la malnutrición proteica perinatal constituye un evento trascendental que produce importantes cambios a nivel del SNC. Teniendo en cuenta que el modelo animal de hiponutrición empleado genera una amplia variabilidad en diversas pruebas conductuales, introducir una nueva variable como el sexo en el diseño representaría un gran incremento del número de animales que se deberían utilizar. Lo cual es contrario a lo aconsejado por los comités de ética sobre el manejo y utilización de animales en investigación preclínica. Por lo tanto, reconocemos que la inclusión de hembras podría mejorar y ampliar considerablemente los alcances del estudio, pero asumimos que esto excede los objetivos del presente trabajo de tesis.

## **Esquema de hiponutrición proteica perinatal**

A los 14 días de gestación, considerando día 1 aquel en que las hembras presentan espermatozoides en sus extendidos vaginales, las ratas preñadas son colocadas en cajas individuales y divididas en dos grupos: control (C) e hiponutrido (H). Dichos grupos, comienzan a ser alimentados con dietas isocalóricas que contienen caseína como única fuente de proteínas, en un 24% y 8% para el grupo C y H respectivamente. Ambas dietas son suplementadas con 4 g/kg de DL-metionina dado que la caseína es pobre en este aminoácido. El déficit calórico que genera la disminución de proteínas en el grupo H, es compensado por un incremento en los hidratos de carbono. La composición de las dietas correspondientes a cada grupo se muestra de manera detallada en la Tabla 2.

Producido el parto, las camadas se ajustan a 8 crías por madre. Los animales continúan con la dieta respectiva hasta el día postnatal 30 (DPN 30), momento en el cual se realiza el destete en coincidencia con la finalización del período de hiponutrición proteica. A partir de entonces, comienza el período de recuperación nutricional, en donde las crías de ambos grupos son mantenidas con dieta balanceada comercial (Gepsa Feeds, Grupo Pilar, Córdoba) por al menos 40 días antes de la realización de los experimentos. De este modo, la injuria nutricional afecta el crecimiento cerebral explosivo, que en la rata es fundamentalmente postnatal, como así también eventos prenatales que de ser alterados son igualmente importantes tanto a nivel funcional como en sus secuelas a largo plazo (Figura 11 A y B).

## **Protocolo de separación materna**

A fin de evaluar si la hiponutrición perinatal facilita la ocurrencia de conductas depresivas inducidas por un evento estresante temprano, en este trabajo empleamos un esquema en el cual se somete a las crías a menos días y/u horas de separación materna que los empleados usualmente <sup>(100; 218; 219)</sup>.

El día del nacimiento se designó como día postnatal cero (DPN 0). De esta forma, crías de los grupos C y H fueron separadas diariamente de sus madres (SM) por 3 h a partir del DPN 1 y hasta el DPN 10. A tal fin, las madres fueron removidas de su caja de residencia y llevadas a una habitación contigua en cajas individuales. Mientras que, las crías se mantuvieron en sus respectivas cajas, agrupadas en nido y en presencia del olor materno. Finalizada cada sesión de separación diaria, las madres retornaron a sus cajas

de residencia con sus crías. Este procedimiento se llevó a cabo durante la mañana (entre las 9:00 a.m. y 12:00 p.m.). Otro grupo de animales C y H no fueron sometidos al presente esquema de separación materna (NSM), de manera que las crías permanecieron constantemente en su caja de residencia con su madre (Figura 11 A).

### **Grupos experimentales**

Tras la aplicación del esquema de hiponutrición proteica perinatal y del protocolo de separación materna, quedaron conformados los siguientes grupos experimentales: control (24%) no expuesto a separación materna (C-NSM); control sometido a separación materna (C-SM), hiponutrido (8%) no expuesto a separación materna (H-NSM) e hiponutrido sometido a separación materna (H-SM).

Se registró el peso corporal y cerebral de animales correspondientes a cada uno de los grupos experimentales, una vez que alcanzaron los 70 días de edad.

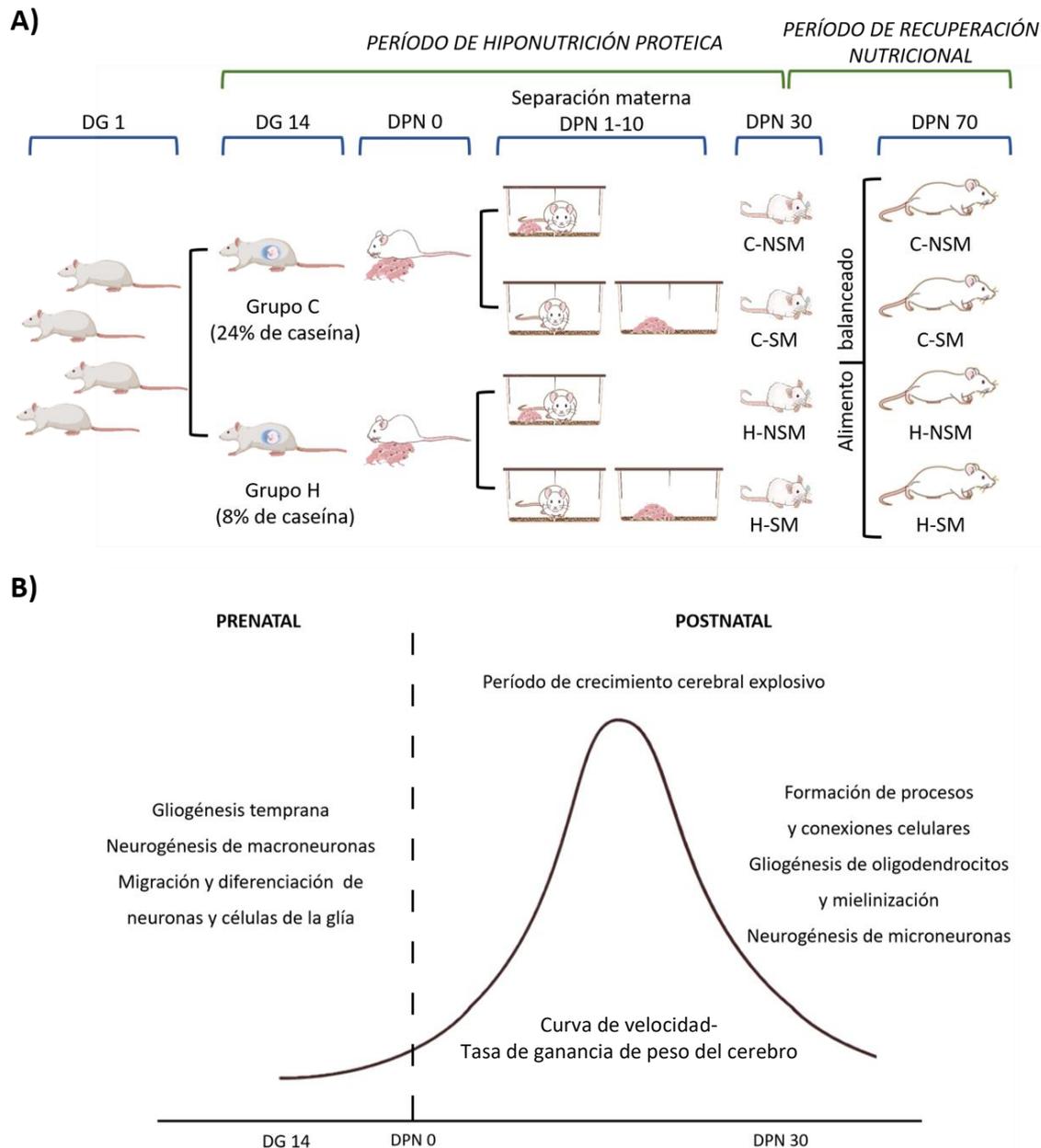
Considerando los resultados que se obtuvieron al realizar los experimentos correspondientes al 1<sup>er</sup> objetivo, y a fin de reducir el número de animales a utilizar, en los objetivos subsiguientes no se emplearon animales sometidos al protocolo de separación materna. De manera que, a partir del 2<sup>do</sup> objetivo, los grupos experimentales quedaron conformados por animales controles (grupo C) e hiponutridos (grupo H).

**Tabla 2.** Composición de las dietas (g%) administradas a ratas controles e hiponutridas.

Composición de la dieta		Control (g%)	Hipoproteica (g%)
Caseína		24.00	8.00
Azúcar		44.45	56.95
Almidón de maíz		9.90	13.40
Aceite vegetal hidrogenado		15.00	15.00
Aceite de maíz		1.00	1.00
Mezcla de vitaminas <sup>1</sup>		1.25	1.25
Mezcla de minerales <sup>2</sup>		4.00	4.00
DL-metionina		0.40	0.40

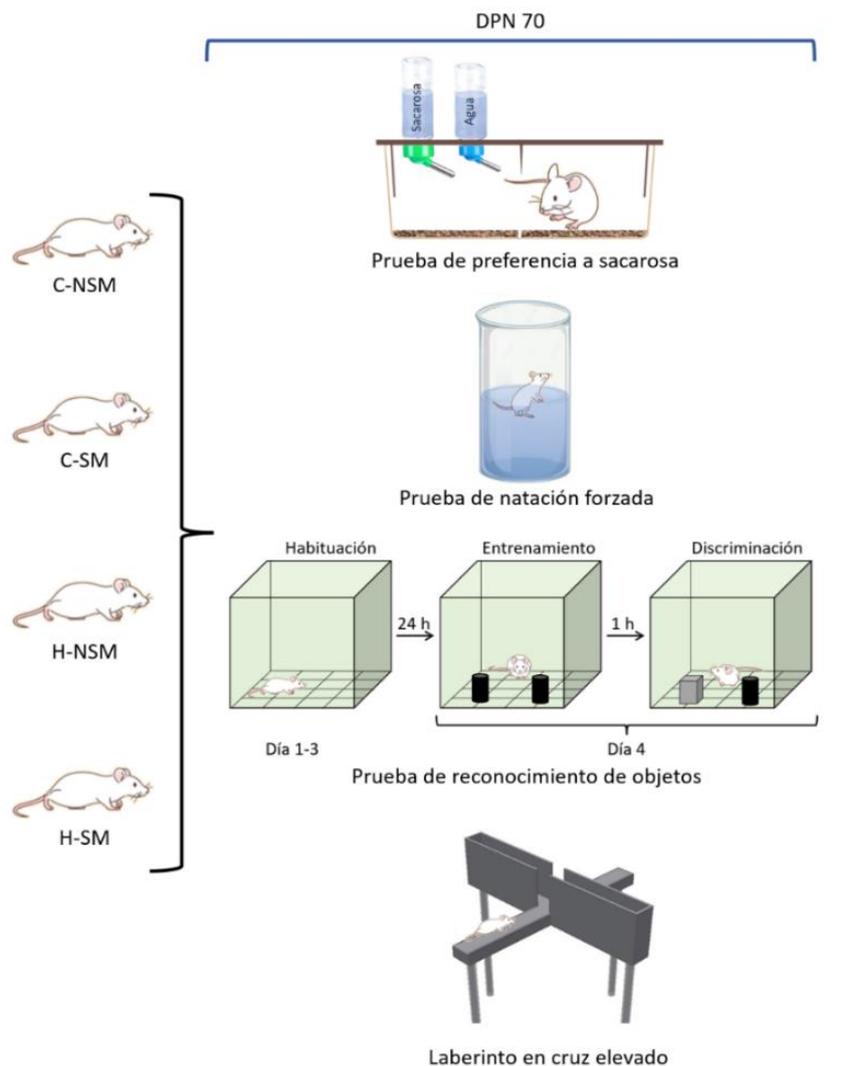
<sup>1</sup> Mezcla de vitaminas		<sup>2</sup> Mezcla de sales	
Composición	mg/kg dieta	Composición	g/kg dieta
Ácido p-aminobenzoico	110,00	CaCO <sub>3</sub>	21,720
Ácido ascórbico	1018,00	MgCO <sub>3</sub>	1,000
Biotina	0,44	MgSO <sub>4</sub>	0,640
Vitamina B12	30,00	NaCl	2,760
Pantotenato	66,00	KCl	4,480
Cloruro de colina	1756,70	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,480
Ácido fólico	2,00	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,933
Inositol	2,00	KI	0,003
Menadiona	50,00	MnCl <sub>2</sub>	0,012
Ácido nicotínico	99,00	NaF	0,004
Hidrocloruro de piridoxina	22,00	KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,047
Riboflavina	22,00	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,036
Hidrocloruro de tiamina	22,00	ZnSO <sub>4</sub>	1,040
Acetato de vitamina A	50000 UI	De acuerdo a Bernhart y Tomarelli <sup>(220)</sup>	
Vitamina D	1000 UI		
Acetato de vitamina E	200 UI		



**Figura 11. A)** Esquema de hiponutrición proteica perinatal y separación materna. El déficit nutricional ocurre entre el DG 14 y el DPN 30. Luego del nacimiento y a partir del DPN 1, las crías del grupo C y del grupo H fueron sometidas a 10 días de separación materna. DG: día gestacional, DPN: día postnatal, C: control, H: hiponutrido, NSM: no separado de la madre, SM: separado de la madre. **B)** Eventos pre y postnatales fundamentales durante el desarrollo del SNC. La curva representa la velocidad de crecimiento del cerebro a lo largo del tiempo en función del peso. Notar que el déficit proteico abarca el periodo de crecimiento cerebral explosivo y procesos prenatales igualmente importantes para el normal desarrollo y funcionalidad del SNC. Adaptado de: Morgane y col. <sup>(48)</sup>

## Evaluaciones conductuales

Se emplearon los siguientes paradigmas experimentales: prueba de preferencia a sacarosa, prueba de reconocimiento de objetos, prueba de natación forzada y laberinto en cruz elevado. Las evaluaciones del comportamiento iniciaron cuando los animales de los distintos grupos experimentales alcanzaron los 70 días de edad (Figura 12). Todas las pruebas se realizaron en una habitación en silencio e iluminada con luz tenue y se llevaron a cabo durante el período de luz (en el rango horario comprendido entre las 9 y 13 h).



**Figura 12.** Representación esquemática de las pruebas conductuales a la que fueron expuestos los diferentes grupos de animales a partir del DPN 70. DPN: día postnatal, C: control, H: hiponutrido, NMS: no separado de la madre, SM: separado de la madre.

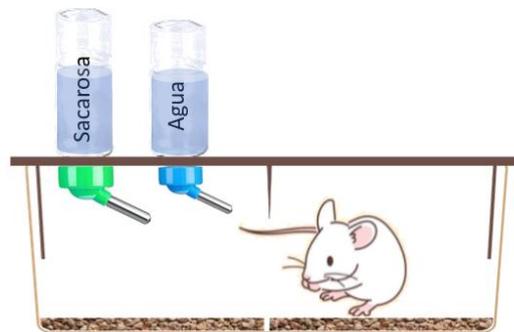
➤ *Prueba de preferencia a sacarosa*

La prueba de preferencia a sacarosa es un paradigma ampliamente empleado a nivel experimental para evaluar anhedonia. En condiciones normales, las ratas exhiben una preferencia por el consumo de sustancias palatables como la sacarosa en relación a la ingesta de agua. La disminución de la preferencia a sacarosa es considerada un índice de anhedonia en modelos animales <sup>(221)</sup>.

Previo al inicio de la prueba, los animales fueron privados de agua por 24 h. Los días siguientes sólo tuvieron acceso a líquidos durante las 3 h de registro. De esta forma, durante 5 días de entrenamiento y 5 días adicionales de evaluación, animales de los diferentes grupos experimentales fueron colocados en cajas individuales durante 3 h con libre acceso a dos probetas de 50 ml ubicadas una al lado de la otra, una de ellas conteniendo agua y la otra solución de sacarosa al 1% o 5% (Zurita y col. <sup>(222)</sup>, con algunas modificaciones) (Figura 13). La posición de las probetas se alternó diariamente a fin de prevenir un hábito posicional. Se registró el consumo de agua y sacarosa pesando las probetas al inicio y final de la evaluación diaria. Con los datos obtenidos se determinó un índice de preferencia a sacarosa de la siguiente manera:

$$\% \text{ Preferencia a sacarosa} = \frac{\text{consumo de sacarosa}}{\text{consumo total de líquidos}} \times 100$$

La preferencia a sacarosa de cada rata se calculó como la ingesta promedio de todos los días de evaluados.



**Figura 13.** Representación esquemática de la prueba de preferencia a sacarosa. El animal tiene la libertad de elegir entre el consumo de agua y sacarosa durante 10 días consecutivos.

➤ *Prueba de natación forzada*

En esta prueba se somete a los animales a una situación aversiva inescapable. Se empleó el método descrito por Porsolt y col. <sup>(223)</sup>. El procedimiento consiste en dos sesiones en las que los animales son forzados a nadar en un cilindro de acrílico transparente (altura: 40 cm, diámetro: 18 cm) que contiene agua a  $24 \pm 1$  °C con una profundidad de 21 cm. Bajo estas condiciones, el animal no puede salir ni tocar el fondo (Figura 14). Durante la primera sesión, las ratas se colocaron individualmente en el cilindro con agua durante 15 min (pre test). Cuando un animal es introducido por primera vez en el tanque con agua, nada vigorosamente durante un tiempo, para luego adoptar una postura característica de inmovilidad con movimientos suaves de sus patas delanteras para mantener la cabeza o al menos el hocico fuera del agua. Veinticuatro horas más tarde, fueron introducidos nuevamente en el tanque por 5 min (test). Finalizada cada sesión de nado, los animales fueron secados, utilizando toallas y un flujo de aire caliente, y retornados a su caja de residencia. Durante el test, se registró el tiempo de inmovilidad, es decir, el tiempo que el animal permanece flotando pasivamente. La inmovilidad es considerada un índice de desesperanza y depresión del humor <sup>(223)</sup>.



**Figura 14.** Representación gráfica de la prueba de natación forzada. Se evalúa el tiempo en el que el animal permanece inmóvil, al introducirlo en un cilindro que contiene agua, como índice de desesperanza.

➤ *Prueba de reconocimiento de objetos*

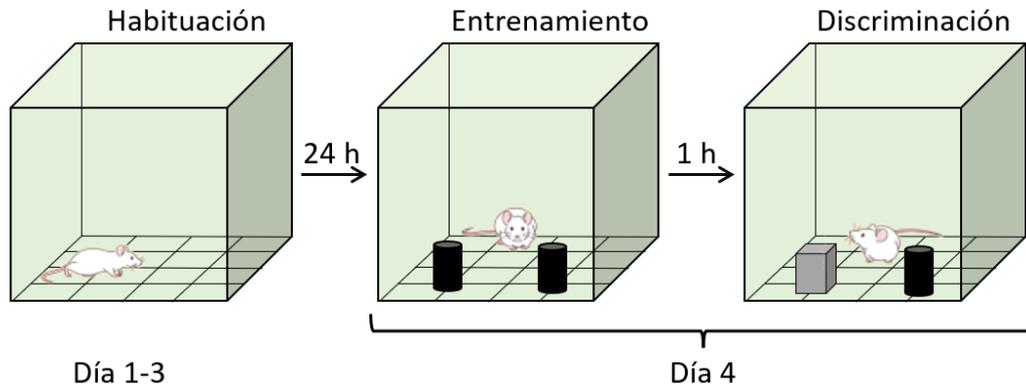
Este paradigma conductual, empleado comúnmente para evaluar posibles alteraciones cognitivas, fue originalmente descrito por Ennaceur y Delacour <sup>(224)</sup>. Se basa en la tendencia natural de la rata a explorar más activamente un objeto desconocido que uno familiar <sup>(224)</sup>. La prueba fue realizada empleando una caja de campo abierto de madera (60 x 60 x 60 cm), cuyo piso se encuentra dividido por líneas negras en 16 cuadrados,

ubicada en una habitación homogéneamente iluminada. El procedimiento consiste en tres etapas: habituación, entrenamiento y discriminación. Durante la fase de habituación (días 1 al 3), cada animal se colocó en el centro del campo abierto y se le permitió explorar libremente el lugar por 10 min el primer día y por 5 min el resto de los días. Se evaluó la locomoción durante los primeros 3 min de cada sesión, registrando el número de cuadrados que el animal cruzó con sus cuatro patas. El cuarto día, las ratas se colocaron individualmente en una esquina del campo abierto y se les permitió explorar libremente 2 objetos idénticos (cilindros de vidrio de 15 x 6 cm) durante 5 min (fase de entrenamiento). Una hora después, uno de los objetos familiares fue reemplazado por otro diferente (cono de plástico negro de 11 x 9 x 5 cm) y nuevamente, durante 5 min, se les permitió explorar los objetos (fase de discriminación) (Figura 15). A fin de evitar que la exploración esté condicionada por la posición de los objetos, la ubicación de los mismos se alternó aleatoriamente. El campo abierto y los objetos se limpiaron con etanol al 70% antes del comienzo de cada una de las diferentes etapas. Tanto durante la fase de entrenamiento como durante la fase de discriminación, se registró el tiempo que la rata permaneció explorando cada uno de los objetos. Se considera como exploración el acercamiento del animal hacia el objeto con el hocico a no más de 2 cm de distancia del mismo. Los tiempos de exploración registrados se utilizaron para calcular el índice de exploración y el índice de discriminación empleando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Exploración del objeto} = \frac{t \text{ de exploración del objeto}}{t \text{ de exploración de ambos objetos}} \times 100$$

$$\text{Índice de discriminación} = \frac{t \text{ exploración del objeto nuevo} - t \text{ exploración del objeto familiar}}{t \text{ exploración del objeto nuevo} + t \text{ exploración del objeto familiar}}$$

El índice de discriminación adquiere valores entre 1 y -1. Un valor positivo indica mayor tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo que el familiar, mientras que uno negativo indica lo opuesto. La ausencia de preferencia por alguno de los objetos se manifiesta con índices de discriminación iguales a cero <sup>(225; 226)</sup>.



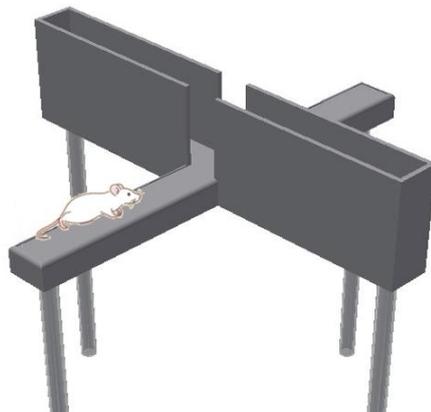
**Figura 15.** Esquema donde se encuentran representadas las tres fases y los intervalos entre fases de la prueba de reconocimiento de objetos.

➤ *Laberinto en cruz elevado*

La ansiedad se evaluó empleando el laberinto en cruz elevado. Dicho laberinto, consiste en un aparato de acrílico negro en forma de cruz que consta de dos brazos opuestos abiertos (50 x 10 cm) y dos brazos opuestos cerrados por paredes laterales (50 x 10 x 40 cm). Los brazos están comunicados por una plataforma central (10 cm<sup>2</sup>) y elevados 50 cm del suelo (Figura 16). Las ratas se colocaron individualmente en el centro del laberinto y se les permitió explorar libremente el aparato durante 5 min. Se registró el tiempo de permanencia del animal en cada uno de los brazos, y a partir de los datos obtenidos se calculó el índice de ansiedad.

$$\text{Índice de ansiedad (\%)} = \frac{t \text{ en los brazos abiertos}}{t \text{ en los brazos abiertos} + t \text{ en los brazos cerrados}} \times 100$$

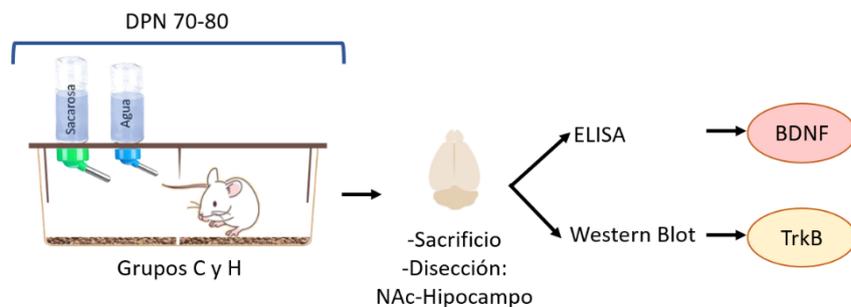
Niveles altos de ansiedad se relacionan con un mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados, y en consecuencia un menor índice de ansiedad.



**Figura 16.** Ilustración del laberinto en cruz elevado, empleado para evaluar ansiedad en los distintos grupos experimentales.

## Estudios moleculares

Las determinaciones moleculares se realizaron una vez finalizada la prueba de preferencia a sacarosa (DPN 80). Así, diferentes grupos de animales C y H de 70 días de edad fueron sometidos a la prueba de preferencia a sacarosa al 1%. El último día de evaluación conductual, inmediatamente finalizada la prueba de preferencia, los animales fueron sacrificados por decapitación. Las estructuras a analizar, NAc e hipocampo, fueron rápidamente disecadas sobre hielo a partir de cortes coronales del cerebro. Las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la técnica de ELISA o Western Blot para determinación de los niveles proteicos de BDNF y del receptor TrkB (TrkB-FL, TrkB-T y p-TrkB (forma fosforilada del receptor)) respectivamente (Figura 17).



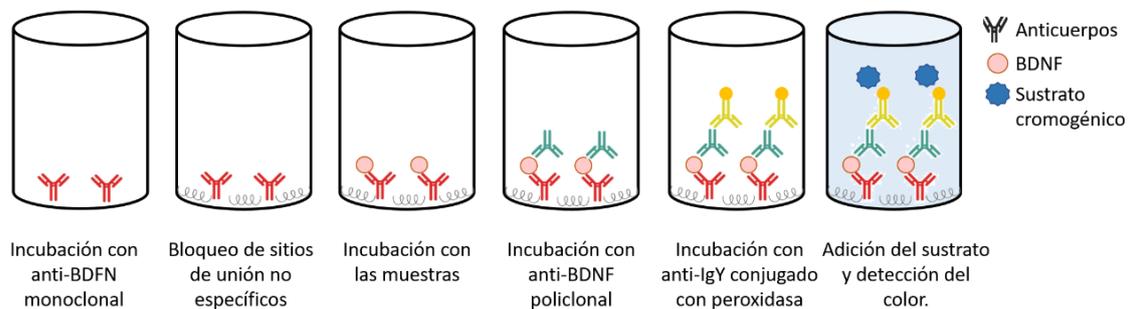
**Figura 17.** Diagrama esquemático que representa el procedimiento experimental empleado para realizar las determinaciones a nivel molecular. DPN: día postnatal, C: control, H: hiponutrido, NAc: núcleo accumbens.

### ➤ Técnica de ELISA

La determinación de los niveles proteicos de BDNF se realizó empleando el kit BDNF *Emax Immuno Assay System* (Promega, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para iniciar el análisis, los tejidos extraídos luego de la disección de NAc e hipocampo se homogeneizaron en buffer de lisis (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% NP40, 10% glicerol) conteniendo inhibidores de enzimas proteasas y fosfatasas (1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinina, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 0,5 mM ortovanadato de sodio). Las muestras obtenidas a partir de NAc se centrifugaron a 12000 *g* durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , mientras que los homogenatos de hipocampo se centrifugaron a 14000 *rpm* por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una alícuota del sobrenadante obtenido se diluyó 1:3 en buffer *Block & Sample 1X*. Para las determinaciones se emplearon microplacas de 96 pocillos, las mismas fueron recubiertas con un anticuerpo monoclonal

anti-BDNF e incubadas durante toda la noche a 4 °C. Luego del bloqueo de los sitios inespecíficos con *Block & Sample 1X* durante 1 h, las placas se incubaron a temperatura ambiente con las muestras diluidas durante 2 h. Paso seguido, las placas se incubaron a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal anti-BDNF durante 2 h y posteriormente con un anticuerpo anti-IgY conjugado con peroxidasa durante 1 h. Finalizada cada una de las incubaciones realizadas, se efectuaron lavados de los excesos con buffer TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-base (pH 7.6), 0,05% Tween 20). Finalmente, luego del agregado del sustrato cromogénico (3,3,5,5-tetrametilbenzidina), se cuantificó la reacción de color a 450 nm empleando un lector de placas de ELISA (Figura 18). La concentración de BDNF se determinó a partir de una curva estándar en un rango de concentración comprendido entre 0 a 500 pg/ml.

Por otra parte, se cuantificó la concentración total de proteínas mediante el método de Bradford <sup>(227)</sup> a partir de una alícuota del sobrenadante obtenido luego de la homogenización. La concentración de BDNF en cada estructura se expresó en función de los mg de proteínas del tejido (pg BDNF/mg de proteínas) y como porcentaje del grupo C.



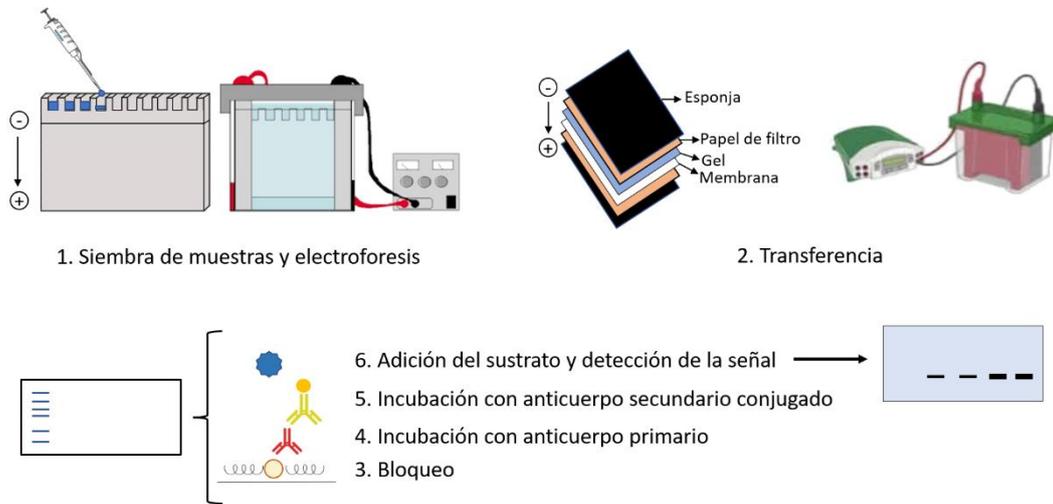
**Figura 18.** Esquema del protocolo de ELISA empleado para evaluar los niveles de BDNF en NAc e hipocampo. Se representa un pocillo de una microplaca en los pasos sucesivos del análisis.

### ➤ *Western Blot*

Los tejidos extraídos tras la disección, se homogeneizaron en buffer RIPA (150 mM NaCl, 0,1% tritón X-100, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 50 mM Tris (pH 7.4)) con inhibidores de proteasas (10 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y fosfatasa (0,5 mM de ortovanadato de sodio). Los homogenatos de NAc e hipocampo fueron centrifugados a 4°C y 14000 rpm durante

15 o 30 minutos respectivamente. Finalizada la centrifugación se procedió a tomar alícuotas de los sobrenadantes, las cuales constituyeron el extracto proteico. La concentración de proteínas en los mismos se determinó por el método de Bradford <sup>(227)</sup>. Alícuotas adicionales de los sobrenadantes se combinaron con igual volúmen de buffer Laemmli 2X (4% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 125 mM Tris (pH 6.8)) y se hirvieron durante 5 min. Posteriormente, cantidades iguales de las muestras resultantes (30 µg de proteína por carril) fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE 8%) en paralelo con un marcador de peso molecular (Bio-Rad), durante aproximadamente 1,5 h a 110 mV en buffer de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8.3), 0.1% SDS). Las proteínas resueltas en el gel fueron luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (del inglés *polyvinylidene difluoride*) durante 1 h a 350 mA en buffer de transferencia (para membranas de nitrocelulosa: 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8.3); para membranas de PVDF: 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8.3), 20% metanol). Finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina al 5% en buffer TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 0,1% Tween 20) durante 1 h a temperatura ambiente. A fin de revelar las bandas específicas, diferentes membranas de nitrocelulosa (empleadas para el análisis en NAc) fueron incubadas durante la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales específicos contra p-TrkB (1:1500; phospho S479, catalogo #ab228507, Abcam) o TrkB (1:1000; catalogo #07-225, EMD Millipore Corporation). Las membranas de PVDF (utilizadas para la evaluación en hipocampo) se incubaron con el anticuerpo contra p-TrkB durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, luego de su detección, este anticuerpo primario se eliminó de las membranas con NaOH 1 M por 2 min. Se bloquearon nuevamente las membranas y se reprobaron con anticuerpo contra TrkB. Independientemente de la membrana empleada, luego de cada incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:3000; catalogo #7074, Cell Signaling) durante 1,5 h a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBST y se procedió a la detección de las bandas de proteínas por quimioluminiscencia (ECL, por las siglas en inglés de *enhanced chemiluminescence*) sobre una placa radiográfica (Figura 19).

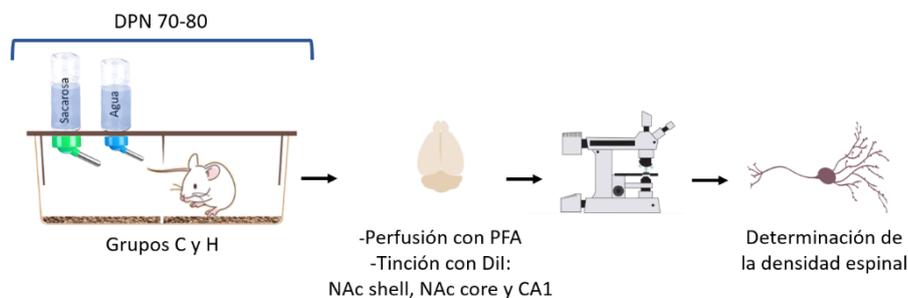
Por otra parte, se realizó la cuantificación de actina a fin de realizar un control de carga de las muestras. Así, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal específico contra actina (1:1000; catalogo #A3853, Sigma) seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:2500; catalogo #7076, Cell Signaling). Las placas fotográficas resultantes de cada ensayo de ECL realizado, se digitalizaron a través de un escáner y se analizaron utilizando un programa de análisis de imágenes (*Scion Image Software*, versión 4.0.2). Se determinaron los niveles del receptor de BDNF (fosforilado y no fosforilado), se normalizaron con los niveles proteicos de actina y se expresaron como porcentaje del grupo C.



**Figura 19.** Pasos principales de la prueba de Western Blot llevada a cabo para evaluar los niveles del receptor TrkB (TrkB-FL, TrkB-T y p-TrkB) en NAc e hipocampo.

## Análisis de la plasticidad estructural

El análisis de la densidad espinal en la población neuronal presente en NAc *shell*, NAc *core* y área CA1 de hipocampo, se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Tyler y Pozzo-Miller <sup>(228)</sup>, Calfa y *col.* <sup>(229)</sup> y Giachero y *col.* <sup>(230)</sup>. Una vez finalizada la prueba de preferencia a sacarosa al 1%, animales adultos C y H fueron anestesiados i.p. con una combinación de ketamina (55 mg/kg) - xilacina (11 mg/kg) y preparados para perfusión intracardiaca. Inicialmente se perfundió con buffer fosfato (0,1 M, pH 7.4), seguido por una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato. Una vez extraídos los cerebros, se conservaron en PFA 4% durante 24 h a 4°C. Luego, empleando un vibrátomo, se obtuvieron rebanadas cerebrales de 150 µm de espesor conteniendo el área en estudio, las cuales se conservaron en buffer fosfato salina 0,1%. Posteriormente, fueron inyectadas con pequeñas gotas (<10 µm) de una solución saturada del tinte lipofílico 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil indocarbocianina perclorato (Dil, Invitrogen; Carlsbad, CA) en aceite de pescado en NAc *shell*, NAc *core* y estrato radiado de CA1 de hipocampo dorsal, según correspondiese <sup>(231)</sup>. De esta manera, el colorante es captado por segmentos dendríticos pertenecientes a distintas neuronas. Utilizando un microscopio confocal de barrido láser FluoView FV-1000 (microscopio invertido Olympus IX81) con objetivo de inmersión en aceite (PlanApo, AN 1.42) del Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada (Córdoba, Argentina), se recolectaron imágenes en el plano z de segmentos dendríticos marcados. Las imágenes obtenidas fueron deconvolucionadas utilizando el programa *Huygens compute engine* (versión 4.3.1p2) y el análisis de espinas dendríticas se realizó manualmente empleando el programa *Fiji ImageJ* (versión 1.53q) (Figura 20).

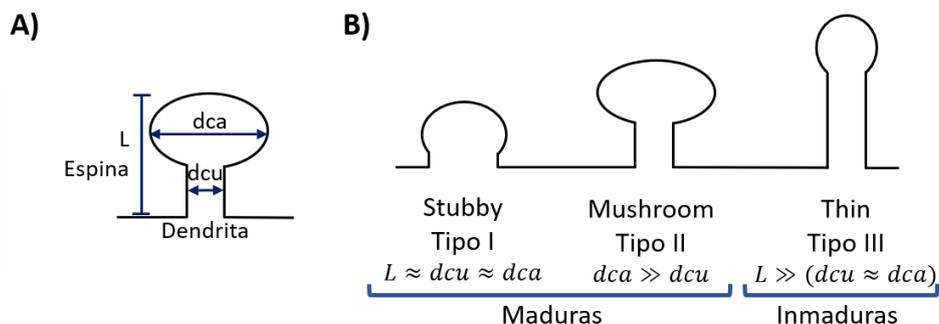


**Figura 20.** Procedimiento experimental empleado en el análisis de la densidad de espinas dendríticas en ambas subestructuras de NAc y en el área CA1 de hipocampo. DPN: día postnatal, C: control, H: hiponutrido, PFA: paraformaldehído, NAc: núcleo accumbens.

➤ *Análisis de espinas dendríticas*

Las espinas dendríticas se clasifican según su morfología en tres categorías: *stubby* (Tipo I), las cuales carecen en cierta medida de cuello; *mushroom* (Tipo II), las cuales presentan una cabeza amplia con un cuello corto y angosto; y *thin* (Tipo III) que son espinas finas, largas y de cabeza pequeña <sup>(232)</sup>. Los parámetros que se determinaron fueron, la densidad total de espinas dendríticas y la densidad de cada tipo de espina dendrítica según su morfología. A tal fin, las espinas se identificaron como protuberancias dendríticas de no más de 3  $\mu\text{m}$  de longitud que estuviesen en contacto con la dendrita pariente <sup>(229; 233; 234)</sup>. Las espinas se contaron individualmente y se incluyeron de acuerdo a su morfología en las categorías *stubby*, *mushroom* o *thin*. La clasificación se realizó basándose en las relaciones  $L/\text{dcu}$  y  $\text{dca}/\text{dcu}$ ; en donde  $L$  es la longitud de la espina desde su base en la dendrita hasta la punta de su cabeza,  $\text{dcu}$  es el diámetro máximo del cuello, y  $\text{dca}$  es el diámetro máximo de la cabeza (Figura 21 A). Luego, se midió el largo de la dendrita. El número total de espinas y el número de cada tipo de espinas se normalizó a 10  $\mu\text{m}$  de longitud del segmento dendrítico (densidad espinal).

En términos generales, tanto las espinas *stubby* como las *mushroom* presentan una  $L$  típicamente inferior a 1  $\mu\text{m}$ , se diferencian en que las *stubby* presentan un  $\text{dcu}$  y  $\text{dca}$  similares a la  $L$ , mientras que las *mushroom* poseen un  $\text{dca}$  mucho mayor que el  $\text{dcu}$ . En cuanto a las espinas *thin*, tienen una  $L$  superior a 1  $\mu\text{m}$ , lo cual es mucho mayor al  $\text{dcu}$ , y el  $\text{dca}$  no excede demasiado al  $\text{dcu}$  <sup>(228; 235)</sup>. Las espinas *stubby* y *mushroom* han sido incluidas dentro de la categoría de espinas maduras <sup>(229; 230; 234)</sup> (Figura 21 B). Esta clasificación se debe a que presentan extensos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la dendrita pariente y espinas adyacentes, y debido a la mayor fuerza de las sinapsis excitatorias formadas en estas espinas <sup>(236-240)</sup>.



**Figura 21. A)** Representación de una espina y de los parámetros utilizados para clasificarlas según su morfología. **B)** Morfología de los diferentes tipos de espinas dendríticas.  $L$ : longitud,  $\text{dcu}$ : diámetro del cuello,  $\text{dca}$ : diámetro de la cabeza.

## **Estudio de la reversión conductual**

Una estrategia farmacológica útil para investigar el rol de la señalización BDNF-TrkB es el empleo del antagonista del receptor TrkB, ANA-12. Dicho compuesto es un ligando selectivo de TrkB que previene la activación del receptor mediada por BDNF, evitando los efectos biológicos de la neurotrofina en las células que expresan el receptor. ANA-12 es capaz de inhibir los procesos intracelulares de TrkB, sin afectar las funciones del resto de los receptores tirosina quinasa (TrkA y TrkC) <sup>(241)</sup>.

### ➤ *Cirugía estereotáxica*

Animales de distintos grupos C y H fueron anestesiados i.p. con una combinación de ketamina (55 mg/kg) - xilacina (11 mg/kg) y posteriormente colocados en un aparato estereotáxico para ratas (Stoelting, EEUU), con la barra dental de los incisivos ubicada a -3,3 mm para lograr la posición horizontal de la cabeza del animal. Luego de realizar una incisión en el cuero cabelludo, de exponer y limpiar el cráneo, se tomaron las coordenadas de Bregma. Utilizando el atlas de Paxinos y Watson <sup>(242)</sup> se determinaron las coordenadas de ubicación de NAc *shell* (AP: +2,1 mm; L: ±0,8 mm; DV: -7,2 mm), NAc *core* (AP: +2,1 mm; L: ±1,5 mm; DV: -6,8 mm) y CA1 (AP: -3,2 mm; L: ±2,2 mm; DV: -2,4 mm), respecto Bregma y desde el cráneo. Se realizaron perforaciones al cráneo y se implantaron bilateralmente cánulas (con una longitud de: 14 mm para NAc y 9,7 mm para CA1, calibre 22 G) a 1,5 y 0,8 mm por encima del sitio final de infusión para evaluaciones en NAc e hipocampo respectivamente. Las cánulas se aseguraron al cráneo con cemento acrílico dental (Polímero Subiton, Laboratorios SL S.A., Bs.As., Argentina) y un tornillo de acero inoxidable. Se utilizaron tapa cánulas (calibre 30 G) fijadas al cemento a fin de evitar el ingreso de contaminantes y la oclusión de las cánulas. Inmediatamente terminada la cirugía, a fin de prevenir infecciones, se aplicó antibiótico tópico en la cabeza de los animales, además de administrarles una dosis subcutánea del antibiótico Norcilina 5000000 U.I (Penicilina-Estreptomicina; Laboratorios Nort, Bs.As., Argentina). Tras 5 días de recuperación sin perturbaciones, se inició con la prueba de preferencia a sacarosa al 1% (Figura 21).

➤ *Infusión intracerebral*

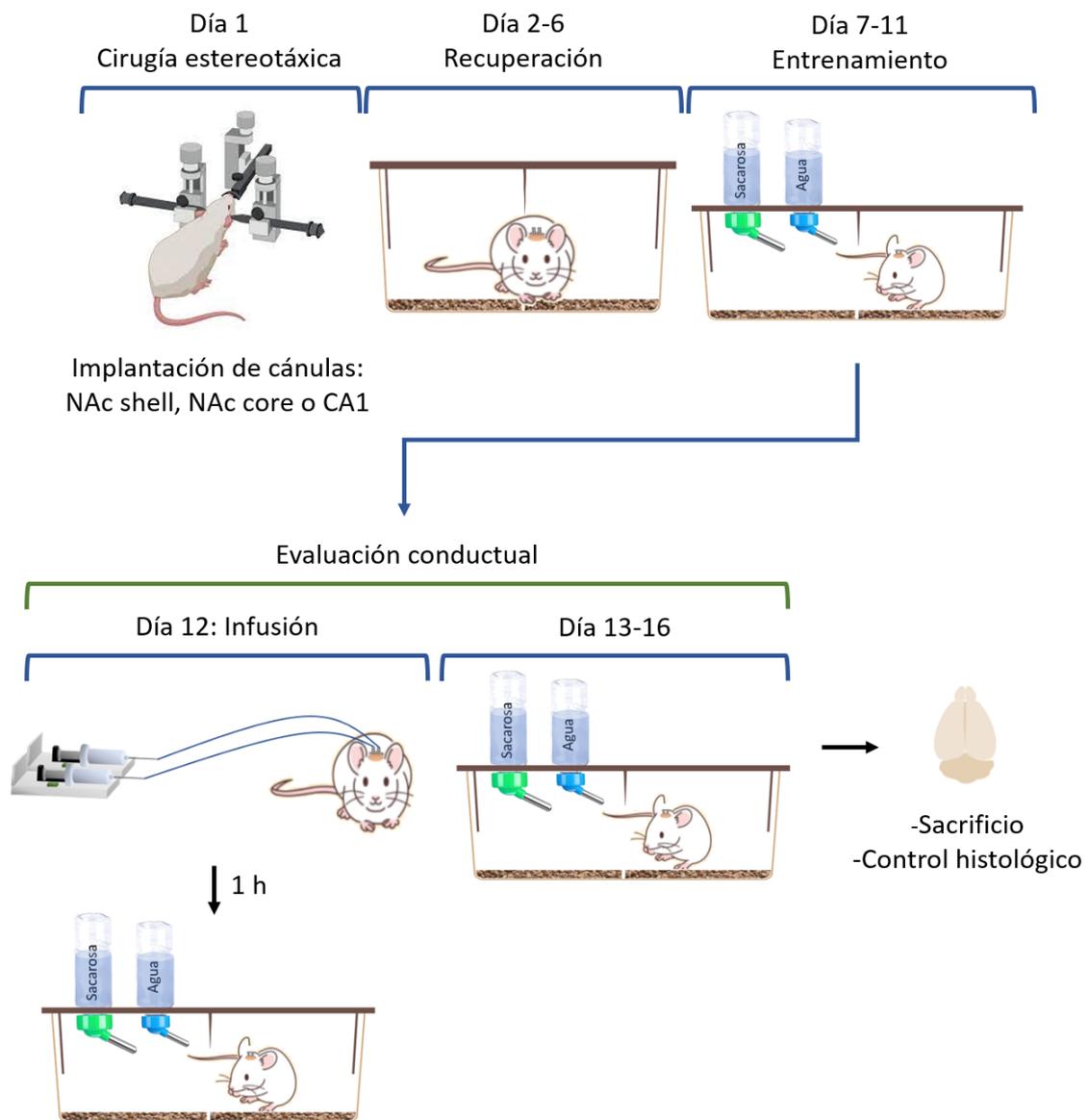
Luego de la fase de entrenamiento de la prueba conductual, los animales fueron infundidos localmente con el antagonista selectivo del receptor TrkB N2-(2-((2-oxoazepan-3-il) amino) carbonil} fenil) benzo [b] tiofeno-2-carboxamida (ANA-12, SML0209, Sigma-Aldrich) en la estructura correspondiente. A tal fin, se retiraron las tapas de las cánulas y se introdujeron inyectores (con una longitud de: 15,5 mm para NAc y 10,5 mm para CA1, calibre 30 G) que se extendían por debajo del extremo de la cánula permitiendo alcanzar el sitio de infusión deseado. Los inyectores se conectaron mediante tubos de polietileno (P10) a microjeringas de 10 µl (Hamilton) colocadas en una bomba de infusión (Carnegie Medicine, CMA/100). Se realizó la infusión de ANA-12 disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1% en salina fisiológica siguiendo distintos parámetros dependiendo de la estructura a inyectar:

- NAc *shell* y *core*: se infundieron 0,025 µg de ANA-12 por lado, con un flujo de infusión de 0,5 µl por 1 min.
- Hipocampo: 0,03 µg de ANA-12 por lado, administrando un volumen de 0,6 µl en un periodo de 1 min.

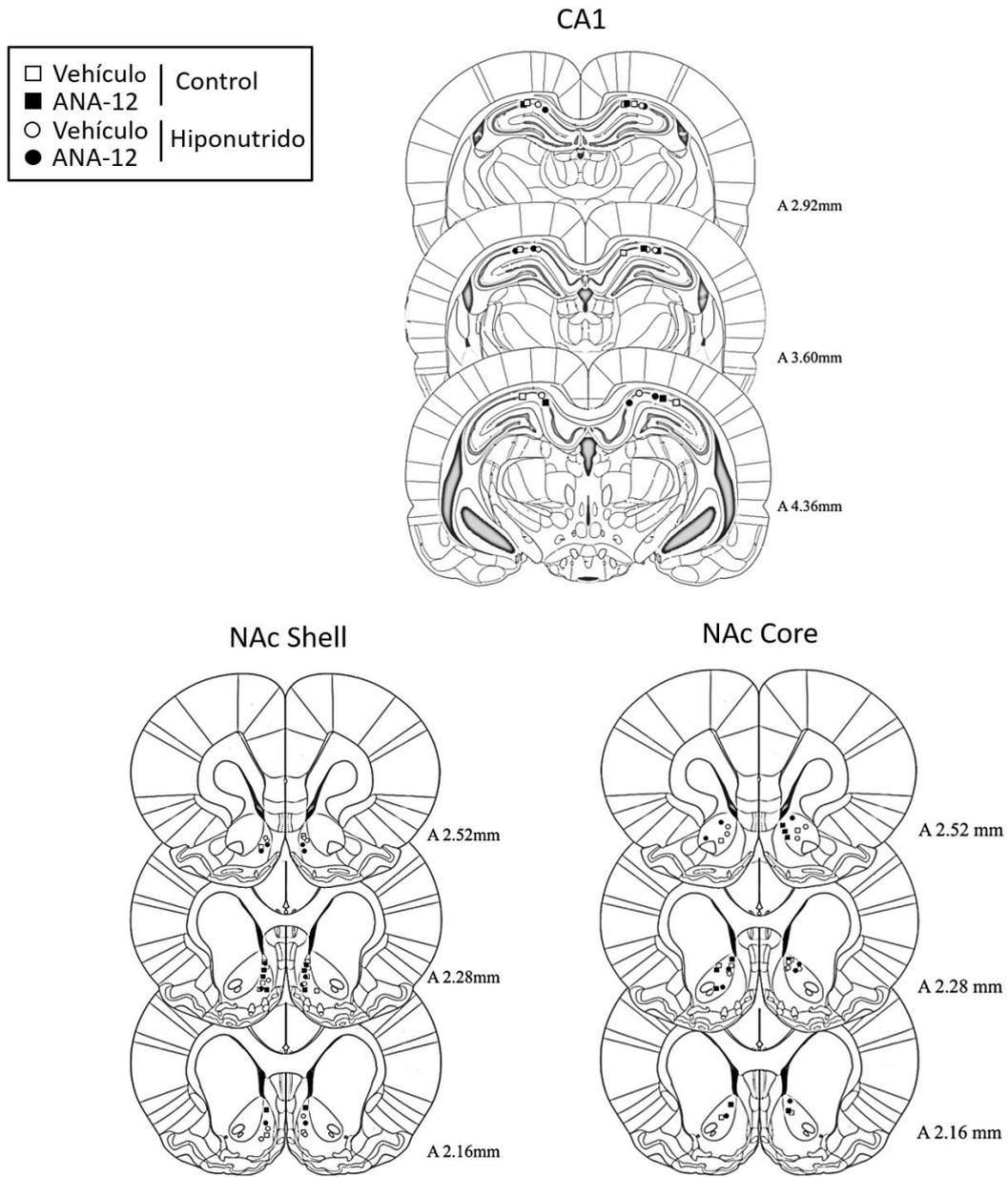
En cada caso se administró a los respectivos grupos vehículo, en el mismo período de tiempo, un volumen equivalente de DMSO al 1% en salina fisiológica. Finalizada la infusión de ANA-12 o de vehículo, los inyectores se mantuvieron en su lugar durante 1 min adicional para la difusión de la droga al tejido y prevención del reflujo de la misma. Una hora después de la infusión y por 4 días consecutivos se continuó con la evaluación de la preferencia a sacarosa (Figura 22).

➤ *Control histológico*

Finalizada la prueba de preferencia a sacarosa, los animales fueron sacrificados por decapitación, los cerebros extraídos y conservados en PFA 4% durante al menos 72 h para la fijación del tejido. Posteriormente, se obtuvieron secciones coronales de 60 µm utilizando un crióstato y se observaron bajo lupa para la determinación del sitio de infusión (Figura 23). Los animales cuyo sitio de inyección estuviese fuera del área de interés, o con daño mecánico excesivo, fueron excluidos del análisis posterior de datos.



**Figura 22.** Línea de tiempo experimental empleada para evaluar el efecto de ANA-12, infundido en distintas estructuras, en la prueba de preferencia a sacarosa. NAc: núcleo accumbens.



**Figura 23.** Imagen representativa de algunos de los sitios de infusión en animales sometidos a cirugía estereotáxica.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el programa *InfoStat* (versión 2020). En todos los casos, la distribución normal de las variables se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilks, mientras que la homogeneidad de varianzas se analizó por la prueba de Levene o la prueba F para igualdad de varianzas dependiendo de la cantidad de grupos a comparar (4 o 2 respectivamente).

Los datos resultantes de la evaluación conductual y los pesos fueron analizados empleando un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, con dieta y separación materna como variables independientes. Para analizar los valores obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos se realizó, adicionalmente, una prueba T para muestras apareadas a fin de determinar diferencias intragrupo en la exploración de cada objeto. La actividad locomotora evaluada en la primera fase de esta prueba conductual fue analizada empleando un ANOVA de dos vías (dieta x separación materna) para medidas repetidas. En todos los casos, posterior al ANOVA, se realizaron comparaciones *post-hoc* usando los test de Tukey o LSD-Fisher para determinar las diferencias significativas.

Los resultados obtenidos a partir de las cuantificaciones de los niveles proteicos de BDNF, TrkB y de la determinación de la densidad de espinas dendríticas, se analizaron mediante una prueba T para muestras independientes.

Finalmente, se empleó un ANOVA de dos vías, con dieta y tratamiento como variables independientes, para el análisis de los datos recopilados durante la evaluación de la reversión conductual. Las interacciones significativas se analizaron mediante el test de comparación *post-hoc* Tukey. Adicionalmente, se realizó un ANOVA de dos vías (dieta x tratamiento) para medidas repetidas, a fin de evaluar los datos experimentales obtenidos del consumo diario de sacarosa.

En todos los análisis realizados, valores de  $p < 0,05$  fueron considerados como estadísticamente significativos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media) de los valores obtenidos.

---

---

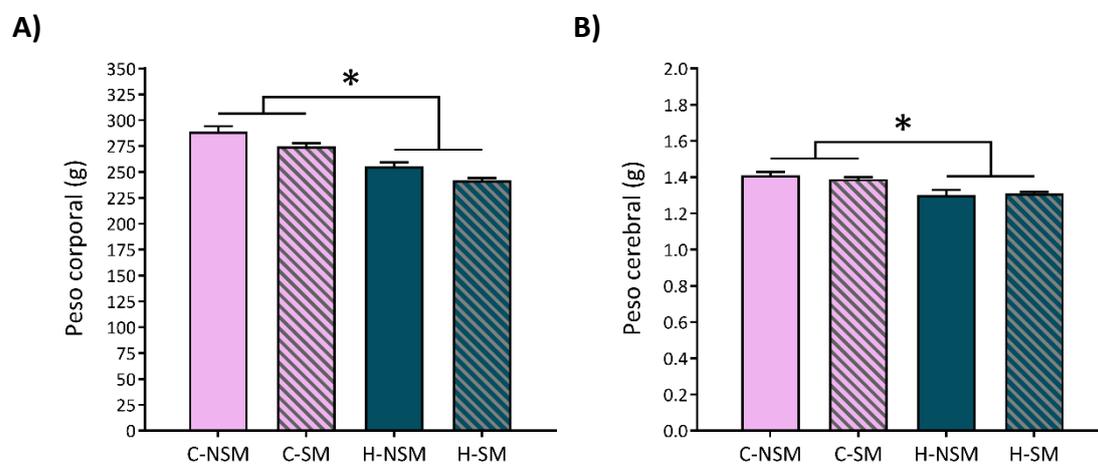
# *Resultados*

---

---

## Impacto de la hiponutrición proteica perinatal en el peso corporal y cerebral de animales de 70 días de edad

El análisis estadístico de los datos registrados reveló un efecto de la dieta en el peso corporal ( $F_{1,56} = 76,10$ ;  $p < 0,001$ ) y cerebral ( $F_{1,31} = 23,43$ ;  $p < 0,001$ ). La posterior comparación *post-hoc* de Tukey mostró disminución significativa tanto en el peso corporal ( $p < 0,01$ ) como en el peso del cerebro ( $p < 0,05$ ) de animales H en comparación con ratas C. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos NSM y SM ( $p > 0,05$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Efecto de la hiponutrición perinatal sobre el peso corporal (A) y cerebral (B) de ratas adultas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. **A)** \* $p < 0,01$  ( $n = 15$  animales por grupo). **B)** \* $p < 0,05$  ( $n = 8-9$  animales por grupo). C-NSM: control no expuesto a separación materna, C-SM: control sometido a separación materna, H-NSM: hiponutrido no expuesto a separación materna, H-SM: hiponutrido sometido a separación materna.

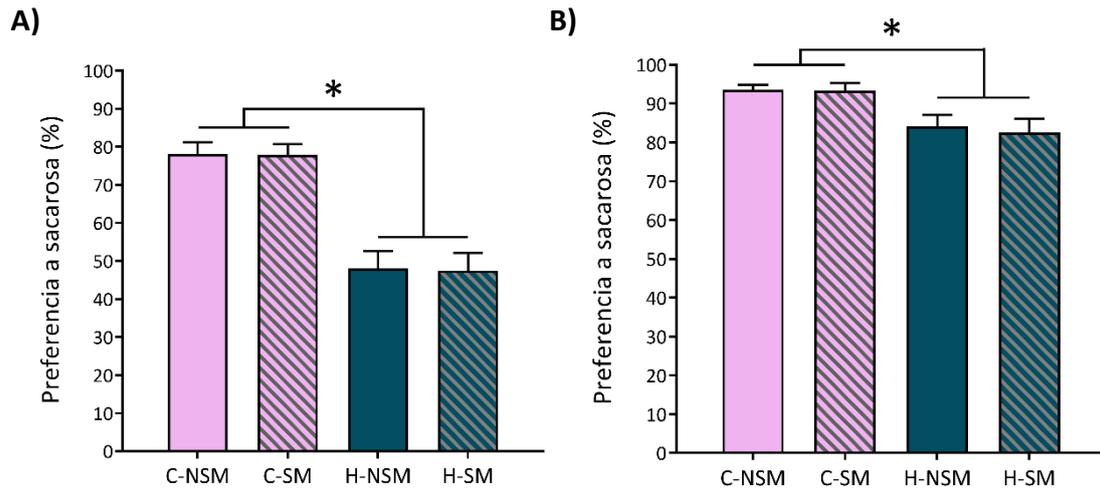
## Consecuencias conductuales de la hiponutrición proteica perinatal

### ➤ Prueba de preferencia a sacarosa

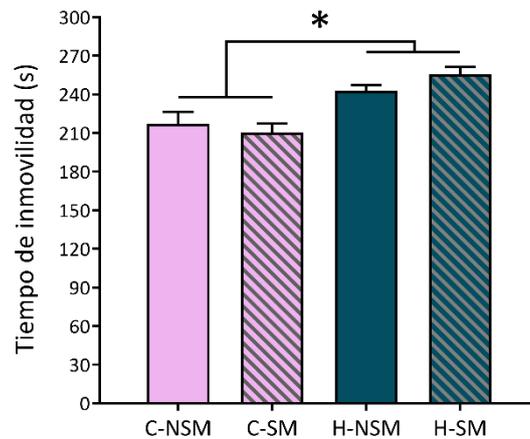
En la Figura 25 se encuentra representado el porcentaje de preferencia a sacarosa de los distintos grupos experimentales evaluados. Como se observa en la Figura 25 A, tras darle la opción a los animales de elegir entre agua y solución de sacarosa al 1%, sólo las ratas C (-NSM, -SM) mostraron preferencia por la sustancia palatable, alcanzando valores de aproximadamente un 78%. En contraste, los porcentajes de preferencia a sacarosa de los grupos H (-NSM, -SM) fueron cercanos a un 48%, indicando ausencia de preferencia por dicha solución. El ANOVA de estos datos reveló un efecto significativo de la dieta ( $F_{1,68} = 60,34$ ;  $p < 0,001$ ). El análisis *post-hoc* de Tukey indicó que tanto los animales hiponutridos sometidos a separación materna (H-SM) como los que no fueron separados de la madre (H-NSM), presentaron una preferencia a sacarosa significativamente menor en relación a los animales controles (-NSM, -SM) ( $p < 0,01$ ). Cuando los animales fueron expuestos a la solución de sacarosa de mayor concentración (5%), los cuatro grupos experimentales exhibieron un incremento en su índice de preferencia. En este punto resulta importante destacar el aumento del consumo de sacarosa de los grupos H (-NSM, -SM), con valores próximos a un 84% de preferencia. Sin embargo, el ANOVA realizado indicó un efecto significativo de la dieta ( $F_{1,35} = 13,65$ ;  $p < 0,001$ ) y el test *post-hoc* confirmó un porcentaje de preferencia a sacarosa significativamente menor en animales H (-NSM, -SM) respecto a los C (-NSM, -SM) ( $p < 0,05$ ) (Figura 25 B).

### ➤ Prueba de natación forzada

El análisis ANOVA de los datos de inmovilidad, obtenidos durante el test en la prueba de natación forzada, reveló un efecto significativo de la dieta ( $F_{1,50} = 21,69$ ;  $p < 0,001$ ). El test de comparación de Fisher mostró un incremento significativo en el tiempo de inmovilidad de los grupos H (-NSM, -SM) en relación a los C (-NSM, -SM) ( $p < 0,05$ ) (Figura 26).



**Figura 25.** Evaluación de la preferencia a sacarosa como índice de anhedonia. Los animales fueron desafiados a elegir entre agua y una solución de sacarosa al 1% (A) o 5% (B). Las barras representan la media  $\pm$  EEM del porcentaje del consumo de sacarosa respecto al consumo total de líquidos. **A)** \* $p < 0,01$  ( $n = 18$  ratas por grupo). **B)** \* $p < 0,05$  ( $n = 8-11$  ratas por grupo). C-NSM: control no expuesto a separación materna, C-SM: control sometido a separación materna, H-NSM: hiponutrido no expuesto a separación materna, H-SM: hiponutrido sometido a separación materna.



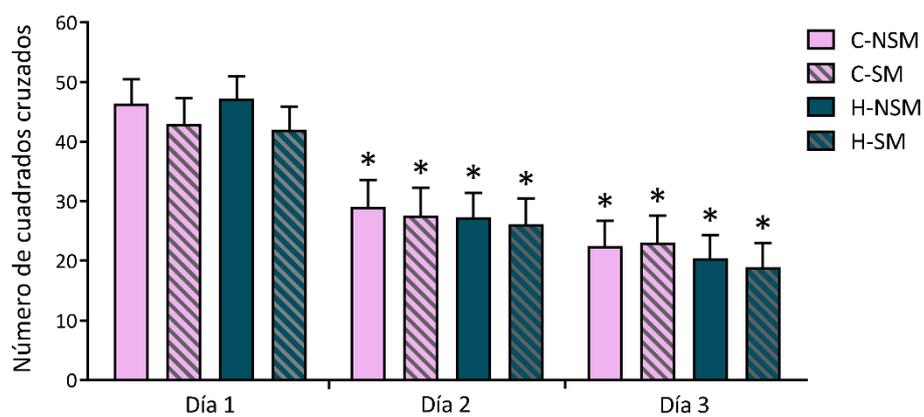
**Figura 26.** Tiempo de inmovilidad de ratas C (-NSM, -SM) y H (-NSM, -SM) evaluado durante la segunda sesión en la prueba de natación forzada. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  ( $n = 9-15$  animales por grupo). C-NSM: control no expuesto a separación materna, C-SM: control sometido a separación materna, H-NSM: hiponutrido no expuesto a separación materna, H-SM: hiponutrido sometido a separación materna.

### ➤ Prueba de reconocimiento de objetos

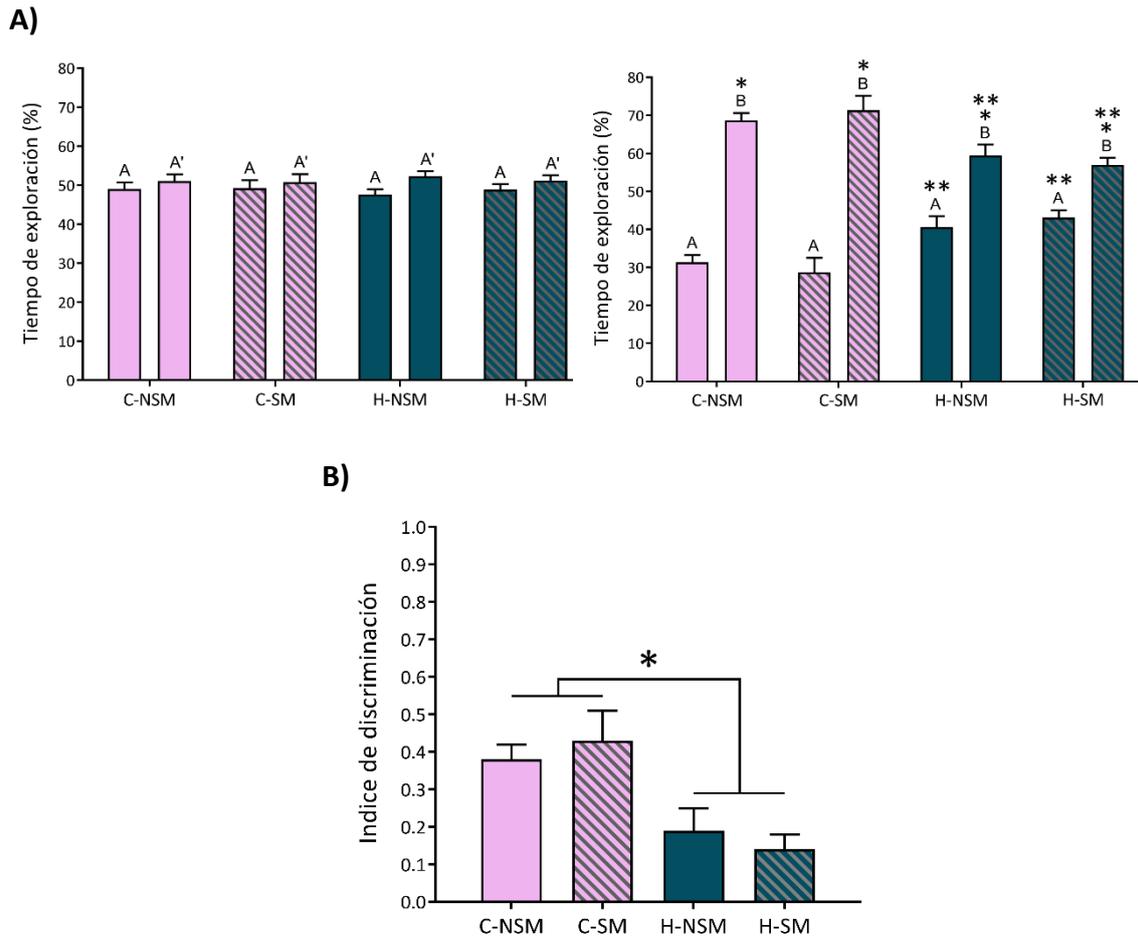
A fin de evaluar si la hiponutrición induce alteraciones a nivel cognitivo, animales de los diferentes grupos C y H fueron sometidos a la prueba de reconocimiento de objetos. En la Figura 27 se encuentran representados los valores de actividad locomotora

registrados durante la fase de habituación. Como puede observarse, todos los grupos desarrollaron el clásico fenómeno de habituación, evidenciado por una disminución en la conducta que se puso de manifiesto a partir del día 2 ( $F_{2,76} = 69,75$ ;  $p < 0,001$ ). No se observaron diferencias significativas en la locomoción entre los grupos analizados ( $F_{1,38} = 0,03$ ;  $p > 0,05$ ).

Durante la fase de entrenamiento, el porcentaje del tiempo de exploración de ambos objetos idénticos, denominados A y A', fue similar tanto en los grupos C (-NSM, -SM) como H (-NSM, -SM), con valores cercanos al 50% ( $F_{1,38} = 0,10$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 28 A). Durante la fase de discriminación los cuatro grupos experimentales mostraron un incremento significativo en el tiempo de exploración del objeto nuevo (objeto B) respecto al familiar (objeto A) (C-NSM:  $T = 9,79$ ;  $p < 0,001$ , C-SM:  $T = 6,17$ ;  $p < 0,001$ , H-NSM:  $T = 3,23$ ;  $p < 0,01$ , H-SM:  $T = 3,58$ ;  $p < 0,01$ ). No obstante, los animales H (-NSM, -SM) pasaron significativamente menos tiempo explorando el objeto nuevo en relación a los grupos C (-NMS, -SM) ( $F_{1,38} = 19,06$ ;  $p < 0,001$ ), lo que condujo a un índice de discriminación significativamente menor que el de los animales controles ( $F_{1,38} = 19,01$ ;  $p < 0,001$ ), como se muestra en las Figuras 28 A y B, respectivamente. En este último análisis, los valores positivos indican que los cuatro grupos experimentales fueron capaces de discriminar el objeto nuevo del familiar. No se observaron diferencias significativas entre los grupos NSM y SM.



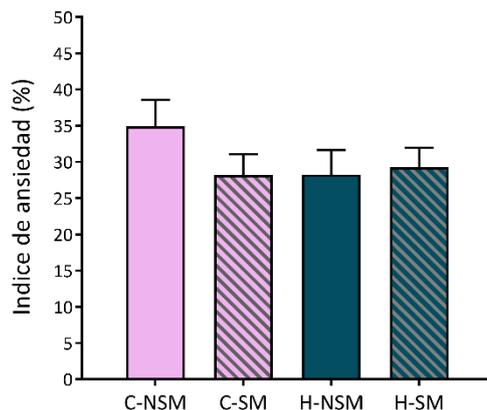
**Figura 27.** Actividad locomotora evaluada durante la fase de habituación de la prueba de reconocimiento de objetos. Las barras representan la media del número de cuadrados cruzados en el campo abierto  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  respecto al día 1 ( $n = 9-12$  animales por grupo). C-NSM: control no expuesto a separación materna, C-SM: control sometido a separación materna, H-NSM: hiponutrido no expuesto a separación materna, H-SM: hiponutrido sometido a separación materna.



**Figura 28.** Efecto de la injuria nutricional sobre la memoria de reconocimiento de objetos. **A)** Porcentaje del tiempo de exploración de cada objeto durante la fase de entrenamiento (panel de la izquierda) y la fase de discriminación (panel de la derecha). A-A' representan los objetos idénticos y B el objeto nuevo, empleados durante la prueba. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM. \* Indica diferencia significativa en el tiempo de exploración entre el objeto A y B. \*\* $p < 0,05$  vs. su respectivo grupo C (-NSM, -SM). **B)** Índice de discriminación obtenido durante la tercera fase de la prueba de reconocimiento de objetos. Las barras representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  ( $n = 9-12$  animales por grupo). C-NSM: control no expuesto a separación materna, C-SM: control sometido a separación materna, H-NSM: hiponutrido no expuesto a separación materna, H-SM: hiponutrido sometido a separación materna.

### ➤ *Laberinto en cruz elevado*

En la Figura 29, se muestran los resultados obtenidos luego de la evaluación de la conducta de ansiedad en el laberinto en cruz elevado. El análisis estadístico de los datos indicó que no existe diferencia significativa entre los grupos C (-NSM, -SM) y H (-NSM, -SM) en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos ( $F_{1,52} = 1,50$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 29.** Evaluación de la ansiedad en animales C (-NSM, -SM) y H (-NSM, -SM). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de los porcentajes del tiempo de permanencia en los brazos abiertos respecto al tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados ( $n= 12-15$  animales por grupo). C-NSM: control no expuesto a separación materna, C-SM: control sometido a separación materna, H-NSM: hiponutrido no expuesto a separación materna, H-SM: hiponutrido sometido a separación materna.

### **Resumen de los resultados del objetivo 1:**

Los resultados conductuales mostraron que los animales H, independientemente de la separación materna, presentaron una menor preferencia a sacarosa, tanto al 1% como al 5%, menor índice de discriminación en la prueba de reconocimiento de objetos y mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada. Es decir, la injuria nutricional temprana *per se* es capaz de facilitar conductas tipo depresivas en la edad adulta, incluyendo anhedonia, déficit cognitivo y conducta de desesperanza. No se observó efecto de la malnutrición en el índice de ansiedad ni en la locomoción entre los grupos C (-NSM, -SM) y H (-NSM, -SM).

Las evaluaciones en las secciones siguientes están dirigidas a investigar los posibles mecanismos neurobiológicos que subyacen a la anhedonia.

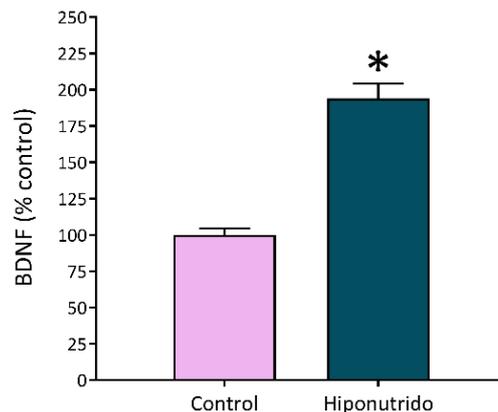
Considerando que no se observaron diferencias a nivel conductual entre animales H-NSM y H-SM, y entre animales C-NSM y C-SM, que la hiponutrición proteica perinatal *per se* incrementa el riesgo de desarrollar conducta anhedónica, y a fin de reducir el número de animales utilizados, en los experimentos próximos se emplearon sólo animales C-NSM y H-NSM (C y H respectivamente). Tal como se mencionó previamente en el apartado "Materiales y métodos".

## Participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en la facilitación de la anhedonia inducida por el déficit nutricional temprano

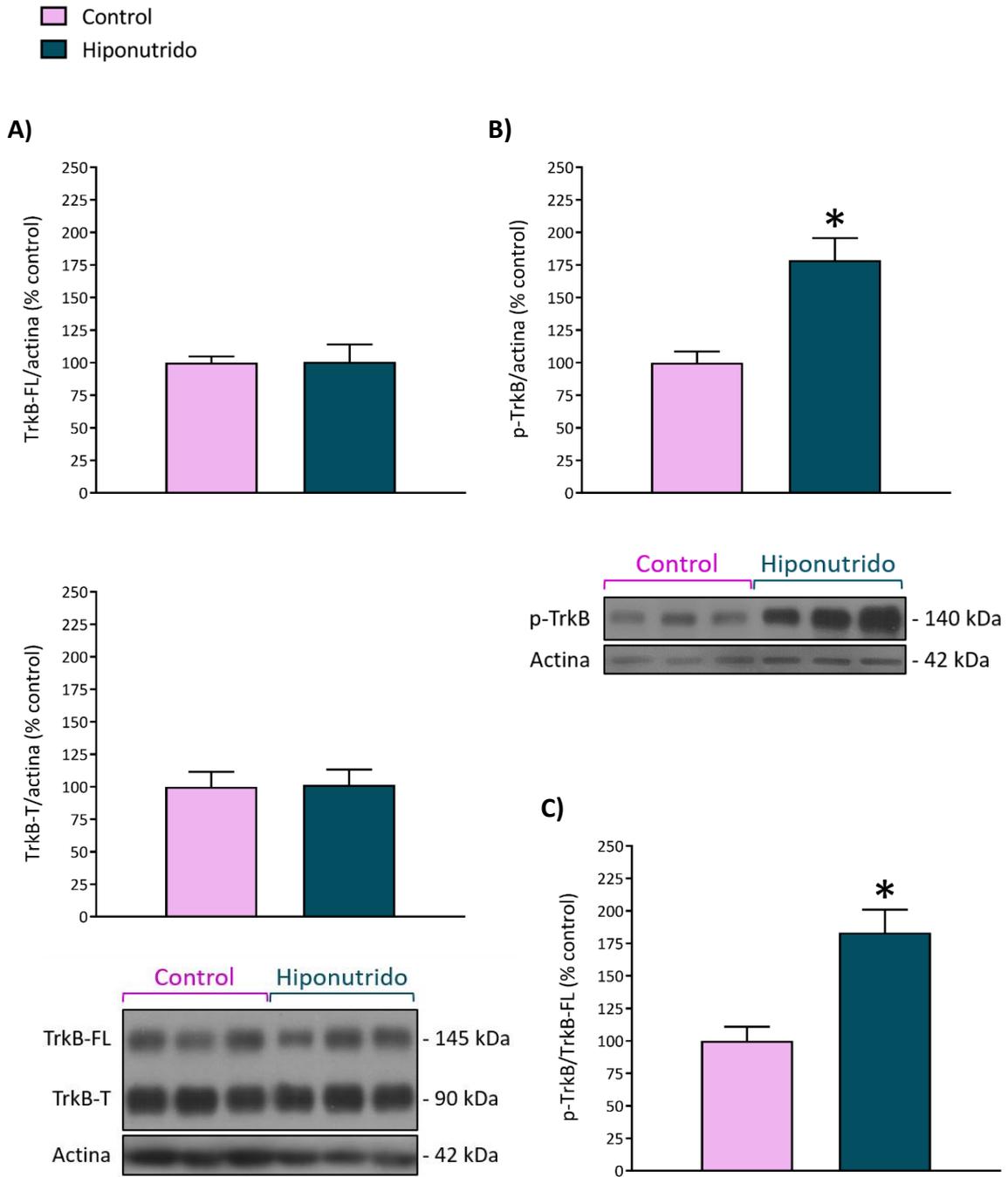
### ➤ Determinaciones en NAc

En la Figura 30 se muestra el efecto de la hiponutrición proteica perinatal sobre los niveles de BDNF en NAc, pudiendo observarse un incremento de aproximadamente un 90% en animales H respecto a los C. El análisis estadístico confirmó niveles significativamente mayores del factor neurotrófico en NAc de animales malnutridos en relación a los animales control ( $T = -8,43$ ;  $p < 0,001$ ).

En la Figura 31, se encuentran representados los niveles de las diferentes isoformas de TrkB en NAc de ambos grupos experimentales. Los hallazgos moleculares indicaron un incremento significativo en los niveles de p-TrkB en animales H en relación al grupo C ( $T = -4,13$ ;  $p < 0,01$ ), sin diferencias significativas entre los diferentes grupos en los niveles de TrkB-FL ( $T = -0,05$ ;  $p > 0,05$ ) y TrkB-T ( $T = -0,09$ ;  $p > 0,05$ ), tal como puede observarse en las Figuras 31 A y B. Del análisis de los resultados se desprende que la injuria nutricional temprana indujo un incremento significativo en la relación p-TrkB/TrkB-FL en NAc ( $T = -4,03$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 31 C). El incremento encontrado en los niveles de p-TrkB y de la relación p-TrkB/TrkB-FL en NAc de ratas H fue de alrededor de un 79% y 83%, respectivamente.



**Figura 30.** La hiponutrición proteica perinatal incrementa los niveles proteicos de BDNF en NAc. Los datos se expresan como porcentaje del grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,001$  vs. grupo C ( $n = 10$ ).

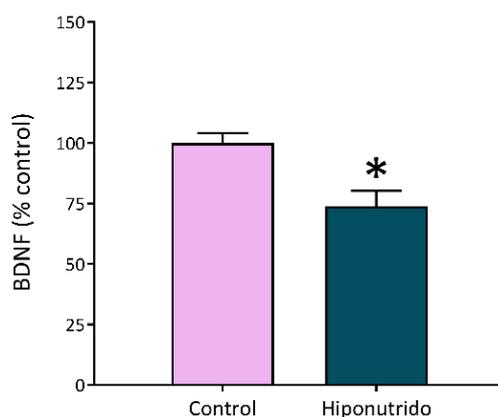


**Figura 31.** Determinación de los niveles de TrkB-FL, TrkB-T (A) y p-TrkB (B) en NAc de animales C y H. En cada panel se muestran bandas representativas de los análisis de western blot realizados. C) Niveles proteicos de p-TrkB relativo a los niveles de TrkB-FL. Los resultados se expresan como porcentaje del grupo control. Las barras representan la media ± EEM. \*p <0,01 vs. grupo C (n= 6).

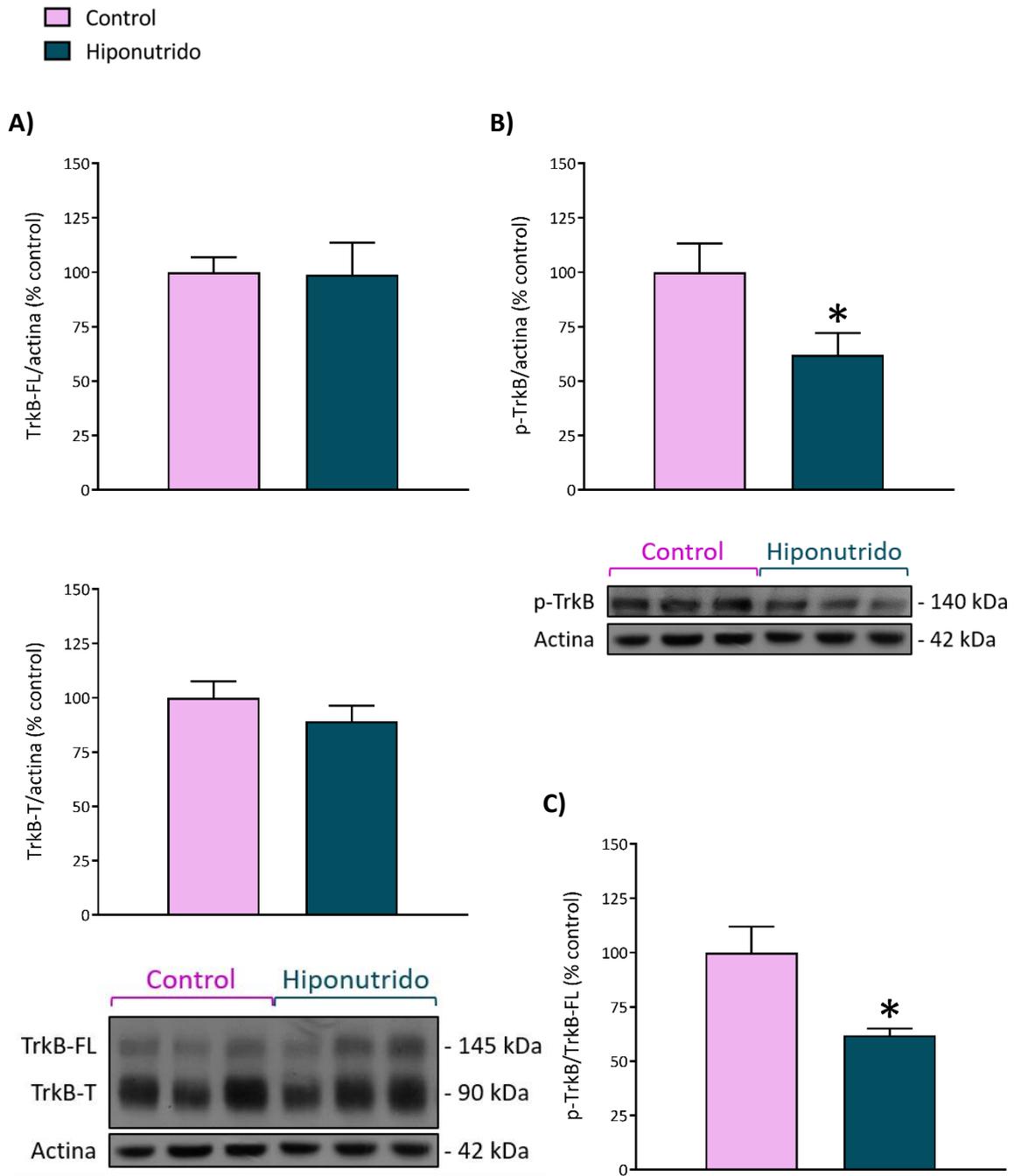
➤ *Determinaciones en hipocampo*

En las Figuras 32 y 33 se hallan representados los niveles de BDNF y de su receptor específico en hipocampo de animales C y H. La prueba T reveló que los niveles de BDNF en hipocampo de animales H fueron significativamente menores a los detectados en ratas C, pudiendo observarse una reducción cercana al 26% ( $T= 3,40$ ;  $p <0,01$ ) (Figura 32).

Como muestra la Figura 33 A, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos C y H ni en los niveles hipocampales de TrkB-FL ( $T= 0,06$ ;  $p >0,05$ ), ni en los niveles de TrkB-T ( $T= 1,02$ ;  $p >0,05$ ). Por otra parte, se observó que la injuria nutricional temprana disminuyó significativamente los niveles proteicos de p-TrkB ( $T= 2,33$ ;  $p <0,05$ ) y de la relación p-TrkB/TrkB-FL ( $T= 3,58$ ;  $p <0,01$ ), observándose una disminución de aproximadamente un 38% en hipocampo de animales H respecto a los C (Figura 33 B y C).



**Figura 32.** El déficit nutricional temprano disminuye los niveles proteicos de BDNF en hipocampo. Los valores se expresan como porcentaje del grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  EEM. \* $p <0,01$  en relación al grupo C ( $n= 10$ ).



**Figura 33.** Determinación de los niveles de TrkB-FL, TrkB-T (A) y p-TrkB (B) en hipocampo de animales C y H. En cada panel se muestran bandas representativas de los análisis de western blot realizados. C) Niveles proteicos de p-TrkB relativo a los niveles de TrkB-FL. Los resultados se expresan como porcentaje del grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  EEM. \*Indica diferencia significativa respecto al grupo C (n= 5-7).

***Resumen de los resultados del objetivo 2:***

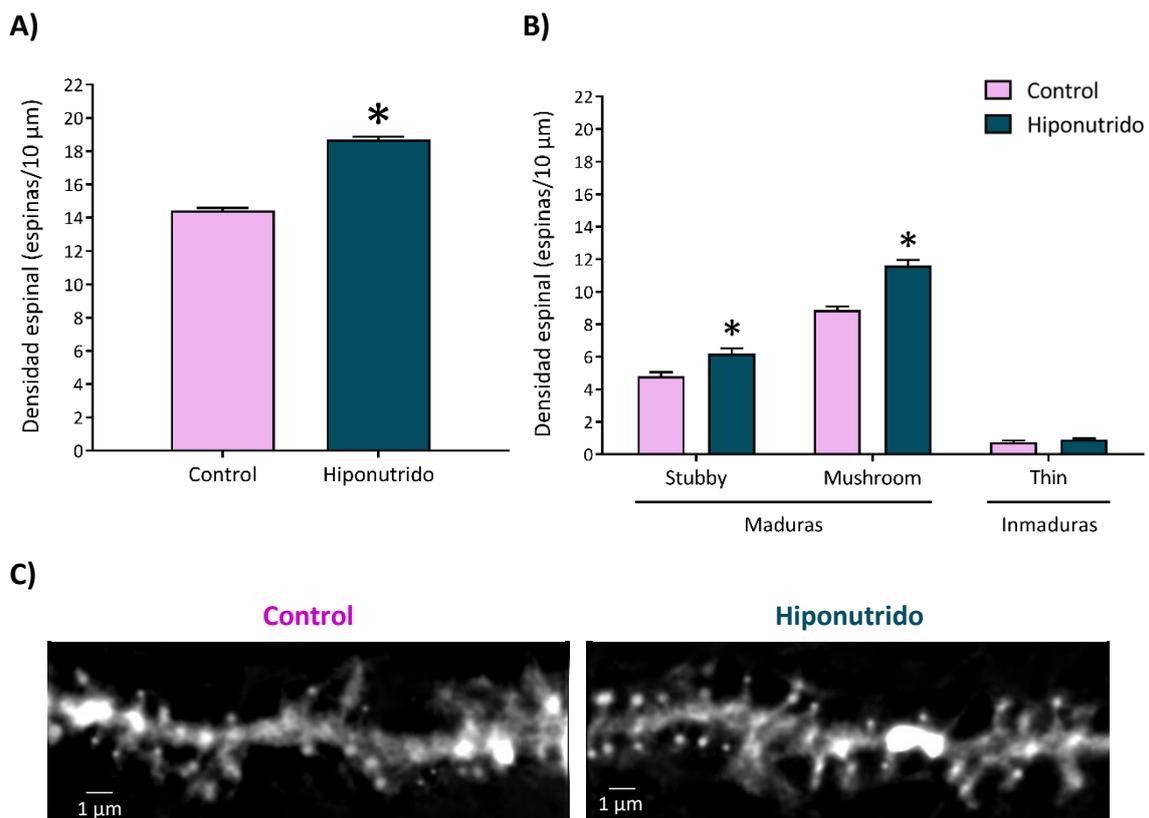
El estudio de la vía de señalización BDNF-TrkB, mostró en NAc de animales H un marcado incremento en los niveles de BDNF que cursan temporalmente con un aumento significativo de la forma activa de su receptor específico (p-TrkB). En contraste, estos animales presentaron niveles reducidos del factor neurotrófico y de p-TrkB en hipocampo. En conjunto, estos resultados indican que el déficit nutricional temprano induce alteraciones en la señalización BDNF-TrkB, cuyos efectos varían de acuerdo a la estructura analizada.

## Efecto de la injuria nutricional perinatal en la plasticidad estructural en NAc e hipocampo

### ➤ Evaluación de la densidad espinal en NAc shell

Como puede observarse en la Figura 34 A, el déficit nutricional temprano aumenta significativamente el número total de espinas dendríticas en NAc *shell* de animales H respecto al grupo C ( $T = -18,94$ ;  $p < 0,001$ ).

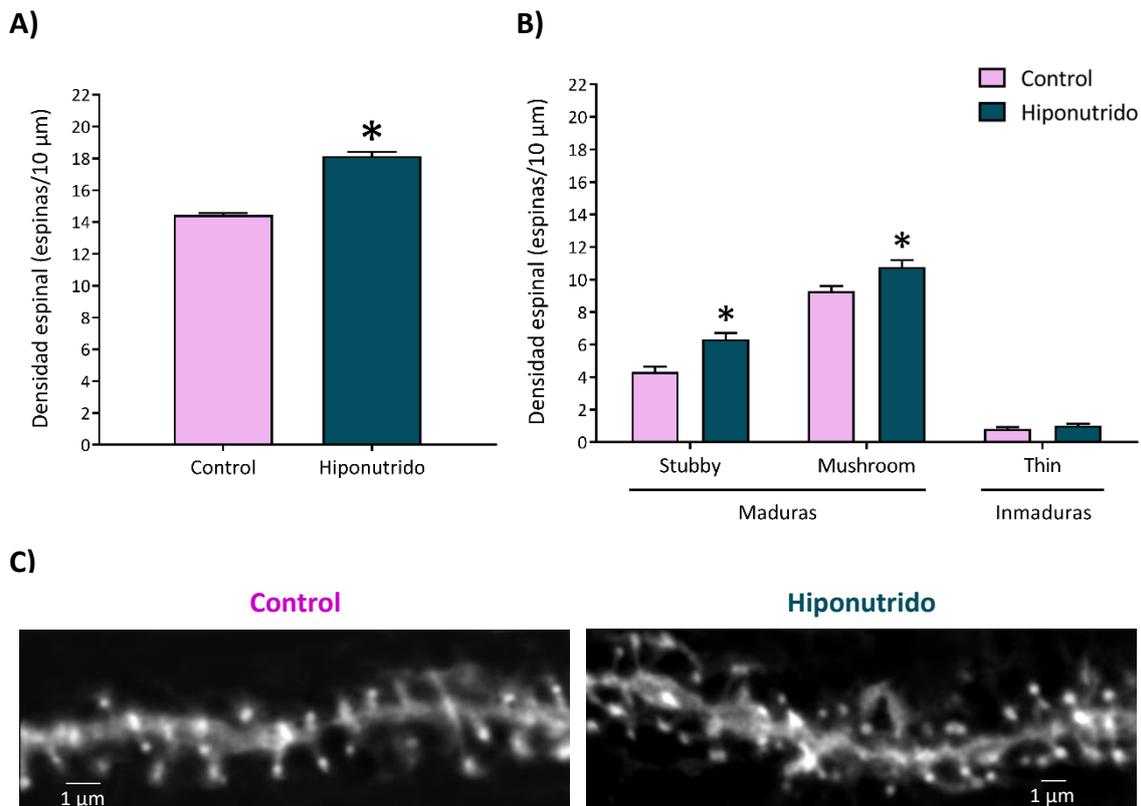
El posterior análisis del efecto de la malnutrición en la densidad de espinas dendríticas maduras e inmaduras indicó una densidad significativamente mayor de espinas dendríticas *stubby* y *mushroom* en animales H comparada con la densidad observada en ratas C (*stubby*:  $T = -3,31$ ;  $p < 0,01$ , *mushroom*:  $T = -6,65$ ;  $p < 0,001$ ). Respecto a las espinas *thin*, no se observó diferencia estadística en su densidad entre los grupos experimentales ( $T = -1,11$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 34 B).



**Figura 34.** El déficit nutricional altera la densidad espinal en NAc *shell*. **A)** Densidad total de espinas dendríticas. **B)** Densidad de espinas maduras (*stubby* y *mushroom*) e inmaduras (*thin*). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del número de espinas/10 μm de segmento dendrítico. \*Indica diferencia significativa respecto a los animales control (Grupo C: 14 segmentos dendríticos/ 404,11 μm de longitud dendrítica total analizada/ 3 ratas; Grupo H: 14 segmentos/ 402,92 μm/ 3 ratas). **C)** Imágenes representativas de segmentos dendríticos empleados en el análisis cuantitativo de espinas dendríticas en neuronas de NAc *shell* de animales C y H.

➤ *Evaluación de la densidad espinal en NAc core*

De manera similar a lo observado en NAc *shell*, el análisis estadístico reveló un incremento significativo en la densidad total de espinas dendríticas, específicamente en la densidad de espinas maduras en NAc *core* de animales H en comparación a los C (totales:  $T = -12,78$ ;  $p < 0,001$ , *stubby*;  $T = -4,02$ ;  $p < 0,001$ , *mushroom*;  $T = -2,82$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 35 A y B). No se detectó efecto de la hiponutrición proteica en la densidad de espinas dendríticas inmaduras ( $T = -1,40$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 35 B).

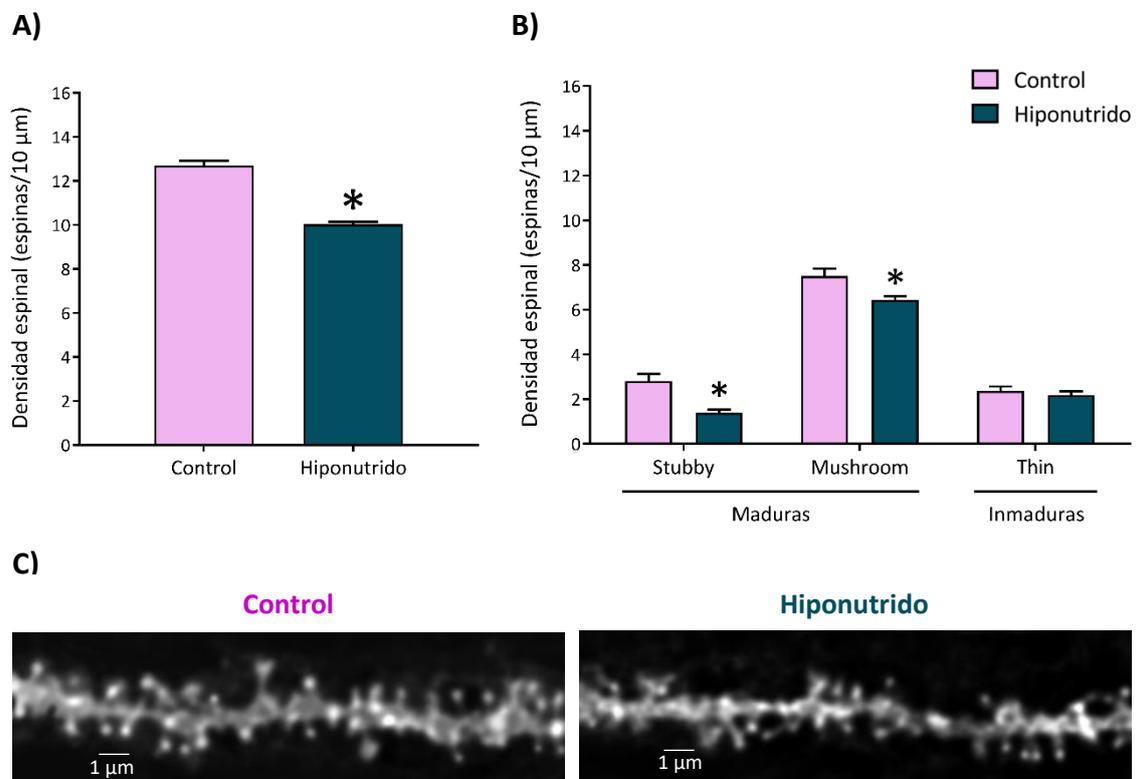


**Figura 35.** Efecto de la hiponutrición proteica perinatal en la densidad espinal en NAc *core*. **A)** Densidad total de espinas dendríticas. **B)** Densidad de espinas *stubby*, *mushroom* (maduras) y *thin* (inmaduras). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del número de espinas/10 μm de segmento dendrítico. \*Indica diferencia significativa respecto a los animales C (Grupo C: 13 segmentos dendríticos/ 428,40 μm de longitud dendrítica total analizada/ 3 ratas; Grupo H: 14 segmentos/ 432,34 μm/ 3 ratas). **C)** Ejemplos representativos de segmentos dendríticos empleados en el análisis cuantitativo de espinas dendríticas en neuronas de NAc *core* de animales C y H.

➤ *Evaluación de la densidad espinal en la región CA1 de hipocampo*

El análisis estadístico de la densidad total de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1, reveló que los animales H presentan menor número de espinas dendríticas en comparación al grupo C ( $T= 10,52$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 36 A).

La diferencia observada en la densidad total se evidenció particularmente en las espinas dendríticas maduras, en donde la prueba T estableció densidades significativamente menores de espinas *stubby* y *mushroom* en el grupo H respecto al C (*stubby*:  $T= 4,13$ ;  $p < 0,001$ , *mushroom*:  $T= 2,72$   $p < 0,01$ ). No se observó diferencia estadística entre ratas C y H en la densidad de espinas dendríticas *thin* ( $T= 0,75$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 36 B).



**Figura 36.** La injuria nutricional temprana altera la densidad espinal en neuronas hipocampales de CA1. **A)** Densidad total de espinas dendríticas. **B)** Densidad de espinas *stubby*, *mushroom* (maduras) y *thin* (inmaduras). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del número de espinas/10 μm de segmento dendrítico. \*Indica diferencia significativa respecto a los animales control (Grupo C: 25 segmentos dendríticos/ 605,16 μm de longitud dendrítica total analizada/ 3 ratas; Grupo H: 24 segmentos/ 697,72 μm/ 3 ratas). **C)** Ejemplos representativos de segmentos dendríticos de neuronas piramidales de CA1 empleados para el análisis cuantitativo de espinas dendríticas de cada grupo experimental.

**Resumen de los resultados del objetivo 3:**

La evaluación de la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del área CA1 de hipocampo y en MSN de NAc de animales C y H puso en evidencia alteraciones en la densidad de espinas dendríticas, particularmente de espinas maduras, consecuencia de la malnutrición. Mientras que, en NAc (*shell* y *core*) de animales anhedónicos se observó una mayor densidad espinal, en CA1 de hipocampo se encontró un menor número de espinas dendríticas. No se detectaron diferencias en el número de espinas inmaduras entre los grupos en ninguna de las áreas analizadas.

## **Estudio de la reversión de la anhedonia facilitada por la hiponutrición proteica perinatal**

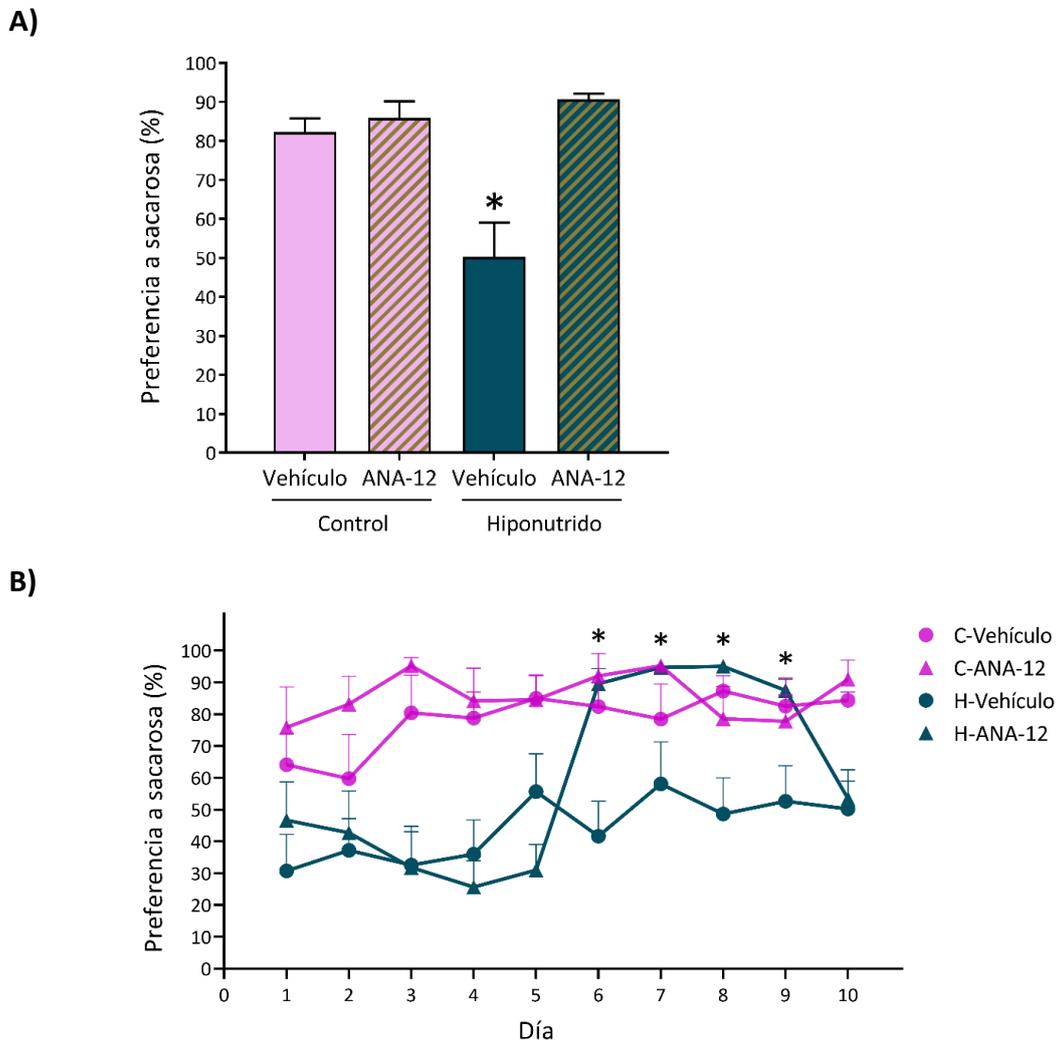
### ➤ *Efecto de la infusión de ANA-12 en NAc shell sobre la anhedonia inducida por el déficit nutricional temprano*

En la Figura 37 A se encuentra representada la preferencia a sacarosa observada en animales C y H luego de la infusión bilateral de ANA-12 o vehículo en NAc *shell*. Se puede observar que la preferencia a sacarosa alcanzó valores de aproximadamente un 82% y 85% para el grupo C-vehículo y C-ANA-12 respectivamente. Mientras que, los animales H-vehículo no mostraron preferencia por la sustancia palatable. La infusión bilateral de ANA-12 revirtió la conducta tipo depresiva en el grupo H. Estos animales mostraron un claro incremento en el consumo de la solución de sacarosa tras la administración intra-NAc *shell* del bloqueante selectivo de TrkB, observándose un índice de preferencia cercano a un 90%. El análisis estadístico reveló una interacción dieta x tratamiento significativa ( $F_{1,29} = 10,91$ ;  $p < 0,01$ ). La posterior comparación *post-hoc* de Tukey indicó que los animales H-vehículo presentaron una preferencia a sacarosa significativamente menor comparada con el resto de los grupos ( $p < 0,01$ ), confirmando un efecto antidepresivo de ANA-12 en NAc *shell* de ratas H. No se observaron diferencias significativas entre el grupo H-ANA-12 y los grupos C-vehículo y C-ANA-12. En la Figura 37 B se representa el porcentaje de preferencia a sacarosa medido diariamente. Los animales H-ANA-12 presentaron un incremento significativo de su índice de preferencia a partir del día 6 hasta el día 9 de evaluación, respecto a sus valores de consumo de los días 1 al 5 ( $F_{9,261} = 6,16$ ;  $p < 0,01$ ).

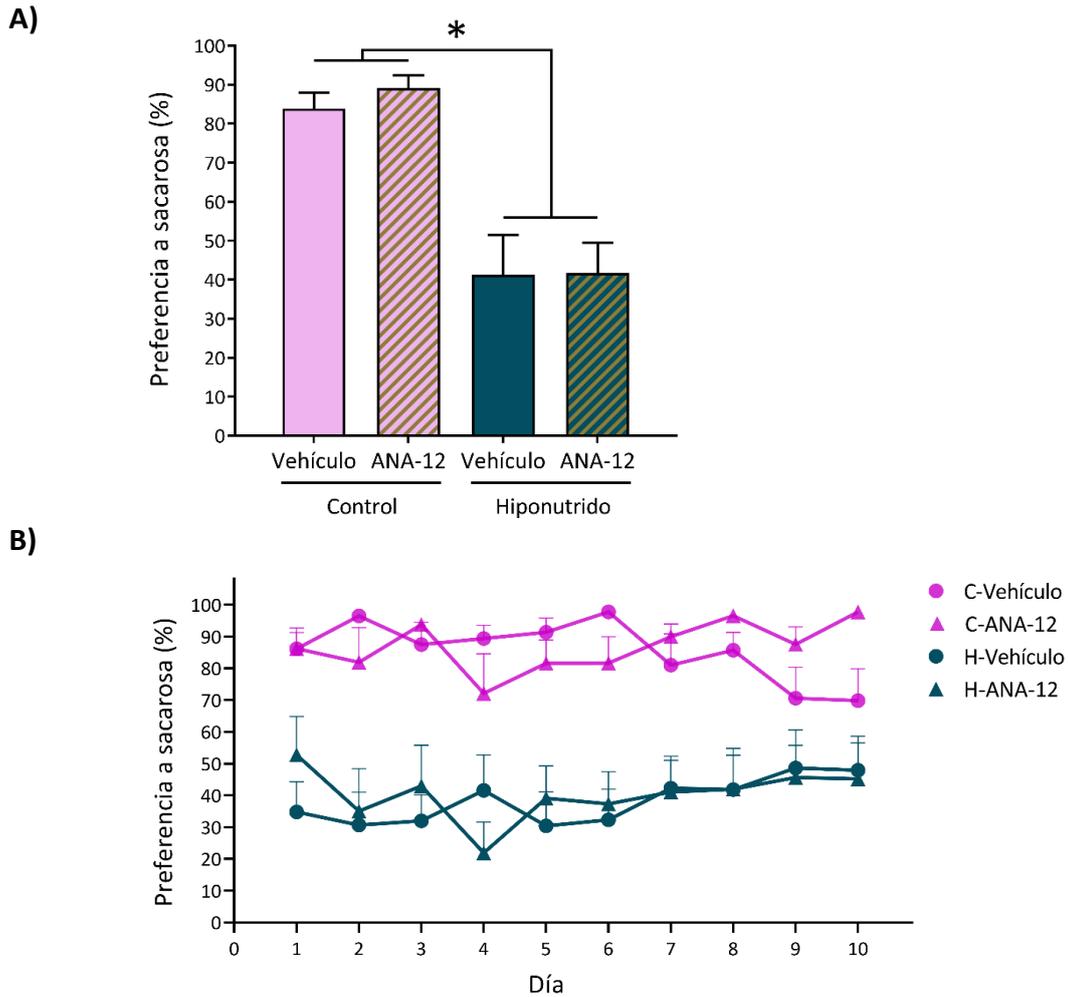
### ➤ *Efecto de la inyección local de ANA-12 en NAc core sobre la conducta anhedónica inducida por la injuria nutricional*

Luego de la infusión de vehículo o ANA-12 en NAc *core*, el patrón de consumo fue similar al informado previamente, en el cual los animales C muestran preferencia por el consumo de sacarosa y los animales H signos de anhedonia. El ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo de la dieta ( $F_{1,31} = 42,93$ ;  $p < 0,001$ ), y el análisis de comparaciones Tukey mostró que los grupos H administrados intra-NAc *core* con ANA-12 o vehículo mostraron una preferencia a sacarosa significativamente menor a la observada en los

grupos C-vehículo y C-ANA-12 ( $p < 0,01$ ) (Figura 38 A). No se observaron cambios significativos en el consumo diario luego de la administración de ANA-12 en ninguno de los grupos evaluados (Figura 38 B).



**Figura 37.** La infusión bilateral de ANA-12 en NAc *shell* revierte la conducta anhedónica, promoviendo un efecto antidepressivo. Las barras y los símbolos representan la media del porcentaje del consumo de sacarosa respecto al consumo total de líquidos  $\pm$  EEM. **A)** Porcentaje de preferencia a sacarosa luego de la infusión de ANA-12 o vehículo. \* $p < 0,01$  respecto al resto de los grupos. **B)** Evaluación diaria de la preferencia a sacarosa pre y post infusión de ANA-12. \* $p < 0,01$  grupo H-ANA-12 vs. sus respectivos valores de los días 1 al 5 ( $n = 8-9$  animales por grupo).

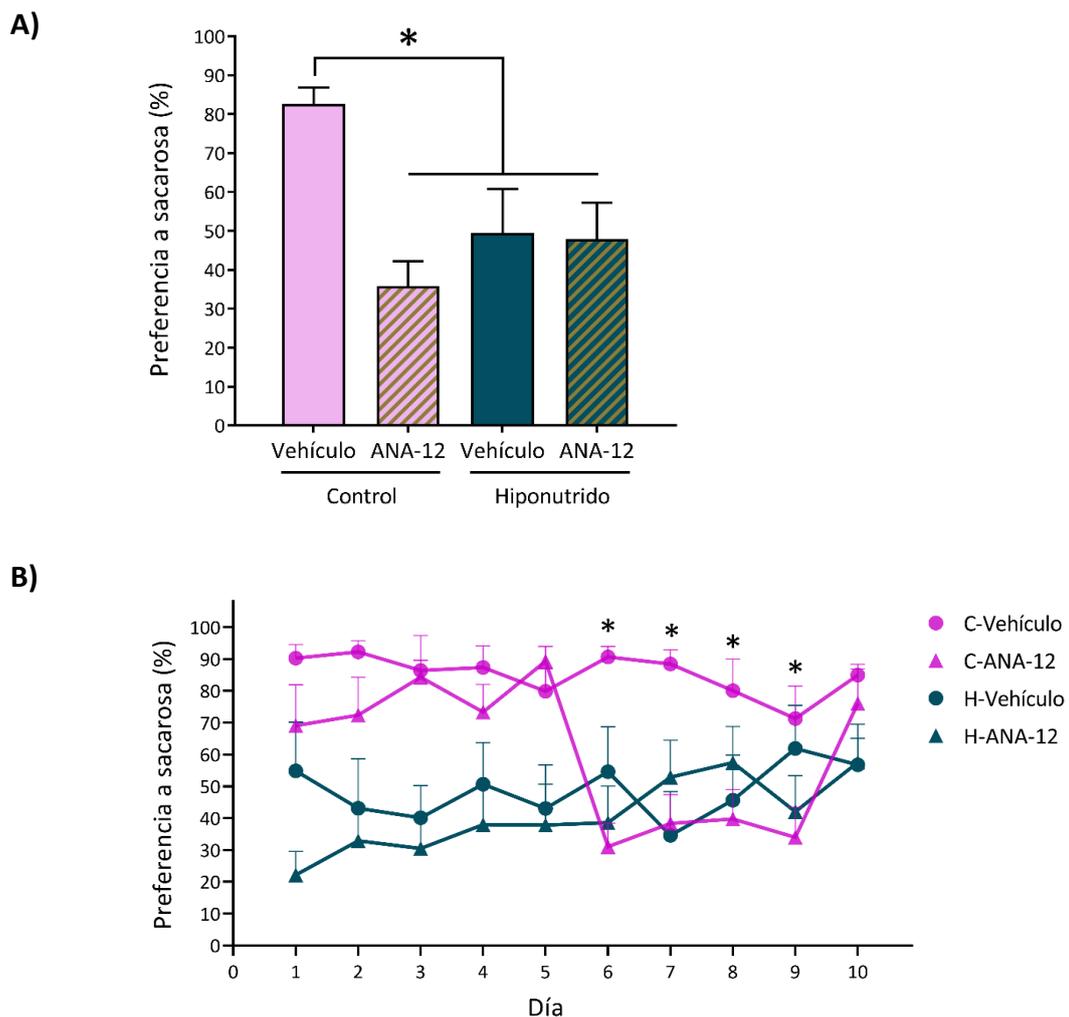


**Figura 38.** Preferencia a sacarosa evaluada luego de la infusión bilateral de ANA-12 o vehículo en NAc core. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de preferencia a sacarosa. **A)** Porcentaje de preferencia a sacarosa luego de la infusión de ANA-12 o vehículo. \* $p < 0,01$ . **B)** Evaluación diaria de la preferencia a sacarosa pre y post infusión de ANA-12 ( $n = 8-9$  animales por grupo).

➤ *Efecto de la administración de ANA-12 intra-CA1 de hipocampo en la prueba de preferencia a sacarosa*

En la Figura 39 A se representa el porcentaje de preferencia a sacarosa tras la infusión de ANA-12 o vehículo en área CA1 de animales C y H. Como puede observarse, independientemente del tratamiento administrado, las ratas H no mostraron preferencia por la solución de sacarosa. Respecto a los grupos C, mientras que los animales infundidos con vehículo presentaron aproximadamente un 83% de preferencia a sacarosa, la administración bilateral de ANA-12 indujo un efecto prodepresivo, disminuyendo significativamente el consumo de esta solución. Este último grupo alcanzó valores de preferencia por la solución palatable similares a los observados en

animales H. El análisis estadístico indicó una interacción dieta x tratamiento significativa ( $F_{1,30} = 7,47$ ;  $p < 0,05$ ) y el test *post-hoc* confirmó una diferencia significativa en la preferencia a sacarosa entre el grupo C-vehículo y el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ). En la Figura 39 B se representa el porcentaje de preferencia a sacarosa medido diariamente. Los animales C-ANA-12 presentaron una disminución significativa de su índice de preferencia a partir del día 6 hasta el día 9 de evaluación, respecto a sus valores de consumo de los días 1 al 5 ( $F_{9,135} = 5,18$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 39.** La infusión bilateral de ANA-12 en CA1 disminuye el consumo de sacarosa en animales controles. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje del consumo de sacarosa respecto al consumo total de líquidos. **A)** Porcentaje de preferencia a sacarosa luego de la infusión de ANA-12 o vehículo. \* $p < 0,05$ . **B)** Evaluación diaria de la preferencia a sacarosa pre y post infusión de ANA-12. \* $p < 0,01$  grupo C-ANA-12 vs. sus respectivos valores de los días 1 al 5 ( $n = 8-9$  ratas por grupo).

**Resumen de los resultados del objetivo 4:**

La infusión bilateral de ANA-12 produjo efectos diferenciales en la prueba de preferencia a sacarosa dependiendo la estructura blanco. Los resultados demostraron que la administración de ANA-12 en NAc *shell* revierte la anhedonia inducida por el déficit nutricional, al producir un incremento en el índice de preferencia por la solución de sacarosa al 1%. Este efecto antidepresivo, no se observó tras el bloqueo selectivo del receptor TrkB en NAc *core*. Finalmente, la inyección local de ANA-12 en CA1 fue capaz de inducir la conducta anhedónica en animales controles.

---

---

# *Discusión*

---

---

La desnutrición es un flagelo que afecta a millones de niños en las etapas más vulnerables del SNC, provocando consecuencias irreversibles que persisten en el individuo adulto. La malnutrición pre y/o postnatal afecta el desarrollo del cerebro y es considerada un factor importante en la patogenia de los trastornos psiquiátricos. En el presente estudio nos propusimos evaluar la posible relación entre la hiponutrición proteica perinatal y la vulnerabilidad a desórdenes depresivos en la edad adulta. A tal fin, estudiamos el impacto de la injuria nutricional temprana sobre parámetros conductuales asociados a síntomas depresivos, profundizando la búsqueda de los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la anhedonia.

## **Impacto de la malnutrición proteica perinatal en el peso corporal y cerebral de animales adultos**

De acuerdo con los resultados obtenidos, la disminución en el peso corporal y cerebral observada en animales adultos (70 días de edad) es una consecuencia directa de la deficiencia perinatal de proteínas. En este sentido, diversas evidencias experimentales indicaron una reducción significativa en el peso corporal y cerebral en roedores expuestos a hiponutrición proteica temprana <sup>(243-247)</sup>. Sumado a estos estudios, nuestro laboratorio reportó oportunamente que la injuria nutricional provoca una reducción significativa en el peso corporal y cerebral de animales evaluados al finalizar tanto el periodo de hiponutrición proteica como el periodo de recuperación nutricional. Resulta relevante destacar que la diferencia en el peso corporal y cerebral entre los animales controles e hiponutridos, disminuye luego de la recuperación nutricional respecto a la diferencia observada al finalizar el periodo de hiponutrición <sup>(248)</sup>.

En el presente trabajo observamos que los animales malnutridos fueron aproximadamente un 12% más livianos que los que recibieron una apropiada nutrición, indicando que la recuperación nutricional realizada no es suficiente para que los animales H alcancen los pesos controles. La disminución del peso corporal respalda la hipótesis planteada por Passos y *col.* <sup>(249)</sup> que sugiere que la regulación del peso corporal se determina durante las primeras etapas de la vida, específicamente durante la gestación y lactancia. De manera que el peso corporal en animales adultos dependería de las condiciones nutricionales impuestas en estos periodos. Se ha sugerido que la nutrición materna puede influir en el peso de las crías por medio de una impronta metabólica <sup>(249; 250)</sup>. En particular, las dietas bajas en proteínas han sido implicadas como importantes reguladoras de la programación, la cual genera adaptaciones metabólicas que conducen a cambios permanentes, inicialmente con el fin de garantizar la supervivencia <sup>(251-253)</sup>.

Adicionalmente, detectamos una reducción de aproximadamente un 7% en el peso cerebral de los animales malnutridos respecto al de las ratas control. Las evidencias en animales concuerdan con las observaciones realizadas en humanos, las cuales reportaron un peso cerebral reducido en niños malnutridos <sup>(54; 55; 254)</sup>.

La disminución del peso del cerebro reportada en ratas como secuela de la malnutrición temprana se ha asociado con un déficit significativo en el número de células cerebrales, probablemente al afectar principalmente el número de neuronas <sup>(255)</sup>. La cantidad de neuronas puede modificarse por alteraciones en el grado de proliferación y/o muerte celular <sup>(48)</sup>. La malnutrición puede causar una reducción del número total de células al interferir con la tasa de división celular <sup>(47)</sup>. A su vez, si bien durante el desarrollo del SNC ocurre el proceso fundamental y programado de muerte celular, la pérdida de células como resultado de una carencia nutricional representa un proceso patológico. La disminución celular puede conducir a proporciones alteradas de los distintos tipos de neuronas y de las relaciones neuronas/células gliales, lo cual puede finalmente conducir a alteraciones de las funciones cerebrales <sup>(48)</sup>. Este efecto deletéreo del insulto nutricional temprano sobre el número de células del cerebro y otros órganos es permanente, no pudiendo reestablecerse aún luego de una nutrición adecuada <sup>(47)</sup>. Por otra parte, observamos que la separación materna no influyó en los pesos corporales ni cerebrales en los diferentes grupos analizados.

## **Influencia de la hiponutrición proteica perinatal sobre el desarrollo de conductas tipo depresivas**

Los resultados obtenidos demostraron que la injuria nutricional perinatal facilita la aparición de conductas tipo depresivas en ratas adultas. Particularmente, observamos que el déficit proteico disminuye la preferencia a sacarosa, aumenta el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada y altera el rendimiento en la prueba de reconocimiento de objetos, sin inducir modificaciones en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado. En ninguno de los paradigmas conductuales utilizados encontramos diferencias entre los animales H-NSM y H-SM, indicando que el insulto nutricional temprano podría provocar modificaciones neuronales suficientes para promover las alteraciones conductuales observadas. La separación materna tampoco indujo cambios en los animales C. Si bien numerosos estudios indican que la separación repetida de las crías de su madre conduce a alteraciones conductuales tanto a corto como a largo plazo <sup>(256; 257)</sup>, en el presente trabajo y a fin de evaluar si el déficit nutricional incrementa la vulnerabilidad al desarrollo de depresión, empleamos un protocolo de separación materna que incluye menos días y/u horas que los usados frecuentemente para estudiar las consecuencias a largo plazo de eventos adversos tempranos <sup>(100; 218; 219)</sup>, por lo que resulta esperable la falta de diferencias entre animales C-NSM y C-SM.

Respecto a la evaluación de la ansiedad en animales hiponutridos, la literatura es controversial. Mientras diferentes autores reportaron una respuesta de tipo ansiosa en roedores expuestos a hiponutrición proteica perinatal <sup>(258-261)</sup>, otros investigadores informaron efecto ansiolítico como consecuencia de la malnutrición proteica prenatal y/o postnatal en animales adultos evaluados en el laberinto en cruz elevado <sup>(247; 262-265)</sup> y en el laberinto en T elevado <sup>(266-268)</sup>. El efecto ansiolítico, evidenciado por un mayor número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos, se asoció con una valoración de riesgo alterada consecuencia de alteraciones en hipocampo, las cuales podrían afectar la modulación de la inhibición del comportamiento <sup>(262; 264)</sup>. Por otra parte, Ferroni y *col.* <sup>(269)</sup> reportaron que ratones adultos expuestos a una dieta baja en proteínas en el período perinatal no mostraron diferencia en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado respecto al grupo control. En el

mismo sentido, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos C y H en el índice de ansiedad, sugiriendo que la hiponutrición perinatal, al menos bajo las condiciones experimentales empleadas en nuestro laboratorio no afecta la ansiedad. Las discrepancias en los resultados descritos por los distintos autores podrían deberse a diferencias en los protocolos de hiponutrición proteica empleados, a la especie animal utilizada y podrían adicionalmente responder a características específicas del género. Resulta relevante mencionar que, si bien hay un alto índice de comorbilidad entre desórdenes de ansiedad y depresión, ansiedad no define depresión y estos desórdenes no siempre ocurren de manera simultánea <sup>(270)</sup>. Incluso, aunque comparten ciertas estructuras cerebrales, los sustratos neurobiológicos que subyacen dichos desórdenes no son los mismos <sup>(271)</sup>.

Considerando que existe una alta prevalencia de síntomas cognitivos en pacientes depresivos, analizamos si el déficit proteico temprano es capaz de facilitar la aparición de alteraciones cognitivas en la edad adulta. Específicamente, evaluamos la memoria a corto plazo mediante la prueba de reconocimiento de objetos. Utilizando este paradigma, observamos que tanto los animales C como los H tienen la capacidad de reconocer, durante la fase de discriminación, un objeto desconocido en presencia de uno familiar. Sin embargo, la hiponutrición proteica indujo una menor exploración del objeto nuevo en comparación con el grupo C. Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura, los cuales demuestran que el déficit nutricional durante la gestación y la lactancia induce alteraciones cognitivas a largo plazo <sup>(245; 250; 272-274)</sup>. La baja preferencia por el objeto nuevo se considera como un indicativo de memoria de reconocimiento de objetos alterada <sup>(275)</sup>. Por otra parte, Perez-Garcia y col. <sup>(276)</sup> indicaron que animales malnutridos en etapa perinatal no son capaces de discriminar el objeto nuevo. Es importante mencionar que en este estudio se emplea un paradigma más complejo, ya que no sólo introduce un elemento desconocido sino que cambia la localización de los objetos respecto a las ubicaciones empleadas en la fase de entrenamiento. Adicionalmente, se ha demostrado deterioro en la atención, aprendizaje y memoria como consecuencia de la nutrición inadecuada en la prueba de cambio de set atencional, laberinto acuático de Morris, laberinto de Barnes y condicionamiento operante <sup>(244; 246; 247; 258; 277)</sup>.

Al evaluar el desempeño de los animales en la prueba de natación forzada, encontramos que la hiponutrición proteica induce un incremento en el tiempo de inmovilidad. Resultados similares fueron descritos por otros investigadores, tanto en hembras como en machos <sup>(260; 272; 278)</sup>. Es decir, los animales con restricción proteica responden de una manera más pasiva al ser expuestos a un estrés agudo y de corta duración. Sin embargo, Belluscio *y col.* <sup>(259)</sup> y Molina *y col.* <sup>(279)</sup> no encontraron diferencia en el tiempo de inmovilidad de animales machos malnutridos respecto al grupo control. Tal diferencia respecto a nuestro hallazgo podría explicarse por la especie animal empleada, la edad de los animales o bien por variaciones de los protocolos de hiponutrición utilizados. Porsolt *y col.* <sup>(280; 281)</sup> propusieron que la inmovilidad en la prueba de natación forzada, modelo ampliamente utilizado en la actualidad para evaluar conducta depresiva, indica que los animales aprenden que es imposible escapar de la situación estresante a la que son sometidos por lo que reducen su esfuerzo para intentarlo. De esta forma, interpreta a la inmovilidad como una expresión conductual de desesperanza. Alternativamente, surgieron otras hipótesis que plantean a la inmovilidad como una estrategia conductual pasiva positiva. Consideran el menor esfuerzo del animal como una estrategia de conservación de energía en un intento por prolongar la supervivencia. De manera que han sugerido que la inmovilidad es un comportamiento aprendido adaptativo que no representaría un estado de desesperanza <sup>(282-284)</sup>. Teniendo en cuenta que la malnutrición altera la capacidad de afrontar situaciones estresantes <sup>(90)</sup>, resulta menos probable un efecto protector, evidenciado por una mejor performance de los animales H en la prueba de natación forzada, según indicaría la hipótesis planteada por Molendijk y de Kloet <sup>(284)</sup>. Sin embargo, no hay consenso en la literatura respecto al significado de la inmovilidad y sigue siendo utilizada extensivamente para evaluar conducta depresiva. Teniendo presente que no se observaron diferencias en la actividad motora entre animales C y H, evaluada durante la fase de habituación en la prueba de reconocimiento de objetos, asumimos que el incremento del tiempo de inmovilidad en el grupo H refleja conducta depresiva, y que la misma no está asociada a capacidades motoras alteradas. Los resultados encontrados a nivel de locomoción coinciden con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio <sup>(69; 72)</sup> y por otros investigadores <sup>(250; 259; 260; 265; 276)</sup>, quienes no registraron efecto de la hiponutrición proteica perinatal sobre la actividad motora.

Un hallazgo conductual particularmente importante fue el encontrado durante la evaluación de la anhedonia. Durante la prueba de preferencia a sacarosa al 1% los animales hiponutridos no mostraron preferencia por la solución palatable, registrando un consumo similar de agua y sacarosa. En contraste, los animales control presentaron una marcada preferencia por la ingesta de sacarosa sobre la de agua. En nuestro conocimiento, sólo hay un estudio adicional reciente que demuestra que el déficit proteico temprano incrementa el riesgo de anhedonia en la edad adulta. Los autores reportaron disminución de interés hacia el consumo de sacarosa de ratas hiponutridas al ser comparados con el grupo control, no obstante, ambos grupos mostraron valores de preferencia mayores al 50% <sup>(247)</sup>. Probablemente, la diferencia respecto a nuestros resultados podría deberse al hecho que emplean una solución de sacarosa a una concentración superior; 2% respecto al 1% empleado en el presente trabajo.

A fin de descartar que la disminución en la preferencia a sacarosa en animales H sea debida a alteraciones en la capacidad del animal de distinguir el estímulo apetitivo, repetimos la prueba conductual empleando una concentración mayor de sacarosa (5%). En esta ocasión, independientemente del grupo analizado, todas las ratas exhibieron una elevada preferencia por la solución de sacarosa. Este resultado permite desestimar alteraciones en la palatabilidad inducidas por la hiponutrición perinatal, permitiendo asumir que la falta de preferencia a sacarosa observada con sacarosa 1% no es consecuencia de un déficit sensorial. Resulta interesante destacar que, aunque el índice de preferencia por la sacarosa aumentó con la solución al 5%, permaneció significativamente más bajo en los animales H respecto a los C. La literatura sugiere que las concentraciones óptimas de sacarosa para determinar presencia de anhedonia oscilan entre el 1% y el 2% <sup>(285)</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo aun utilizando una concentración superior a la empleada normalmente, seguimos observando la conducta anhedónica facilitada por la malnutrición proteica.

La evidencia obtenida demuestra los efectos negativos y duraderos de la hiponutrición proteica, cuando ocurre entre la segunda semana de gestación y el día postnatal 30, sobre la conducta de ratas adultas.

## **Participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en la anhedonia facilitada por el déficit proteico perinatal**

Teniendo presente la participación relevante de BDNF en la depresión, nos propusimos evaluar si la vía de señalización BDNF-TrkB en NAc e hipocampo, está involucrada en el desarrollo de la anhedonia facilitada por la injuria nutricional temprana. Las evaluaciones moleculares revelaron alteraciones inducidas por el déficit nutricional perinatal, donde animales hiponutridos que manifestaron signos de anhedonia presentaron un incremento en los niveles de BDNF y de la forma activa de su receptor específico (p-TrkB) en NAc, y una reducción de los mencionados parámetros en hipocampo.

### ➤ *Rol de la señalización BDNF-TrkB en NAc*

A nivel experimental se ha demostrado que dependiendo del tipo, intensidad y duración del estresor empleado, la actividad de las neuronas dopaminérgicas de ATV puede verse alterada diferencialmente <sup>(93; 286; 287)</sup>. Así, mientras la aplicación de un estrés fuerte o severo como el que produce la exposición a derrota social (CSDS) aumenta la tasa de disparo de neuronas dopaminérgicas ATV-NAc promoviendo la liberación de DA en NAc <sup>(204; 287-289)</sup>, la exposición crónica a un estresor más débil (CMS), disminuye el disparo de dichas neuronas <sup>(286; 290)</sup>. Discrepancias similares se han reportado al evaluar los niveles de BDNF en NAc tras la aplicación de estos estresores, demostrando que mientras el CMS no modifica los niveles de la neurotrofina <sup>(291; 292)</sup>, el CSDS <sup>(188; 203; 204; 293-295)</sup>, al igual que la administración de LPS <sup>(159)</sup> y la exposición a LH <sup>(161; 296)</sup>, induce un aumento significativo. Nuestros resultados van en concordancia con estas observaciones, ya que detectamos que la hiponutrición temprana es capaz de inducir un aumento en los niveles de BDNF en NAc inmediatamente finalizada la prueba de preferencia a sacarosa. El incremento de los niveles de BDNF estuvo asociado a una mayor activación de su receptor específico, ya que detectamos niveles superiores de TrkB fosforilado (p-TrkB) en animales H en relación al grupo C, con niveles comparables del receptor total (TrkB-FL y TrkB-T). La mayor activación del receptor podría conducir a un incremento de la actividad de moléculas de señalización intracelulares de TrkB en neuronas GABAérgicas MSN responsables de cambios neuroplásticos que precipiten la anhedonia en animales

H. En este sentido, ratones susceptibles al CSDS manifestaron niveles incrementados de Akt, GSK-3 $\beta$  y ERK1/2 fosforilados <sup>(204; 205)</sup>. Un blanco de la vía MAPK/ERK es el factor de transcripción CREB <sup>(297)</sup>, regulador de la expresión de proteínas involucradas en la plasticidad neuronal <sup>(298; 299)</sup>, cuya fosforilación y actividad se encuentra incrementada tras la exposición a estrés repetido <sup>(92)</sup>. Se ha reportado que la mayor actividad de CREB en NAc conduce a conductas tipo depresivas incluyendo desesperanza y anhedonia <sup>(298; 300)</sup>, contrario al efecto antidepresivo observado tras su silenciamiento viral.

Por otra parte, demostramos que la administración bilateral del bloqueante selectivo de TrkB en NAc *shell*, produce un marcado incremento en el índice de preferencia a sacarosa en animales H, revirtiendo la conducta depresiva inducida por la hiponutrición proteica perinatal. Este efecto antidepresivo no se observó luego de la infusión local de ANA-12 en NAc *core*, donde la administración del antagonista no indujo reversión de la conducta y en consecuencia los animales H mostraron una preferencia a sacarosa significativamente menor a la observada en los grupos C (-vehículo, -ANA-12). Estos resultados ponen en evidencia la participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en NAc *shell* en la expresión de la anhedonia inducida por el déficit nutricional temprano y están de acuerdo con los antecedentes que adjudican a NAc *shell* en el procesamiento del valor hedónico y motivacional y a NAc *core* en la modulación de la actividad motora y en la conducta dirigida a un objetivo <sup>(116; 120; 121)</sup>. Resultados similares fueron reportados por Ren y *col.* <sup>(301)</sup>, quienes observaron que durante la abstinencia a drogas de abuso la infusión de ANA-12 en *shell* reestablece el consumo de sacarosa, mientras que la administración en *core* no tiene efecto sobre la conducta.

En modelos animales de depresión, se ha observado que la administración repetida (i.p.) <sup>(159; 188; 301; 302)</sup> y la infusión bilateral de ANA-12 en NAc *shell* promueve efectos antidepresivos en las pruebas de natación forzada, escape condicionado, interacción social y preferencia a sacarosa <sup>(159; 296; 302; 303)</sup> y atenúa el incremento de la fosforilación de TrkB sin afectar los niveles de BDNF <sup>(159; 296; 301; 302)</sup>. En contraposición, la administración de ANA-12 en NAc *core* no indujo cambios en el tiempo de inmovilidad evaluado en la prueba de natación forzada <sup>(301)</sup>.

Es importante mencionar que la estimulación de la vía ATV-NAc facilita la liberación no sólo de DA sino también de BDNF <sup>(112; 205)</sup>. Krishnan y *col.* <sup>(204)</sup> demostraron que el aumento en los niveles de BDNF y de la señalización intracelular en NAc, observados

luego del CSDS, serían consecuencia del incremento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas proveniente de ATV, ya que la eliminación del gen BDNF en esta área bloquea el incremento de la neurotrofina en NAc. Lo interesante es que el antagonismo de los receptores de DA en NAc no previno las conductas anhedónicas inducidas por el CSDS, lo cual si fue posible luego del bloqueo del receptor TrkB en animales sometidos al estrés crónico <sup>(205)</sup>. Se ha postulado que DA no estaría relacionada con la percepción del placer o el impacto hedónico de un estímulo, sino más bien tendría un rol importante como codificador de los aspectos motivacionales involucrados en el procesamiento de recompensas <sup>(304-306)</sup>. Numerosos estudios mostraron que la disfunción de este neurotransmisor no es necesaria ni suficiente para el desarrollo de un déficit hedónico <sup>(304; 305; 307; 308)</sup>.

Teniendo presente trabajos previos de nuestro laboratorio que demostraron que la hiponutrición proteica perinatal induce alteraciones en la vía ATV-NAc <sup>(69-72; 309; 310)</sup>, se podría inferir que la injuria nutricional temprana podría modificar la actividad normal de las neuronas dopaminérgicas en ATV promoviendo el incremento de BDNF en NAc precipitando la aparición de anhedonia en animales H. No obstante, experimentos adicionales deben realizarse para demostrar que la hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas es responsable del incremento de BDNF en NAc.

➤ *Rol de la señalización BDNF-TrkB en hipocampo*

Es ampliamente conocido que la exposición a diferentes tipos de estrés crónico tales como CSDS, CMS, inmovilización, aislamiento social, separación materna entre otros, disminuye la expresión de BDNF <sup>(104; 311-313)</sup>, la fosforilación de TrkB <sup>(294; 296; 314)</sup> y la activación de moléculas de señalización intracelular de TrkB: Akt, mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex*), ERK1/2 y CREB en hipocampo <sup>(315-317)</sup>. En el mismo sentido, en el presente trabajo de tesis observamos una disminución en los niveles de BDNF hipocampal acompañada de una reducción en la activación de su receptor y en la relación p-TrkB/TrkB-FL como consecuencia de la injuria nutricional, inmediatamente después de finalizada la prueba de preferencia a sacarosa. Nuestros resultados están de acuerdo con los reportes que indican que el estado nutricional puede afectar la concentración de BDNF <sup>(244; 318-320)</sup> y con trabajos que indicaron menores niveles de BDNF y p-TrkB en GD y CA3 de hipocampo en distintos modelos de depresión <sup>(159; 161; 293-296; 314)</sup>

Por otra parte, se ha observado incremento en la expresión de BDNF en las distintas áreas de hipocampo, incluyendo GD, CA3 y CA1 luego de la administración crónica de diferentes tipos de antidepresivos <sup>(104; 312; 313; 321)</sup>, consistente con el curso temporal requerido para su acción terapéutica <sup>(313; 322)</sup>. Además, se ha descrito que la ablación de TrkB o la sobreexpresión de TrkB-T1 (el cual funciona como un antagonista de BDNF) en hipocampo bloquea la eficacia de los agentes antidepresivos <sup>(323; 324)</sup>. La fosforilación de TrkB como consecuencia de estos tratamientos activa cascadas de señalización intracelulares que conducen a la fosforilación de CREB <sup>(104; 312; 322)</sup>, apoyando la teoría de que la señalización BDNF-TrkB-CREB en hipocampo forma parte de los mecanismos terapéuticos de los antidepresivos.

En la misma línea, el aumento de la señalización de BDNF en hipocampo está asociado con conductas tipo antidepresivas en modelos animales de depresión, evidenciado como una reducción en el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada y en el número de fallas y latencia al escape en la prueba de escape condicionado del paradigma de LH, tras la infusión intracerebroventricular o en mesencéfalo de BDNF <sup>(192; 325)</sup> y luego de la inyección local en CA1, CA3 y GD <sup>(193; 299; 326; 327)</sup>. Shirayama y col. <sup>(193)</sup> reportaron que la inyección de BDNF en GD aumenta los niveles de p-ERK no sólo en esta área, sino que sus efectos se extendieron a CA3 y CA1. Por su parte, la administración del agonista selectivo del receptor TrkB, 7,8-dihidroxi-flavona (7,8-DHF) <sup>(328)</sup>, vía intraperitoneal o mediante infusión en GD y CA3, indujo efectos antidepresivos y fue capaz de normalizar la disminución de la fosforilación de TrkB inducida por LH o LPS, sin afectar los niveles de BDNF <sup>(159; 296)</sup>.

Si bien el hipocampo ha sido ampliamente estudiado en la patogénesis de la depresión, su participación en la expresión de la anhedonia ha sido menos explorada. Se ha reportado que mientras la reducción en la expresión de BDNF en GD induce conductas depresivas, entre ellas, anhedonia, la sobreexpresión o la inyección local de BDNF en GD reestablece el consumo de sacarosa de animales estresados, promoviendo un efecto antidepresivo <sup>(329-331)</sup>. En el presente trabajo, demostramos que la anhedonia inducida por la injuria nutricional temprana se asoció con niveles disminuidos de BDNF y p-TrkB en hipocampo comparados con animales C, los que mostraron una marcada preferencia por sacarosa. Luego de la administración de ANA-12 en CA1, el índice de preferencia disminuyó significativamente alcanzando valores similares a los observados en animales

H, poniendo en evidencia un efecto prodepresivo luego del bloqueo de receptores TrkB en animales C. La inducción del déficit hedónico tras el bloqueo de TrkB apoya la teoría de que la disminución de la señalización BDNF-TrkB está involucrada en el desarrollo de conductas tipo depresivas. No obstante, son necesarios experimentos adicionales empleando la infusión local de BDNF en hipocampo para confirmar su participación en el desarrollo de la anhedonia facilitada por la hiponutrición perinatal.

## **Impacto de la hiponutrición proteica perinatal en la densidad espinal de neuronas de NAc e hipocampales**

Los análisis morfológicos revelaron un incremento significativo en la densidad de espinas dendríticas totales en ambas subestructuras de NAc (*shell* y *core*) y una menor densidad en CA1 en animales hiponutridos que presentaron signos de anhedonia. Las modificaciones en la plasticidad estructural se pusieron de manifiesto mediante alteraciones en la densidad de espinas dendríticas maduras (*stubby* y *mushroom*). Nuestros resultados coinciden con la literatura que indica un incremento en la densidad total de espinas dendríticas en NAc, tanto en *shell* como en *core*, y una reducción de este parámetro en hipocampo, específicamente en CA3 y GD, tras la exposición a LPS (159; 314; 332), derrota social (293; 295; 333), estrés leve e impredecible (334; 335) y *shocks* eléctricos en las patas (161). Respecto a CA1 los hallazgos son más controversiales, si bien los estudios recién mencionados informan ausencia de modificaciones en la densidad espinal de las neuronas piramidales de esta área, otros investigadores reportan una disminución en la cantidad de espinas totales como consecuencia del estrés repetido (327; 336-340). Diversas razones pueden justificar estas diferencias, incluyendo el tipo y edad del animal empleado, el tipo y duración del estrés aplicado, la selección de la región analizada (dorsal o ventral), la posición a lo largo de la dendrita y la metodología empleada para la cuantificación de las espinas dendríticas (341). En NAc, se ha propuesto que los cambios estructurales podrían ser específicos del subtipo celular, habiéndose reportado ausencia de modificaciones en la densidad total de espinas dendríticas en D1-MSN y un incremento en las D2-MSN luego del estrés de derrota social (342; 343).

La morfología de las espinas es un determinante importante de la fuerza de la transmisión sináptica, por lo que es relevante, además de la densidad espinal, considerar este parámetro (342; 344). El tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas es proporcional al tamaño de su densidad postsináptica, número de receptores de glutamato y fuerza sináptica (344; 345). En función de estas características, las espinas maduras son más estables y forman sinapsis más fuertes que las espinas inmaduras (160; 344; 346; 347). Se ha propuesto que alteraciones en la proporción relativa de las mismas pueden afectar la excitabilidad, función sináptica, plasticidad y las conexiones de los circuitos neuronales (174; 340). Al provocar una disminución en la densidad de espinas maduras en CA1, la

hiponutrición disminuye la capacidad de la neurona de formar conexiones fuertes y estables. De esta manera, las neuronas afectadas pasarían a ser menos efectivas en los circuitos de los que forman parte. Por otro lado, la alteración en la cantidad de espinas maduras tanto en hipocampo como en NAc, podrían afectar procesos de plasticidad funcional y contribuir a la alteración del comportamiento hedónico. Estudios adicionales son necesarios para entender las implicancias funcionales de los cambios espinales observados. No obstante, podemos hipotetizar que la pérdida y el incremento de las espinas dendríticas maduras en hipocampo y NAc, respectivamente, impactarían en la actividad de las neuronas piramidales de CA1 y de las MSN. Esto podría afectar la comunicación con otras estructuras y el funcionalismo del circuito neuronal de la depresión, promoviendo el desarrollo de conductas tipo depresivas.

En nuestro conocimiento, los hallazgos encontrados en el presente trabajo de tesis a nivel de NAc son las primeras evidencias del impacto de la hiponutrición proteica sobre la densidad y morfología espinal. En relación a hipocampo, nuestros resultados son consistentes con lo reportado por otros investigadores que muestran que el déficit nutricional durante etapas tempranas induce alteraciones estructurales persistentes, incluyendo una disminución en el número de espinas, neuronas, sinapsis y arborización dendrítica <sup>(49; 278; 348; 349)</sup>.

Es importante considerar que cambios en la plasticidad neuronal, tanto a nivel funcional como morfológico pueden verse influidos por modificaciones en la expresión de factores tróficos <sup>(350)</sup>. Como se mencionara anteriormente, BDNF ha sido implicado en numerosos procesos de plasticidad neuronal estructural y funcional <sup>(351)</sup> y se ha propuesto un rol clave de la señalización BDNF-TrkB en la modulación de los cambios dendríticos <sup>(160; 174; 333)</sup>. Así, estudios *in vitro* <sup>(228; 351-354)</sup> e *in vivo* <sup>(159; 301; 327; 355-357)</sup> han reportado que, mientras BDNF induce un incremento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales de CA1, el bloqueo de su señalización mediada por TrkB la reduce. Se ha demostrado que el incremento en la densidad espinal inducida por BDNF requiere la activación de la cascada de señalización MAPK/ERK y de la cascada PLCγ que activa los canales TRPC3 (*transient receptor potential canonical*) <sup>(358; 359)</sup>. Algunos autores también han asociado a CREB con la pérdida o incremento de espinas dendríticas inducida por el estrés crónico <sup>(174; 360)</sup>, ya que se ha observado que su activación puede conducir a la síntesis de enzimas y proteínas involucradas en la plasticidad estructural <sup>(95)</sup>.

La infancia es un período de refinamiento estructural masivo a nivel de la arborización y espinas dendríticas, de enorme importancia para lograr circuitos sinápticos adaptables y de funcionamiento apropiado <sup>(361)</sup>. Un soporte neurotrófico inadecuado durante el desarrollo podría conducir a una desorganización estructural en el cerebro y a una capacidad adaptativa del mismo reducida para responder adecuadamente ante estímulos apetitivos <sup>(176)</sup>. Por lo tanto, resulta lógico que la injuria proteica perinatal al alterar los niveles de BDNF y su receptor fosforilado en NAc e hipocampo, afecte blancos de señalización intracelulares que finalmente conduzcan a modificaciones en la plasticidad estructural, específicamente en la densidad de espinas dendríticas. No obstante, se deben desarrollar futuras evaluaciones para identificar los mecanismos moleculares específicos que subyacen a las alteraciones en la densidad espinal observadas en animales H anhedónicos.

Considerando que existen interacciones recíprocas entre hipocampo, NAc y ATV<sup>(362)</sup>, los cambios inducidos por la hiponutrición a nivel de las distintas estructuras podrían alterar el funcionamiento del área afectada y de aquellas con las que establece conexión. Varios autores han descrito una transmisión sináptica excitatoria alterada de hipocampo a NAc de animales anhedónicos, con discrepancias en los resultados obtenidos, probablemente a causa del estrés empleado<sup>(215-217)</sup>. Mientras Pignatelli y col.<sup>(217)</sup> reportaron una mayor fuerza de las sinapsis excitatorias de hipocampo ventral a las D1-MSN luego de repetidos *shocks* eléctricos en las patas, LeGates y col.<sup>(215)</sup> informaron que el CMS reduce dicha fuerza desde hipocampo dorsal. Otros estudios describieron que el *input* sináptico excitatorio se incrementa sólo en D2-MSN y se debilita en D1-MSN tras el CSDS y CRS, sin determinar el origen de la aferencia glutamatérgica<sup>(363; 364)</sup>. La mayor activación de las D2-MSN podría inhibir la actividad de las neuronas en pálido ventral, resultando en la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas en ATV<sup>(365)</sup>, contribuyendo así posiblemente a la mayor liberación de BDNF en NAc. A este efecto podría contribuir a su vez la menor actividad de las D1-MSN que proyecten directamente a neuronas dopaminérgicas de ATV.

Caracterizar la relación funcional entre hipocampo, NAc y ATV proporcionaría una línea base para comenzar a comprender cómo estas redes se ven afectadas a causa de la injuria nutricional y de qué forma contribuyen a la facilitación de la aparición de conductas tipo depresivas. La normalización de la actividad de BDNF podría conducir a una apropiada regulación de la plasticidad neuronal, reestableciéndose la actividad neuronal y reorganizándose los contactos sinápticos. La conectividad adecuada entre las distintas estructuras normalizaría el funcionamiento de las áreas afectadas conduciendo a un efecto antidepresivo.

La depresión es un trastorno complejo en el que se ven afectadas distintas estructuras cerebrales, seguramente otras áreas contribuyen al desarrollo de la anhedonia al interactuar con hipocampo y/o NAc. A partir de los resultados obtenidos, podemos afirmar que el insulto nutricional altera la señalización BDNF-TrkB con efectos opuestos en NAc e hipocampo, y que dichas modificaciones contribuyen al desarrollo del déficit hedónico observado.

---

---

# *Conclusión*

---

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis contribuyen al conocimiento de las bases neurobiológicas implicadas en la facilitación del desarrollo de desórdenes psiquiátricos en edad adulta, particularmente en la vulnerabilidad a la depresión y aporta evidencia adicional a estudios previos de nuestro laboratorio que demostraron que el déficit nutricional durante etapas tempranas de la vida induce una desregulación a nivel de la vía ATV-NAc responsable de modificaciones en la conducta relacionadas con el placer y la recompensa. En particular, demostramos la participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en la facilitación de anhedonia inducida por el déficit nutricional temprano.

Considerando que la presencia de anhedonia ha sido propuesta como un predictor de respuesta deficiente al tratamiento farmacológico de la depresión, una mayor comprensión de los mecanismos neuronales involucrados en los procesos que producen alteraciones conductuales, podría contribuir a la elucidación de pautas farmacoterapéuticas adecuadas para el tratamiento de la depresión en individuos adultos con antecedentes de desnutrición infantil.

Nuestros hallazgos enfatizan la vulnerabilidad del SNC al déficit de proteínas durante la gestación y la lactancia sugiriendo que individuos que padecieron malnutrición temprana tendrían un riesgo incrementado al desarrollo de anhedonia y depresión en la edad adulta.

El conocimiento y difusión de las consecuencias devastadoras de la desnutrición infantil, a nivel individual y social, podría ayudar a la visibilización de la problemática y al desarrollo de estrategias públicas de prevención e intervención.

*"Tenemos que terminar con la eterna guerra del hombre contra el hombre, e iniciar todos juntos la única guerra que vale la pena, la única en la que todos ganamos: la guerra del HOMBRE contra el HAMBRE"*

Dr. Abel Albino

---

---

# *Bibliografia*

---

---

1. Declaración Universal de Derechos Humanos (1948). [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/derechoshumanos\\_publicaciones\\_colecciond ebolsillo\\_03\\_declaracion\\_universal\\_ddhh.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/derechoshumanos_publicaciones_colecciond ebolsillo_03_declaracion_universal_ddhh.pdf)
2. Wisbaum W (2011) *La desnutrición infantil: Causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento*. Madrid, España: punto&coma.
3. Convención sobre los derechos del niño (1989). En Argentina: Ley 23849/1990. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-23849-249/texto>
4. Batool R, Butt MS, Sultan MT *et al.* (2015) Protein-energy malnutrition: a risk factor for various ailments. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**, 242-253.
5. Ibrahim MK, Zambruni M, Melby CL *et al.* (2017) Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. *Clin Microbiol Rev* **30**, 919-971.
6. Comunicación D, UNICEF (2012) *Glosario de nutrición. Un recurso para comunicadores* Nueva York: UNICEF.
7. Ngo J, Ortiz-Andrellucchi A, Serra-Majem L (2016) Malnutrition: Concept, Classification and Magnitude. In *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 610-630 [B Caballero, PM Finglas and F Toldrá, editors]: Academic Press.
8. OMS (2021) Malnutrición. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>
9. UNICEF (2019) *Niños, alimentos y nutrición: crecer bien en un mundo en transformación*. Nueva York: UNICEF.
10. Garg A, Mehra V, Torlesse H *et al.* (2021) *Fed to Fail? The Crisis of Children's Diets in Early Life*. New York: UNICEF.
11. Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson U *et al.* (2012) *Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención*. Roma: FAO.
12. Victora CG, Christian P, Vidaletti LP *et al.* (2021) Revisiting maternal and child undernutrition in low-income and middle-income countries: variable progress towards an unfinished agenda. *Lancet* **397**, 1388-1399.
13. Henry CJ (2019) What Children Eat in Developing Countries: Diet in the Etiology of Undernutrition? *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* **91**, 43-53.
14. Latham M (2002) Malnutrición proteinoenergética. In *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*, pp. 135-154. Roma: FAO.
15. Dipasquale V, Cucinotta U, Romano C (2020) Acute Malnutrition in Children: Pathophysiology, Clinical Effects and Treatment. *Nutrients* **12**, 1-9.
16. Grover Z, Ee LC (2009) Protein energy malnutrition. *Pediatr Clin North Am* **56**, 1055-1068.
17. Caprile S, Nahmías F, Quintanilla MV *et al.* (2018) *Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe*. Santiago: FAO, OPS, WFP y UNICEF.
18. Mariam S (2005) Nutritive value of three potential complementary foods based on cereals and legumes. *African Journal of Food and Nutritional Sciences* **5**, 1-14.
19. Gomez-Martin M, Herrero-Morin D, Arboleya S *et al.* (2022) Early Life Nutrition and the Role of Complementary Feeding on Later Adherence to the Mediterranean Diet in Children up to 3 Years of Age. *Nutrients* **14**, 1-14.
20. Darmon N, Drewnowski A (2015) Contribution of food prices and diet cost to socioeconomic disparities in diet quality and health: a systematic review and analysis. *Nutr Rev* **73**, 643-660.
21. Black RE, Victora CG, Walker SP *et al.* (2013) Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* **382**, 427-451.
22. Hayashi C, Krusevec J, Kumapley R *et al.* (2021) *Levels and trends in child malnutrition*. New York: UNICEF, WHO and the World Bank Group.
23. Begué C, Olalla JEC, Drake I *et al.* (2019) *2° Encuesta Nacional de Nutrición y Salud*. Argentina: Ministerio de salud y desarrollo social.
24. Headey D, Heidkamp R, Osendarp S *et al.* (2020) Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *Lancet* **396**, 519-521.

25. Salvia A (2021) Informe de avance: crisis del empleo, pobreza de ingreso y privaciones sociales estructurales, Argentina urbana 2010-2021. Argentina: Universidad Católica Argentina. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/13219>
26. IHME (2019) Global Health Data Exchange. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation. <https://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/d780dffbe8a381b25e1416884959e88b>
27. Márquez A, Aufgang FR, Lonatti L *et al.* (2021) Malnutrición infantil en comedores comunitarios de Argentina (2021). Argentina: Instituto de Investigación Social, Económica y política Ciudadana (ISEPCI). <https://mapa.poblaciones.org/map/84601>
28. OMS (2013) *Plan de acción sobre salud mental 2013-2020*. Suiza: OMS.
29. WHO (2022) *World mental health report: Transforming mental health for all*. Geneva, Switzerland: WHO.
30. American PA (1995) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. Washington, D.C.: American Psychiatric Publishing.
31. American PA (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-V*. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
32. OPS (2017) *Depresión y otros trastornos mentales comunes. Estimaciones sanitarias mundiales*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
33. OMS (2021) Depresión. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
34. Santomauro DF, Herrera AMM, Shadid J *et al.* (2021) Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Lancet* **398**, 1700-1712.
35. Smil V (1999) China's great famine: 40 years later. *BMJ* **319**, 1619-1621.
36. St Clair D, Xu M, Wang P *et al.* (2005) Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA* **294**, 557-562.
37. Susser E, Hoek HW, Brown A (1998) Neurodevelopmental disorders after prenatal famine: The story of the Dutch Famine Study. *Am J Epidemiol* **147**, 213-216.
38. Franzek EJ, Sprangers N, Janssens AC *et al.* (2008) Prenatal exposure to the 1944-45 Dutch 'hunger winter' and addiction later in life. *Addiction* **103**, 433-438.
39. Susser ES, Lin SP (1992) Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. *Arch Gen Psychiatry* **49**, 983-988.
40. Susser E, Neugebauer R, Hoek HW *et al.* (1996) Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry* **53**, 25-31.
41. Neugebauer R, Hoek HW, Susser E (1999) Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA* **282**, 455-462.
42. Brown AS, van Os J, Driessens C *et al.* (2000) Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am J Psychiatry* **157**, 190-195.
43. Stein AD, Pierik FH, Verrips GH *et al.* (2009) Maternal exposure to the Dutch famine before conception and during pregnancy: quality of life and depressive symptoms in adult offspring. *Epidemiology* **20**, 909-915.
44. Galler JR, Bryce CP, Waber D *et al.* (2010) Early childhood malnutrition predicts depressive symptoms at ages 11-17. *J Child Psychol Psychiatry* **51**, 789-798.
45. Waber DP, Eaglesfield D, Fitzmaurice GM *et al.* (2011) Cognitive impairment as a mediator in the developmental pathway from infant malnutrition to adolescent depressive symptoms in Barbadian youth. *J Dev Behav Pediatr* **32**, 225-232.
46. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML *et al.* (2013) Malnutrition in the first year of life and personality at age 40. *J Child Psychol Psychiatry* **54**, 911-919.
47. Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD *et al.* (1992) Malnutrition and the Developing Central Nervous System. In *The Vulnerable Brain and Environmental Risks, Volume I: Malnutrition and Hazard Assessment*, pp. 3-44 [RL Isaacson and KF Jensen, editors]. New York: Plenum Press.

48. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J *et al.* (1993) Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* **17**, 91-128.
49. Alamy M, Bengelloun WA (2012) Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neurosci Biobehav Rev* **36**, 1463-1480.
50. Dobbing J (1971) Vulnerable periods of brain development. In: lipids, malnutrition & the developing brain. *Ciba Found Symp*, 9-29.
51. Martin HP (1973) Nutrition: its relationship to children's physical, mental, and emotional development. *Am J Clin Nutr* **26**, 766-775.
52. Chopra JS, Sharma A (1992) Protein energy malnutrition and the nervous system. *J Neurol Sci* **110**, 8-20.
53. Grantham-McGregor S (1995) A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *J Nutr* **125**, 2233S-2238S.
54. Galler JR, Barrett LR (2001) Children and famine: long-term impact on development. *Ambulatory Child Health* **7**, 85-95.
55. Chase HP, Canosa CA, Dabiere CS *et al.* (1974) Postnatal undernutrition and human brain development. *J Ment Defic Res* **18**, 355-366.
56. Ortiz-Andrellucchi A, Quintana LP, Beñacar AA *et al.* (2006) Desnutrición infantil, salud y pobreza: intervención desde un programa integral. *Nutr Hosp* **21**, 533-541.
57. Galler JR, Ramsey F, Solimano G *et al.* (1983) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development I. Degree of impairment in intellectual performance. *J Am Acad Child Psychiatry* **22**, 8-15.
58. Galler JR, Ramsey F, Solimano G *et al.* (1983) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development II. Classroom behavior. *J Am Acad Child Psychiatry* **22**, 16-22.
59. Galler JR, Ramsey F, Solimano G (1984) The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development III. Learning disabilities as a sequel to malnutrition. *Pediatr Res* **18**, 309-313.
60. Galler JR, Ramsey FC, Forde V *et al.* (1987) Long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus II. Intellectual performance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **6**, 847-854.
61. Galler JR, Ramsey F (1989) A follow-up study of the influence of early malnutrition on development: behavior at home and at school. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **28**, 254-261.
62. Galler JR, Ramsey FC, Morley DS *et al.* (1990) The long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus IV. Performance on the national high school entrance examination. *Pediatr Res* **28**, 235-239.
63. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML *et al.* (2012) Infant malnutrition is associated with persisting attention deficits in middle adulthood. *J Nutr* **142**, 788-794.
64. Waber DP, Bryce CP, Girard JM *et al.* (2014) Impaired IQ and academic skills in adults who experienced moderate to severe infantile malnutrition: a 40-year study. *Nutr Neurosci* **17**, 58-64.
65. Georgieff MK (2007) Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr* **85**, 614S-620S.
66. Rakic P (1975) Cell migration and neuronal ectopias in the brain. *Birth Defects Orig Artic Ser* **11**, 95-129.
67. Levitsky DA, Strupp BJ (1995) Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr* **125**, 2212S-2220S.
68. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR (1996) Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* **20**, 389-402.
69. Valdomero A, Isoardi NA, Orsingher OA *et al.* (2005) Pharmacological reactivity to cocaine in adult rats undernourished at perinatal age: behavioral and neurochemical correlates. *Neuropharmacology* **48**, 538-546.

70. Valdomero A, Bussolino DF, Orsingher OA *et al.* (2006) Perinatal protein malnutrition enhances rewarding cocaine properties in adult rats. *Neuroscience* **137**, 221-229.
71. Valdomero A, Velazquez EE, de Olmos S *et al.* (2007) Increased rewarding properties of morphine in perinatally protein-malnourished rats. *Neuroscience* **150**, 449-458.
72. Velazquez EE, Valdomero A, Orsingher OA *et al.* (2010) Perinatal undernutrition facilitates morphine sensitization and cross-sensitization to cocaine in adult rats: a behavioral and neurochemical study. *Neuroscience* **165**, 475-484.
73. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 471-483.
74. Tonkiss J, Galler J, Morgane PJ *et al.* (1993) Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. *Ann NY Acad Sci* **678**, 215-227.
75. Fava M, Kendler KS (2000) Major depressive disorder. *Neuron* **28**, 335-341.
76. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ *et al.* (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* **34**, 13-25.
77. Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* **32**, 1073-1086.
78. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ *et al.* (2005) Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**, 1214-1224.
79. Willner P, Scheel-Kruger J, Belzung C (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev* **37**, 2331-2371.
80. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE *et al.* (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* **301**, 386-389.
81. Filatova EV, Shadrina MI, Slominsky PA (2021) Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes. *Cells* **10**, 1-29.
82. Kendler KS, Bulik CM, Silberg J *et al.* (2000) Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women: an epidemiological and cotwin control analysis. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 953-959.
83. Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* **49**, 1023-1039.
84. Penza KM, Heim C, Nemeroff CB (2003) Neurobiological effects of childhood abuse: implications for the pathophysiology of depression and anxiety. *Arch Womens Ment Health* **6**, 15-22.
85. Chapman DP, Whitfield CL, Felitti VJ *et al.* (2004) Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *J Affect Disord* **82**, 217-225.
86. Teicher MH, Samson JA, Polcari A *et al.* (2009) Length of time between onset of childhood sexual abuse and emergence of depression in a young adult sample: a retrospective clinical report. *J Clin Psychiatry* **70**, 684-691.
87. Dean J, Keshavan M (2017) The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr* **27**, 101-111.
88. Levitsky DA, Barnes RH (1970) Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli. *Nature* **225**, 468-469.
89. Nasif FJ, Ramirez OA, Cuadra GR *et al.* (2001) Increased neuronal activity in locus coeruleus from adult rats undernourished at perinatal age: its reversal by desipramine. *Life Sci* **69**, 2551-2559.
90. Keller EA, Rey AV, Kademian S *et al.* (2000) Perinatal Undernutrition Modifies the Immobility Behavior Induced by Forced Swim: Neuroendocrine Correlates. *Nutritional Neuroscience* **3**, 283-292.
91. Grantham-McGregor SM, Walker SP, Chang S (2000) Nutritional deficiencies and later behavioural development. *Proc Nutr Soc* **59**, 47-54.
92. Russo SJ, Nestler EJ (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* **14**, 609-625.
93. Koo JW, Chaudhury D, Han MH *et al.* (2019) Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Depression. *Biol Psychiatry* **86**, 738-748.

94. Song J, Kim YK (2021) Animal models for the study of depressive disorder. *CNS Neurosci Ther* **27**, 633-642.
95. Andrade C, Rao NS (2010) How antidepressant drugs act: A primer on neuroplasticity as the eventual mediator of antidepressant efficacy. *Indian J Psychiatry* **52**, 378-386.
96. Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM *et al.* (2008) Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* **61**, 106-112.
97. Vetulani J (2013) Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep* **65**, 1451-1461.
98. Frye CA, Wawrzycki J (2003) Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Horm Behav* **44**, 319-326.
99. Salari AA, Fatehi-Gharehlar L, Motayagheni N *et al.* (2016) Fluoxetine normalizes the effects of prenatal maternal stress on depression- and anxiety-like behaviors in mouse dams and male offspring. *Behav Brain Res* **311**, 354-367.
100. Lukkes JL, Meda S, Thompson BS *et al.* (2017) Early life stress and later peer distress on depressive behavior in adolescent female rats: Effects of a novel intervention on GABA and D2 receptors. *Behav Brain Res* **330**, 37-45.
101. Masrouf FF, Peeri M, Azarbayjani MA *et al.* (2018) Voluntary Exercise During Adolescence Mitigated Negative the Effects of Maternal Separation Stress on the Depressive-Like Behaviors of Adult Male Rats: Role of NMDA Receptors. *Neurochem Res* **43**, 1067-1074.
102. Vargas J, Junco M, Gomez C *et al.* (2016) Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. *PLoS One* **11**, 1-21.
103. Liu C, Hao S, Zhu M *et al.* (2018) Maternal Separation Induces Different Autophagic Responses in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Adult Rats. *Neuroscience* **374**, 287-294.
104. Yu H, Chen ZY (2011) The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin* **32**, 3-11.
105. Levy MJF, Boulle F, Steinbusch HW *et al.* (2018) Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **235**, 2195-2220.
106. Bartsch T, Wulff P (2015) The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* **309**, 1-16.
107. Bello-Medina PC, Gonzalez FDA, Medina AC (2018) El hipocampo: historia, estructura y función. *Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río* **5**, 57-64.
108. Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**, 7-19.
109. Jones DT, Graff-Radford J (2021) Executive Dysfunction and the Prefrontal Cortex. *Continuum (Minneapolis Minn)* **27**, 1586-1601.
110. Chafee MV, Heilbronner SR (2022) Prefrontal cortex. *Curr Biol* **32**, R346-R351.
111. Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894-902.
112. Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* **59**, 1151-1159.
113. Hamilton JP, Gotlib IH (2008) Neural substrates of increased memory sensitivity for negative stimuli in major depression. *Biol Psychiatry* **63**, 1155-1162.
114. Peluso MA, Glahn DC, Matsuo K *et al.* (2009) Amygdala hyperactivation in untreated depressed individuals. *Psychiatry Res* **173**, 158-161.
115. Carboni E, Carta AR (2022) BDNF Alterations in Brain Areas and the Neurocircuitry Involved in the Antidepressant Effects of Ketamine in Animal Models, Suggest the Existence of a Primary Circuit of Depression. *J Integr Neurosci* **21**, 1-20.
116. Kelley AE (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev* **27**, 765-776.

117. van Dongen YC, Deniau JM, Pennartz CM *et al.* (2005) Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* **136**, 1049-1071.
118. Heimer L, Zahm DS, Churchill L *et al.* (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* **41**, 89-125.
119. Zorrilla EP, Koob GF (2013) Amygdalostratial projections in the neurocircuitry for motivation: a neuroanatomical thread through the career of Ann Kelley. *Neurosci Biobehav Rev* **37**, 1932-1945.
120. West EA, Carelli RM (2016) Nucleus Accumbens Core and Shell Differentially Encode Reward-Associated Cues after Reinforcer Devaluation. *J Neurosci* **36**, 1128-1139.
121. Bessa JM, Morais M, Marques F *et al.* (2013) Stress-induced anhedonia is associated with hypertrophy of medium spiny neurons of the nucleus accumbens. *Transl Psychiatry* **3**, 1-7.
122. Meredith GE, Pennartz CM, Groenewegen HJ (1993) The cellular framework for chemical signalling in the nucleus accumbens. *Prog Brain Res* **99**, 3-24.
123. Saddoris MP, Sugam JA, Cacciapaglia F *et al.* (2013) Rapid dopamine dynamics in the accumbens core and shell: learning and action. *Front Biosci (Elite Ed)* **5**, 273-288.
124. Heshmati M, Russo SJ (2015) Anhedonia and the brain reward circuitry in depression. *Curr Behav Neurosci Rep* **2**, 146-153.
125. Soares-Cunha C, de Vasconcelos NAP, Coimbra B *et al.* (2020) Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol Psychiatry* **25**, 3241-3255.
126. Hernández JDO, Aguilar EJ, García F (2015) El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* **15**, 20-28.
127. Alkadhi KA (2019) Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. *Mol Neurobiol* **56**, 6566-6580.
128. Kelley AE, Domesick VB (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* **7**, 2321-2335.
129. Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* **172**, 49-84.
130. van Groen T, Wyss JM (1990) Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol* **302**, 515-528.
131. Friedman DP, Aggleton JP, Saunders RC (2002) Comparison of hippocampal, amygdala, and perirhinal projections to the nucleus accumbens: combined anterograde and retrograde tracing study in the Macaque brain. *J Comp Neurol* **450**, 345-365.
132. Meidahl AC, Orlowski D, Sorensen JC *et al.* (2016) The Retrograde Connections and Anatomical Segregation of the Gottingen Minipig Nucleus Accumbens. *Front Neuroanat* **10**, 1-11.
133. Alló M (2020) *Cuando el cerebro dice basta. La trampa de la evolución o por qué nos deprimimos*. 1° ed. Argentina, Buenos Aires: Primera Clase Impresores.
134. Bermudez CM (2012) Clinical Applications of Peripheral Markers of Response in Antidepressant Treatment: Neurotrophins and Cytokines. *Rev Colomb Psiquiatr* **41**, 165-184.
135. Hamon M, Blier P (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **45**, 54-63.
136. Belmaker RH, Agam G (2008) Major depressive disorder. *N Engl J Med* **358**, 55-68.
137. Wong ML, Licinio J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2**, 343-351.
138. Wilkinson PO, Goodyer IM (2011) Childhood adversity and allostatic overload of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a vulnerability model for depressive disorders. *Dev Psychopathol* **23**, 1017-1037.
139. Villanueva R (2013) Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast* **2013**, 1-7.

140. Makhija K, Karunakaran S (2013) The role of inflammatory cytokines on the aetiopathogenesis of depression. *Aust NZ J Psychiatry* **47**, 828-839.
141. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G *et al.* (2014) Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci* **8**, 1-7.
142. Rossetti AC, Papp M, Gruca P *et al.* (2016) Stress-induced anhedonia is associated with the activation of the inflammatory system in the rat brain: Restorative effect of pharmacological intervention. *Pharmacol Res* **103**, 1-12.
143. Miller AH, Raison CL (2016) The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* **16**, 22-34.
144. Krishnadas R, Cavanagh J (2012) Depression: an inflammatory illness? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **83**, 495-502.
145. Chourbaji S, Urani A, Inta I *et al.* (2006) IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis* **23**, 587-594.
146. Zhang JC, Yao W, Hashimoto K (2016) Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Curr Neuropharmacol* **14**, 721-731.
147. Ohira K, Hayashi M (2009) A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Curr Neuropharmacol* **7**, 276-285.
148. Xue Y, Liang H, Yang R *et al.* (2021) The role of pro- and mature neurotrophins in the depression. *Behav Brain Res* **404**, 1-6.
149. Skaper SD (2012) The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* **846**, 1-12.
150. Dwivedi Y (2009) Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatr Dis Treat* **5**, 433-449.
151. Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans R Soc B* **361**, 1545-1564.
152. Bartkowska K, Turlejski K, Djavadian RL (2010) Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **70**, 454-467.
153. Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* **67**, 203-233.
154. Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**, 1131-1136.
155. Lee R, Kermani P, Teng KK *et al.* (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**, 1945-1948.
156. Notaras M, van den Buuse M (2019) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation. *Neuroscientist* **25**, 434-454.
157. Cramer SC, Sur M, Dobkin BH *et al.* (2011) Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* **134**, 1591-1609.
158. Rajkowska G (2000) Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* **48**, 766-777.
159. Zhang JC, Wu J, Fujita Y *et al.* (2014) Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**, 1-12.
160. Duman CH, Duman RS (2015) Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci Lett* **601**, 20-29.
161. Yang C, Shirayama Y, Zhang JC *et al.* (2015) Regional differences in brain-derived neurotrophic factor levels and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**, 1-6.
162. McEwen BS (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* **48**, 721-731.
163. Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* **60**, 236-248.

164. Tebartz van Elst L, Woermann F, Lemieux L *et al.* (2000) Increased amygdala volumes in female and depressed humans. A quantitative magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett* **281**, 103-106.
165. Frodl T, Meisenzahl E, Zetsche T *et al.* (2002) Enlargement of the amygdala in patients with a first episode of major depression. *Biol Psychiatry* **51**, 708-714.
166. Bremner JD, Narayan M, Anderson ER *et al.* (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* **157**, 115-118.
167. Castren E, Rantamaki T (2010) The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* **70**, 289-297.
168. Duman RS, Aghajanian GK (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* **338**, 68-72.
169. Wacker J, Dillon DG, Pizzagalli DA (2009) The role of the nucleus accumbens and rostral anterior cingulate cortex in anhedonia: integration of resting EEG, fMRI, and volumetric techniques. *Neuroimage* **46**, 327-337.
170. Ancelin ML, Carriere I, Artero S *et al.* (2019) Lifetime major depression and grey-matter volume. *J Psychiatry Neurosci* **44**, 45-53.
171. Avnioglu S, Velioglu HA, Cankaya S *et al.* (2021) Quantitative evaluation of brain volumes in drug-free major depressive disorder using MRI-Cloud method. *Neuroreport* **32**, 1027-1034.
172. Anand A, Li Y, Wang Y *et al.* (2005) Activity and connectivity of brain mood regulating circuit in depression: a functional magnetic resonance study. *Biol Psychiatry* **57**, 1079-1088.
173. Lv QY, Chen MM, Li Y *et al.* (2021) Brain circuit dysfunction in specific symptoms of depression. *Eur J Neurosci* **55**, 2393-2403.
174. Qiao H, Li MX, Xu C *et al.* (2016) Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast* **2016**, 1-26.
175. Price RB, Duman R (2020) Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. *Mol Psychiatry* **25**, 530-543.
176. Angelucci F, Brene S, Mathe AA (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* **10**, 345-352.
177. Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* **64**, 238-258.
178. Gupta VK, You Y, Gupta VB *et al.* (2013) TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int J Mol Sci* **14**, 10122-10142.
179. Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T (1991) trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* **11**, 143-153.
180. Silhol M, Bonnichon V, Rage F *et al.* (2005) Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* **132**, 613-624.
181. Tejada GS, Diaz-Guerra M (2017) Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies. *Int J Mol Sci* **18**, 1-24.
182. Cunningham ME, Greene LA (1998) A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J* **17**, 7282-7293.
183. Barfield ET, Gourley SL (2018) Prefrontal cortical trkB, glucocorticoids, and their interactions in stress and developmental contexts. *Neurosci Biobehav Rev* **95**, 535-558.
184. Offenhauser N, Muzio V, Biffo S (2002) BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression. *Neuroreport* **13**, 1189-1193.
185. Wong J, Garner B (2012) Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* **420**, 331-335.
186. Alderson RF, Curtis R, Alterman AL *et al.* (2000) Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* **871**, 210-222.

187. MacQueen GM, Ramakrishnan K, Ratnasingan R *et al.* (2003) Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. *Int J Neuropsychopharmacol* **6**, 391-396.
188. Zhang JC, Yao W, Dong C *et al.* (2015) Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **232**, 4325-4335.
189. Bai YY, Ruan CS, Yang CR *et al.* (2016) ProBDNF Signaling Regulates Depression-Like Behaviors in Rodents under Chronic Stress. *Neuropsychopharmacology* **41**, 2882-2892.
190. Balu DT, Hoshaw BA, Malberg JE *et al.* (2008) Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain Res* **1211**, 37-43.
191. Liu D, Xie K, Yang X *et al.* (2014) Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav Brain Res* **264**, 9-16.
192. Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ *et al.* (1997) Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* **56**, 131-137.
193. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S *et al.* (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* **22**, 3251-3261.
194. Karege F, Perret G, Bondolfi G *et al.* (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* **109**, 143-148.
195. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N *et al.* (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* **54**, 70-75.
196. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M *et al.* (2014) Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry* **19**, 791-800.
197. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM *et al.* (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* **50**, 260-265.
198. Vaidya VA, Duman RS (2001) Depression-emerging insights from neurobiology. *Br Med Bull* **57**, 61-79.
199. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR *et al.* (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* **60**, 804-815.
200. Karege F, Vaudan G, Schwald M *et al.* (2005) Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* **136**, 29-37.
201. Pandey GN, Ren X, Rizavi HS *et al.* (2008) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**, 1047-1061.
202. Fanous S, Hammer RP, Jr., Nikulina EM (2010) Short- and long-term effects of intermittent social defeat stress on brain-derived neurotrophic factor expression in mesocorticolimbic brain regions. *Neuroscience* **167**, 598-607.
203. Berton O, McClung CA, Dileone RJ *et al.* (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* **311**, 864-868.
204. Krishnan V, Han MH, Graham DL *et al.* (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* **131**, 391-404.
205. Wook Koo J, Labonte B, Engmann O *et al.* (2016) Essential Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Social Stress-Induced Depressive Behaviors. *Biol Psychiatry* **80**, 469-478.
206. Taliáz D, Nagaraj V, Haramati S *et al.* (2013) Altered brain-derived neurotrophic factor expression in the ventral tegmental area, but not in the hippocampus, is essential for antidepressant-like effects of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* **74**, 305-312.

207. Eisch AJ, Bolanos CA, de Wit J *et al.* (2003) Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* **54**, 994-1005.
208. McMakin DL, Olino TM, Porta G *et al.* (2012) Anhedonia predicts poorer recovery among youth with selective serotonin reuptake inhibitor treatment-resistant depression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **51**, 404-411.
209. Spijker J, Bijl RV, de Graaf R *et al.* (2001) Determinants of poor 1-year outcome of DSM-III-R major depression in the general population: results of the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Acta Psychiatr Scand* **103**, 122-130.
210. Vrieze E, Demyttenaere K, Bruffaerts R *et al.* (2014) Dimensions in major depressive disorder and their relevance for treatment outcome. *J Affect Disord* **155**, 35-41.
211. Hatzigiakoumis DS, Martinotti G, Giannantonio MD *et al.* (2011) Anhedonia and substance dependence: clinical correlates and treatment options. *Front Psychiatry* **2**, 1-12.
212. Shirayama Y, Chaki S (2006) Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Curr Neuropharmacol* **4**, 277-291.
213. Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM *et al.* (1994) Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* **342**, 321-334.
214. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q *et al.* (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* **17**, 2295-2313.
215. LeGates TA, Kvarta MD, Tooley JR *et al.* (2018) Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus-nucleus accumbens synapses. *Nature* **564**, 258-262.
216. Williams ES, Manning CE, Eagle AL *et al.* (2020) Androgen-Dependent Excitability of Mouse Ventral Hippocampal Afferents to Nucleus Accumbens Underlies Sex-Specific Susceptibility to Stress. *Biol Psychiatry* **87**, 492-501.
217. Pignatelli M, Tejada HA, Barker DJ *et al.* (2021) Cooperative synaptic and intrinsic plasticity in a disinaptic limbic circuit drive stress-induced anhedonia and passive coping in mice. *Mol Psychiatry* **26**, 1860-1879.
218. Sung YH, Shin MS, Cho S *et al.* (2010) Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neurosci Lett* **470**, 86-90.
219. Aguggia JP, Suarez MM, Rivarola MA (2013) Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res* **248**, 25-31.
220. Bernhart FW, Tomarelli RM (1966) A salt mixture supplying the national research council estimates of the mineral requirements of the rat. *J Nutr* **89**, 495-500.
221. Katz RJ (1982) Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav* **16**, 965-968.
222. Zurita A, Murua S, Molina V (1996) An endogenous opiate mechanism seems to be involved in stress-induced anhedonia. *Eur J Pharmacol* **299**, 1-7.
223. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229**, 327-336.
224. Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* **31**, 47-59.
225. Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* **13**, 93-110.
226. Chang PK, Yu L, Chen JC (2018) Dopamine D3 receptor blockade rescues hyper-dopamine activity-induced deficit in novel object recognition memory. *Neuropharmacology* **133**, 216-223.
227. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
228. Tyler WJ, Pozzo-Miller L (2003) Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol* **553**, 497-509.

229. Calfa G, Chapleau CA, Campbell S *et al.* (2012) HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* **22**, 1493-1500.
230. Giachero M, Calfa GD, Molina VA (2015) Hippocampal dendritic spines remodeling and fear memory are modulated by GABAergic signaling within the basolateral amygdala complex. *Hippocampus* **25**, 545-555.
231. Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD (1999) Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* **81**, 1404-1411.
232. Peters A, Kaiserman-Abramof IR (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* **127**, 321-355.
233. Murphy DD, Segal M (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* **16**, 4059-4068.
234. Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC *et al.* (2009) Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* **35**, 219-233.
235. Koh IY, Lindquist WB, Zito K *et al.* (2002) An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural Comput* **14**, 1283-1310.
236. Harris KM (1999) Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 343-348.
237. Segal I, Korkotian I, Murphy DD (2000) Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci* **23**, 53-57.
238. Yuste R, Majewska A, Holthoff K (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* **3**, 653-659.
239. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* **64**, 313-353.
240. Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J *et al.* (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* **26**, 360-368.
241. Cazorla M, Premont J, Mann A *et al.* (2011) Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest* **121**, 1846-1857.
242. Paxinos G, Watson C (2013) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 7th edition. ed: Elsevier.
243. West CD, Kemper TL (1976) The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain. *Brain Res* **107**, 221-237.
244. Wang L, Xu RJ (2007) The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. *Asia Pac J Clin Nutr* **16 Suppl 1**, 467-472.
245. Valadares CT, Fukuda MT, Francolin-Silva AL *et al.* (2010) Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutr Neurosci* **13**, 274-282.
246. Naik AA, Patro IK, Patro N (2015) Slow Physical Growth, Delayed Reflex Ontogeny, and Permanent Behavioral as Well as Cognitive Impairments in Rats Following Intra-generational Protein Malnutrition. *Front Neurosci* **9**, 1-18.
247. Sinha S, Patro N, Patro IK (2020) Amelioration of neurobehavioral and cognitive abilities of F1 progeny following dietary supplementation with Spirulina to protein malnourished mothers. *Brain Behav Immun* **85**, 69-87.
248. Marichich ES, Molina VA, Orsingher OA (1979) Persistent changes in central catecholaminergic system after recovery of perinatally undernourished rats. *J Nutr* **109**, 1045-1050.
249. Passos MCF, Ramos CF, Moura EG (2000) Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research* **20**, 1603-1612.
250. Berardino BG, Ballarini F, Chertoff M *et al.* (2022) Nutritional stress timing differentially programs cognitive abilities in young adult male mice. *Nutr Neurosci* **25**, 286-298.

251. Villares JMM (2016) Los mil primeros días de vida y la prevención de la enfermedad en el adulto. *Nutr Hosp* **33**, 8-11.
252. Méndez AA (2019) La nutrición materna y la programación metabólica: el origen fetal de las enfermedades crónicas degenerativas en los adultos. *CIENCIA ergo-sum* **27**, 1-9.
253. Ramírez-López MT, Berrios MV, González RA *et al.* (2015) El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual: revisión de los mecanismos biológicos implicados. *Nutr Hosp* **32**, 2433-2445.
254. Winick M, Rosso P (1969) Head circumference and cellular growth of the brain in normal and marasmic children. *J Pediatr* **74**, 774-778.
255. Zamenhof S, Van Marthens E, Margolis FL (1968) DNA (cell number) and protein in neonatal brain: alteration by maternal dietary protein restriction. *Science* **160**, 322-323.
256. Lehmann J, Feldon J (2000) Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci* **11**, 383-408.
257. Marco EM, Llorente R, Lopez-Gallardo M *et al.* (2015) The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev* **51**, 151-163.
258. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Charco R *et al.* (2012) Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* **30**, 39-45.
259. Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM *et al.* (2014) Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol Behav* **129**, 237-254.
260. Natt D, Barchiesi R, Murad J *et al.* (2017) Perinatal Malnutrition Leads to Sexually Dimorphic Behavioral Responses with Associated Epigenetic Changes in the Mouse Brain. *Sci Rep* **7**, 1-14.
261. Berardino BG, Chertoff M, Gianatiempo O *et al.* (2019) Exposure to enriched environment rescues anxiety-like behavior and miRNA deregulated expression induced by perinatal malnutrition while altering oligodendrocyte morphology. *Neuroscience* **408**, 115-134.
262. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR (1996) Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* **60**, 675-680.
263. Francolin-Silva AL, da Silva Hernandez A, Fukuda MT *et al.* (2006) Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res* **173**, 310-314.
264. Soares RO, Rorato RC, Padovan D *et al.* (2015) Environmental enrichment reverses reduction in glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of and improves behavioral responses of anxiety in early malnourished rats. *Brain Res* **1600**, 32-41.
265. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodriguez-Gonzalez GL *et al.* (2012) Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res* **227**, 324-329.
266. Hernandez AS, Almeida SS (2003) Postnatal protein malnutrition affects inhibitory avoidance and risk assessment behaviors in two models of anxiety in rats. *Nutr Neurosci* **6**, 213-219.
267. da Silva Hernandez A, Francolin-Silva AL, Valadares CT *et al.* (2005) Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* **162**, 240-245.
268. Batista TH, Veronesi VB, Ribeiro A *et al.* (2017) Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. *Nutr Neurosci* **20**, 437-442.
269. Ferroni NM, Berardino BG, Belluscio LM *et al.* (2022) Perinatal protein malnutrition induces the emergence of enduring effects and age-related impairment behaviors, increasing the death risk in a mouse model. *Nutr Neurosci* **25**, 976-989.
270. Kircanski K, LeMoult J, Ordaz S *et al.* (2017) Investigating the nature of co-occurring depression and anxiety: Comparing diagnostic and dimensional research approaches. *J Affect Disord* **216**, 123-135.

271. Calhoon GG, Tye KM (2015) Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci* **18**, 1394-1404.
272. Godoy MA, Souza AS, Lobo MA *et al.* (2013) Effects of protein restriction during gestation and lactation on cell proliferation in the hippocampus and subventricular zone: functional implications. Protein restriction alters hippocampal/SVZ cell proliferation. *Brain Res* **1496**, 10-27.
273. Pillay N, Rimbach R, Rymer T (2016) Pre- and postnatal dietary protein deficiency influences anxiety, memory and social behaviour in the African striped mouse *Rhabdomys dilectus chakae*. *Physiol Behav* **161**, 38-46.
274. Batista TH, Giusti-Paiva A, Vilela FC (2019) Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. *Nutr Neurosci* **22**, 655-663.
275. Cohen SJ, Stackman RW, Jr. (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res* **285**, 105-117.
276. Perez-Garcia G, Guzman-Quevedo O, Da Silva Aragao R *et al.* (2016) Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. *Sci Rep* **6**, 1-12.
277. McGaughy JA, Amaral AC, Rushmore RJ *et al.* (2014) Prenatal malnutrition leads to deficits in attentional set shifting and decreases metabolic activity in prefrontal subregions that control executive function. *Dev Neurosci* **36**, 532-541.
278. Belluscio LM, Alberca CD, Pregi N *et al.* (2016) Altered gene expression in hippocampus and depressive-like behavior in young adult female mice by early protein malnutrition. *Genes Brain Behav* **15**, 741-749.
279. Molina VA, Keller EA, Orsingher OA (1987) Reduced anti-immobility effect of repeated desipramine (DMI) treatment in adult rats undernourished at perinatal age. *Pharmacol Biochem Behav* **26**, 417-419.
280. Porsolt RD (1981) Behavioral despair. In *Antidepressant: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives*, pp. 121-139 [SJ Enna, JB Malick and E Richelson, editors]. New York: Raven.
281. Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C *et al.* (2001) Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 8**, Unit 8.10A.
282. Pablo JMD, Guillamón A (1992) Validez de la prueba de natación forzada como modelo animal de depresión. *Revista de Psicología Genreal y Aplicada* **45**, 151-160.
283. Molendijk ML, de Kloet ER (2015) Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* **62**, 389-391.
284. Molendijk ML, de Kloet ER (2019) Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. *Behav Brain Res* **364**, 1-10.
285. Liu MY, Yin CY, Zhu LJ *et al.* (2018) Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc* **13**, 1686-1698.
286. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR *et al.* (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* **493**, 537-541.
287. Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK *et al.* (2013) Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* **493**, 532-536.
288. Cao JL, Covington HE, 3rd, Friedman AK *et al.* (2010) Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *J Neurosci* **30**, 16453-16458.
289. Anstrom KK, Miczek KA, Budygin EA (2009) Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience* **161**, 3-12.
290. Zhong P, Vickstrom CR, Liu X *et al.* (2018) HCN2 channels in the ventral tegmental area regulate behavioral responses to chronic stress. *Elife* **7**, 1-27.
291. Toth E, Gersner R, Wilf-Yarkoni A *et al.* (2008) Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. *J Neurochem* **107**, 522-532.

292. Liu D, Tang QQ, Yin C *et al.* (2018) Brain-derived neurotrophic factor-mediated projection-specific regulation of depressive-like and nociceptive behaviors in the mesolimbic reward circuitry. *Pain* **159**, 1-27.
293. Ma M, Ren Q, Yang C *et al.* (2016) Adjunctive treatment of brexpiprazole with fluoxetine shows a rapid antidepressant effect in social defeat stress model: Role of BDNF-TrkB signaling. *Sci Rep* **6**, 1-12.
294. Yang B, Zhang JC, Han M *et al.* (2016) Comparison of R-ketamine and rapastinel antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **233**, 3647-3657.
295. Yang C, Shirayama Y, Zhang JC *et al.* (2015) R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. *Transl Psychiatry* **5**, 1-11.
296. Shirayama Y, Yang C, Zhang JC *et al.* (2015) Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and the antidepressant effects of a TrkB agonist and antagonist. *Eur Neuropsychopharmacol* **25**, 2449-2458.
297. Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM *et al.* (2004) Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* **24**, 4324-4332.
298. Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI *et al.* (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11435-11440.
299. Gourley SL, Kiraly DD, Howell JL *et al.* (2008) Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biol Psychiatry* **64**, 884-890.
300. Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL *et al.* (2001) Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* **21**, 7397-7403.
301. Ren Q, Ma M, Yang C *et al.* (2015) BDNF-TrkB signaling in the nucleus accumbens shell of mice has key role in methamphetamine withdrawal symptoms. *Transl Psychiatry* **5**, 1-11.
302. Zhang JC, Yao W, Ren Q *et al.* (2016) Depression-like phenotype by deletion of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: Role of BDNF-TrkB in nucleus accumbens. *Sci Rep* **6**, 1-10.
303. Azogu I, Plamondon H (2017) Inhibition of TrkB at the nucleus accumbens, using ANA-12, regulates basal and stress-induced orexin A expression within the mesolimbic system and affects anxiety, sociability and motivation. *Neuropharmacology* **125**, 129-145.
304. Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* **28**, 309-369.
305. Treadway MT, Zald DH (2011) Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neurosci Biobehav Rev* **35**, 537-555.
306. Der-Avakian A, Markou A (2012) The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci* **35**, 68-77.
307. Cannon CM, Palmiter RD (2003) Reward without dopamine. *J Neurosci* **23**, 10827-10831.
308. Pardo M, Lopez-Cruz L, San Miguel N *et al.* (2015) Selection of sucrose concentration depends on the effort required to obtain it: studies using tetrabenazine, D1, D2, and D3 receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* **232**, 2377-2391.
309. Perondi MC, Gutierrez MC, Valdomero A *et al.* (2017) Perinatal protein deprivation facilitates morphine cross-sensitization to cocaine and enhances DeltaFosB expression in adult rats. *Behav Brain Res* **333**, 203-210.
310. Velazquez EE, Valdomero A, Maldonado NM *et al.* (2013) Perinatal protein deprivation facilitates accumbal ERK phosphorylation in cocaine-sensitized adult rats. *Behav Brain Res* **241**, 222-227.
311. Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* **59**, 1116-1127.

312. Mondal AC, Fatima M (2019) Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment. *Int J Neurosci* **129**, 283-296.
313. Duman RS, Deyama S, Fogaca MV (2021) Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants. *Eur J Neurosci* **53**, 126-139.
314. Ma M, Ren Q, Yang C *et al.* (2017) Antidepressant effects of combination of brexpiprazole and fluoxetine on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Psychopharmacology (Berl)* **234**, 525-533.
315. Wang JQ, Mao L (2019) The ERK Pathway: Molecular Mechanisms and Treatment of Depression. *Mol Neurobiol* **56**, 6197-6205.
316. An X, Yao X, Li B *et al.* (2021) Role of BDNF-mTORC1 Signaling Pathway in Female Depression. *Neural Plast* **2021**, 1-8.
317. Hazra S, Kumar S, Saha GK *et al.* (2017) Reversion of BDNF, Akt and CREB in Hippocampus of Chronic Unpredictable Stress Induced Rats: Effects of Phytochemical, Bacopa Monnieri. *Psychiatry Investig* **14**, 74-80.
318. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* **80**, 539-547.
319. Molteni R, Barnard RJ, Ying Z *et al.* (2002) A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* **112**, 803-814.
320. Damodara Gowda KM, Suchetha Kumari N, Ullal H (2020) Role of astaxanthin in the modulation of brain-derived neurotrophic factor and spatial learning behavior in perinatally undernourished Wistar rats. *Nutr Neurosci* **23**, 422-431.
321. Castren E, Kojima M (2017) Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiol Dis* **97**, 119-126.
322. Castren E (2014) Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol* **220**, 461-479.
323. Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G *et al.* (2003) Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* **23**, 349-357.
324. Li Y, Luikart BW, Birnbaum S *et al.* (2008) TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* **59**, 399-412.
325. Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I (2005) Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res* **1037**, 204-208.
326. Sirianni RW, Olausson P, Chiu AS *et al.* (2010) The behavioral and biochemical effects of BDNF containing polymers implanted in the hippocampus of rats. *Brain Res* **1321**, 40-50.
327. Qiao H, An SC, Xu C *et al.* (2017) Role of proBDNF and BDNF in dendritic spine plasticity and depressive-like behaviors induced by an animal model of depression. *Brain Res* **1663**, 29-37.
328. Jang SW, Liu X, Yepes M *et al.* (2010) A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2687-2692.
329. Taliáz D, Stall N, Dar DE *et al.* (2010) Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. *Mol Psychiatry* **15**, 80-92.
330. Taliáz D, Loya A, Gersner R *et al.* (2011) Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **31**, 4475-4483.
331. Ye Y, Wang G, Wang H *et al.* (2011) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci Lett* **503**, 15-19.
332. Liu H, Jiang J, Zhao L (2019) Protein arginine methyltransferase-1 deficiency restrains depression-like behavior of mice by inhibiting inflammation and oxidative stress via Nrf-2. *Biochem Biophys Res Commun* **518**, 430-437.

333. Qu Y, Yang C, Ren Q *et al.* (2018) Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. *Acta Neuropsychiatr* **30**, 117-122.
334. Zhuang PC, Tan ZN, Jia ZY *et al.* (2019) Treadmill Exercise Reverses Depression Model-Induced Alteration of Dendritic Spines in the Brain Areas of Mood Circuit. *Front Behav Neurosci* **13**, 1-14.
335. Yang M, Luo CH, Zhu YQ *et al.* (2020) 7, 8-Dihydroxy-4-methylcoumarin reverses depression model-induced depression-like behaviors and alteration of dendritic spines in the mood circuits. *Psychoneuroendocrinology* **119**, 1-12.
336. Davila-Hernandez A, Zamudio SR, Martinez-Mota L *et al.* (2018) Antidepressant effects of acupoint stimulation and fluoxetine by increasing dendritic arborization and spine density in CA1 hippocampal neurons of socially isolated rats. *Neurosci Lett* **675**, 48-53.
337. Shen J, Li Y, Qu C *et al.* (2019) The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. *J Affect Disord* **248**, 81-90.
338. Papadakakis A, Sidiropoulou K, Panagis G (2019) Music exposure attenuates anxiety- and depression-like behaviors and increases hippocampal spine density in male rats. *Behav Brain Res* **372**, 1-10.
339. Huang W, Hu W, Cai L *et al.* (2021) Acetate supplementation produces antidepressant-like effect via enhanced histone acetylation. *J Affect Disord* **281**, 51-60.
340. Chen JJ, Shen JX, Yu ZH *et al.* (2021) The Antidepressant Effects of Resveratrol are Accompanied by the Attenuation of Dendrite/Dendritic Spine Loss and the Upregulation of BDNF/p-cofilin1 Levels in Chronic Restraint Mice. *Neurochem Res* **46**, 660-674.
341. Sala C, Segal M (2014) Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev* **94**, 141-188.
342. Fox ME, Figueiredo A, Menken MS *et al.* (2020) Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. *Sci Rep* **10**, 1-7.
343. Francis TC, Chandra R, Gaynor A *et al.* (2017) Molecular basis of dendritic atrophy and activity in stress susceptibility. *Mol Psychiatry* **22**, 1512-1519.
344. von Bohlen Und Halbach O (2009) Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat* **191**, 518-531.
345. Borczyk M, Sliwinska MA, Caly A *et al.* (2019) Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Sci Rep* **9**, 1-12.
346. Christoffel DJ, Golden SA, Russo SJ (2011) Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. *Rev Neurosci* **22**, 535-549.
347. Segura RKV, Barenque LC, Goes TIFvd (2018) Las espinas dendríticas, su función y algunas alteraciones. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México* **61**, 46-55.
348. Lukoyanov NV, Andrade JP (2000) Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behav Brain Res* **112**, 85-97.
349. Matos RJ, Orozco-Solis R, Lopes de Souza S *et al.* (2011) Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. *Neuroscience* **196**, 16-24.
350. von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach V (2018) BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res* **373**, 729-741.
351. Kellner Y, Godecke N, Dierkes T *et al.* (2014) The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Front Synaptic Neurosci* **6**, 1-17.
352. Tyler WJ, Pozzo-Miller LD (2001) BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* **21**, 4249-4258.
353. Ji Y, Lu Y, Yang F *et al.* (2010) Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci* **13**, 302-309.

354. Ji Y, Pang PT, Feng L *et al.* (2005) Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci* **8**, 164-172.
355. Luikart BW, Nef S, Virmani T *et al.* (2005) TrkB has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses. *J Neurosci* **25**, 3774-3786.
356. von Bohlen und Halbach O, Krause S, Medina D *et al.* (2006) Regional- and age-dependent reduction in trkB receptor expression in the hippocampus is associated with altered spine morphologies. *Biol Psychiatry* **59**, 793-800.
357. von Bohlen und Halbach O, Minichiello L, Unsicker K (2008) TrkB but not trkC receptors are necessary for postnatal maintenance of hippocampal spines. *Neurobiol Aging* **29**, 1247-1255.
358. Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L (2004) ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* **11**, 172-178.
359. Amaral MD, Pozzo-Miller L (2007) TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *J Neurosci* **27**, 5179-5189.
360. Marsden WN (2013) Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **43**, 168-184.
361. Forrest MP, Parnell E, Penzes P (2018) Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* **19**, 215-234.
362. Kahn I, Shohamy D (2013) Intrinsic connectivity between the hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in humans. *Hippocampus* **23**, 187-192.
363. Lim BK, Huang KW, Grueter BA *et al.* (2012) Anhedonia requires MC4R-mediated synaptic adaptations in nucleus accumbens. *Nature* **487**, 183-189.
364. Francis TC, Chandra R, Friend DM *et al.* (2015) Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biol Psychiatry* **77**, 212-222.
365. Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* **21**, 4915-4922.

---

---

*Producción  
científica*

---

---

## Artículos

Los resultados presentados en esta tesis se encuentran en redacción para su publicación bajo los siguientes títulos:

*Brain-derived neurotrophic factor-TrkB signaling in the nucleus accumbens plays a role in perinatal undernourished-induced anhedonia in the adult offspring.*

Gutiérrez MC, Perondi MC, Cragolini AB, Cuadra GR, Valdomero A.

*Perinatal protein restriction induces anhedonic-like behavior: opposite changes in dendritic spine density and morphology in accumbal and hippocampal neurons from adult rats.*

Gutiérrez MC, Comas Mutis R, Perondi MC, Cuadra GR, Calfa GD, Valdomero A.

## Artículos en colaboración

*Perinatal protein deprivation facilitates morphine cross-sensitization to cocaine and enhances  $\Delta$ FosB expression in adult rats.*

Perondi MC, Gutiérrez MC, Valdomero A, Cuadra GR (2017). Behavioral Brain Research 333, 203-210.

*Perinatal protein deprivation impacts nuclear O-GalNAc glycosylation in rat pup cells.*

Garay YC, Cejas RB, Perondi MC, Gutiérrez MC, Parodi P, Ferrero FA, Lardone RD, Valdomero A, Cuadra GR, Irazoqui FG (2022). The Journal of Nutrition (En revisión).

## Presentaciones en congresos

### ➤ Nacionales

*Early malnutrition attenuates the antidepressant-like effect of DMI in the forced-swim test in adult rats maternally separated.*

Gutiérrez MC, Nasi Medeot L, Perondi MC, Cuadra GR, Valdomero A.

XLVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE).

Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2016.

*Efecto de la malnutrición temprana sobre la anhedonia y depresión: un abordaje experimental.*

Gutiérrez MC, Perondi MC, Cuadra GR, Valdomero A.

50° Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE).

San Luis, Argentina. Noviembre 2018.

*Perinatal protein malnutrition-induced anhedonia is associated to a reduced hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in the adult offspring.*

Gutiérrez MC, Perondi MC, Comas Mutis R, Cuadra GR, Calfa GD, Valdomero A.

XXXIV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN).

Córdoba, Argentina. Octubre 2019

*BDNF-TrkB signaling in Nucleus Accumbens Shell is implicated in perinatal protein malnutrition-induced anhedonia.*

Gutiérrez MC, Perondi MC, Cuadra GR, Valdomero A.

XXXV Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN).

Congreso virtual. Octubre 2020.

➤ *Internacionales*

*Perinatal undernutrition as a potential risk factor for the onset of depression. A behavioral and molecular study in adult rats.*

Gutiérrez MC, Montroull LE, Perondi MC, Mascó DH, Cuadra GR, Valdomero A.

XVII Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN).

Punta Cana, República Dominicana. Noviembre 2015.

*Participación de la vía de señalización BDNF-TrkB en la expresión de la anhedonia inducida por la malnutrición temprana: rol diferencial en Núcleo Accumbens Core y Shell.*

Gutiérrez MC, Perondi MC, Cuadra GR, Valdomero A.

XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN).

Asunción, Paraguay. Octubre-Noviembre 2021.

*Effect of perinatal protein malnutrition on relapse to drug addiction: a behavioral approach.*

Perondi MC, Gutiérrez MC, Valdomero A, Cuadra GR.

11<sup>th</sup> Forum of Neuroscience, Federation of European Neuroscience Societies (FENS).

Berlín, Alemania. Julio 2018.