



Universitat
de les Illes Balears

Estudio del efecto antidepresivo y neurogénico de la desipramina en rata adulta: Curso temporal.

Sandra Ledesma Corvi

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Máster Universitario en neurociencias

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

2018-2019

Fecha: 19/07/2019

Nombre Tutora del Trabajo: M. Julia García Fuster

Palabras clave del trabajo:

Depresión, desipramina, hipocampo, neurogénesis, Ki-67, NeuroD, FADD, p35, p25, Cdk5

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Hipótesis neurogénica de la depresión.....	3
2.2. Potencial neurogénico de los fármacos antidepresivos.....	4
2.3. Mecanismos subyacentes a la acción neurogénica de los antidepresivos.....	6
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Animales de experimentación.....	10
4.2. Diseños experimentales	10
4.2.1. Estudio 1	10
4.2.2. Estudio 2	11
4.3. Test comportamental.....	11
4.4. Recogida de muestras cerebrales	12
4.5. Inmunohistoquímica	12
4.6. Western blot.....	13
4.7. Análisis de los resultados.....	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre el peso corporal de los animales	16
5.2. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la desesperación conductual.....	17
5.3. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proliferación celular y la supervivencia neuronal temprana hipocampal	18
5.4. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proteína multifuncional FADD en hipocampo de rata.....	19
5.5. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proteína Cdk-5 y sus co-factores p35 y p25 en hipocampo de rata.	20
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIONES	25
8. AGRADECIMIENTOS	26
9. BIBLIOGRAFÍA	27
10. APÉNDICE	31
Trabajo experimental presentado en el congreso <i>European College of Neurospsychopharmacology</i> (ECNP), 7-10 de octubre, Dinamarca	32

1. RESUMEN

La hipótesis neurogénica de la depresión postula que una reducción en la producción de nuevas neuronas en el hipocampo podría estar relacionada con la patogénesis de la depresión. En este contexto se estudió en ratas adultas el curso temporal del efecto antidepressivo de la desipramina, un antidepressivo tricíclico, y su posible asociación con la regulación de la neurogénesis hipocampal. Se realizaron dos experimentos paralelos en los que se administró de forma sub-aguda (3x20 mg/kg, durante 24 h) o sub-crónica (14x10 mg/kg, 14 días, 1 inyección/día) desipramina. Primero se evaluó el curso temporal del efecto antidepressivo de la desipramina en el test de natación forzada. Después se estudiaron por inmunohistoquímica los cambios inducidos por la desipramina sobre la neurogénesis hipocampal: Ki-67 para la proliferación celular y NeuroD para la supervivencia de neuronas jóvenes. También se evaluó por western blot la regulación hipocampal de distintos marcadores de destino celular: FADD, Cdk-5 y su co-factor p35-p25. Los resultados indican que la administración sub-aguda de desipramina induce un efecto antidepressivo tan potente y duradero como el paradigma sub-crónico de 14 días. Sin embargo, existen diferencias en los cambios neuroquímicos inducidos por ambos tratamientos, aunque la administración sub-aguda o sub-crónica de desipramina regulan de manera similar ciertos marcadores neuroplásticos hipocampales (disminución de los niveles de FADD, Cdk-5 y p35 en el hipocampo de rata 1 h post-tratamiento), solo la desipramina sub-crónica incrementa los niveles hipocampales de proliferación celular.

1. ABSTRACT

The neurogenic hypothesis of depression postulates that a reduction in the production of new neurons in the hippocampus may be related to the pathogenesis of depression. In this regard, the present study evaluated in adult rats the time-course antidepressant effect of desipramine, a typical tricyclic antidepressant, and its possible association with the regulation of hippocampal neurogenesis. Two parallel experiments were performed where rats were received sub-acute (3x20 mg/kg, within 24 h) or sub-chronic (14x10 mg/kg, 14 days, 1 injection/day) treatment with desipramine. The first study evaluated the time-course antidepressant effect of desipramine at forced swimming test. The second study determined changes in hippocampal neurogenesis induced by desipramine, through the study of cell genesis markers; Ki-67 to cell proliferation and NeuroD to newborn cell survival. The regulation of hippocampal expression of different cellular markers (FADD, Cdk-5 and its co-factor p35-p25) was also evaluated by western blot. The main results demonstrated a temporal antidepressant-like effect induced by desipramine, that lasted up to 24 h and had a similar magnitude of change following sub-acute or sub-chronic administration. However, a sub-chronic paradigm was needed to observe an increase in hippocampal cell proliferation, thus suggesting an additional improvement to the sub-acute treatment. Desipramine modulated FADD, Cdk-5 and p35-p25 protein levels in a rapid and reversible manner, as shown by the effects observed 1 and 24 h post-treatment.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Hipótesis neurogénica de la depresión

La depresión es un trastorno heterogéneo que a menudo se manifiesta con síntomas a nivel psicológico, conductual y fisiológico (véase revisión en Cryan et al., 2002). Aunque la depresión se ha convertido en un problema grave en la sociedad actual, con una estimación de prevalencia de hasta el 21 % de la población total (Cryan et al., 2002), los mecanismos subyacentes a esta fisiopatología, a excepción de los desequilibrios bioquímicos dentro de los sistemas noradrenérgicos/serotoninérgicos que no explican toda la patogénesis de este trastorno, aún no se conocen bien. Estudios recientes en roedores han llevado al planteamiento de la hipótesis neurogénica de la depresión (Jacobs et al., 2000), en la que se postula que la producción reducida de nuevas neuronas en el hipocampo podría estar relacionada con la patogénesis de la enfermedad y los trastornos relacionados con el estrés (Duman et al., 2001). Esta hipótesis ha sido respaldada por estudios clínicos de imágenes cerebrales. La mayor parte de estos trabajos se han centrado en el hipocampo, una estructura que forma parte del sistema límbico y que desempeña un papel importante en procesos como el aprendizaje y la memoria, así como en el control del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (Duman et al., 2001). Actualmente, existen estudios independientes en los que se ha demostrado que el volumen del hipocampo en pacientes con depresión se encuentra disminuido (Huang et al., 2007) y que el grado de reducción hipocampal se correlaciona con la duración total de la depresión (Kang et al., 2016). Además, estudios de imágenes cerebrales post-mortem han revelado una atrofia o pérdida de neuronas en el hipocampo y la corteza prefrontal de pacientes depresivos (Sheline et al., 1996). También se ha demostrado que el estrés produce una reducción rápida y elevada en la proliferación de nuevas neuronas en el cerebro adulto y en la arborización dendrítica de las neuronas piramidales CA3 (McEwen, 1999). Además, en modelos animales dicha disminución se correlaciona con el desespero conductual varios días después de la exposición al estrés, lo que sugiere que la disminución de la neurogénesis y el estado comportamental del animal se encuentran relacionados (Duman, 2004).

La neurogénesis es, por tanto, la producción de nuevas neuronas a lo largo de la vida. Actualmente solo se han encontrado dos regiones cerebrales en las que la neurogénesis muestra una elevada actividad: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado (García-Verdugo et al., 1998), que es la que parece más relevante en el contexto de la depresión. En el hipocampo de roedores adultos, las células precursoras inmaduras de la capa subgranular migran hacia la capa granular del giro dentado donde se diferencian en neuronas granulares (Balu y Lucki, 2009). Estudios recientes han demostrado que estas células son capaces de integrarse funcionalmente en el circuito hipocampal, ya que responden a la estimulación de la vía perforante del hipocampo y envían proyecciones axonales a distintas áreas cerebrales (Van Praag et al., 2002). Aunque la función de las células granulares recién generadas en el hipocampo adulto aún no está clara, se ha sugerido que estas neuronas jóvenes pueden proporcionar un mayor grado de plasticidad al cerebro maduro y que esta plasticidad se haría evidente a partir de la integración de nuevas unidades funcionales en el circuito hipocampal (Van Praag et al., 2002).

La neurogénesis hipocampal es un proceso dinámico que comprende distintos procesos como la proliferación, la migración, la diferenciación, la supervivencia y la integración funcional de las nuevas neuronas generadas (Figura 1) (Balu y Lucki, 2009). Actualmente, existen diferentes marcadores para estudiar los distintos estadios de la neurogénesis hipocampal, como el índice de proliferación celular, la supervivencia celular temprana o la supervivencia celular tardía. Entre estos marcadores se encuentran: el Ki-67; un marcador endógeno que se expresa en las células que se encuentran en proliferación (células generadas en las últimas 25 h) durante la fase activa del ciclo G1-M (Cameron y McKay, 2001), el NeuroD; un marcador que se expresa de manera puntual y restringida durante los primeros estadios hasta la diferenciación neuronal, indicando la supervivencia y la diferenciación neuronal temprana (neuronas entre 4 y 10 días de vida) (Lee, 1997) y la bromodesoxiuridina (BrdU); un marcador exógeno de origen sintético análogo de la timidina que se incorpora a la cadena de ADN de las células en proliferación, indicando el estado de desarrollo de las células generadas en el momento del marcaje una vez finalizado el tratamiento (Takahashi et al., 1992).

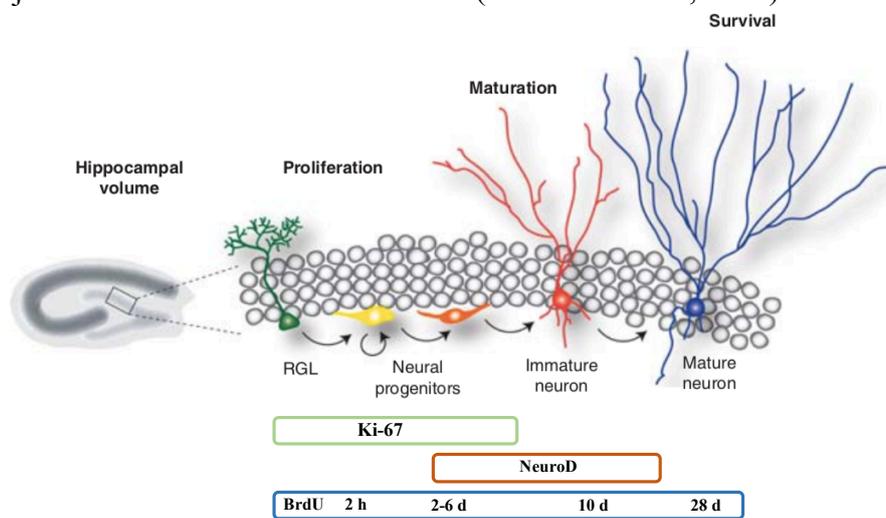


Figura 1. Ilustración esquemática en la que se muestran las distintas fases específicas de la neurogénesis que tienen lugar en el hipocampo del cerebro adulto y los marcadores moléculas utilizados para estudiarlas (modificada de Kang et al., 2016).

Por tanto, la neurogénesis hipocampal adulta representa una forma de plasticidad neuronal que contribuye a la habilidad del hipocampo para procesar, adaptarse y responder a estímulos y que está regulada de manera negativa o positiva por varios factores, incluyendo condiciones ambientales adversas (Warner-Schmidt y Duman, 2007), como se observa en los trastornos depresivos o tras la exposición a estrés (Duman et al., 2001), o condiciones positivas como el enriquecimiento ambiental, el ejercicio físico o la administración de tratamientos con potencial neurogénico (Dranovsky y Hen, 2006).

2.2. Potencial neurogénico de los fármacos antidepresivos

La mayoría de los fármacos antidepresivos aumentan los niveles sinápticos de las monoaminas noradrenalina y/o serotonina para contrarrestar los desequilibrios bioquímicos asociados a la patogénesis de este trastorno. Sin embargo, aunque los antidepresivos producen un aumento rápido en los niveles extracelulares de serotonina y noradrenalina, el inicio del efecto clínico no es apreciable hasta la tercera o cuarta semana (Wong et al., 2001). Esto sugiere que se pueden producir cambios neuroquímicos y

estructurales lentos dentro de las áreas límbicas objetivo de las proyecciones monoaminérgicas que pueden contrarrestar las alteraciones neuropatológicas que se producen en los trastornos depresivos (Santarelli et al., 2003). En este contexto, el potencial neurogénico en roedores de tratamientos antidepresivos con diversas dianas farmacológicas ha sido ampliamente estudiado en la literatura científica, aunque la mayoría de estudios se han centrado en evaluar fármacos inhibidores de la recaptación de serotonina, y más concretamente en los efectos ejercidos por la fluoxetina (Duman et al., 2001). Además, se ha observado que la aparición tardía de los efectos terapéuticos de los antidepresivos coincide con el tiempo que tardan en madurar las neuronas de nueva generación en el hipocampo (3-4 semanas). Esto sugiere que la neurogénesis podría ser un sustrato común y necesario para las acciones de los antidepresivos (Sahay y Hen, 2007).

En particular, diversos estudios han examinado la influencia de los antidepresivos en los distintos estadios de la neurogénesis: la proliferación, la diferenciación y la supervivencia neuronal temprana y tardía (Warner-Schmidt y Duman, 2006). En estas investigaciones se ha demostrado que la administración repetida de diversos antidepresivos como la fluoxetina o reboxetina aumenta la proliferación de los progenitores neurales en la capa subgranular del giro dentado (Malberg et al., 2000) y la supervivencia de estas neuronas de nueva generación (Nakagawa et al., 2002), pero no influye en la proporción de neuronas y células de la glía (80:20) (Malberg et al., 2000). El tratamiento antidepresivo también bloquea los efectos del estrés normalizando los niveles de neurogénesis en el hipocampo adulto. Esta interacción se ha observado en el modelo de estrés por separación maternal y el tratamiento antidepresivo con fluoxetina (Lee et al., 2001). También se ha demostrado que la supresión de la neurogénesis por irradiación dirigida en el hipocampo (Santarelli et al., 2003) o por el uso de animales transgénicos (Saxe et al., 2006) reduce algunos de los efectos comportamentales de la fluoxetina. Esto sugiere que la neurogénesis hipocampal adulta es necesaria para producir algunos de los efectos comportamentales inducidos por los antidepresivos que regulan los contenidos de serotonina en modelos animales (Pechnick et al., 2011). A pesar de que la mayoría de los tratamientos con antidepresivos aumentan la neurogénesis hipocampal a la vez que revierten los efectos sobre el desespero conductual (Pechnick et al., 2011), los mecanismos farmacológicos que subyacen a este proceso siguen sin conocerse bien. Por lo que el estudio de los mecanismos de acción de otros antidepresivos no serotoninérgicos podría resultar de gran interés.

En este contexto, el potencial neurogénico de la desipramina, fármaco perteneciente al grupo de los denominados antidepresivos tricíclicos típicos que se caracterizan por aumentar la concentración de neurotransmisores monoamínicos en la hendidura sináptica mediante la inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina (Jiang et al., 2011), ha sido mucho menos explorado. En la literatura científica existen muy pocas referencias al respecto. A nivel comportamental, aunque se ha demostrado que la administración subaguda (1-3 dosis en 24 h) de desipramina reduce la inmovilidad y aumenta la actividad de escalada en el test de natación forzada (Detke y Lucki, 1997; García-Fuster y García-Sevilla, 2016), hay muy pocos estudios en los que se haya estudiado su efecto tras la administración crónica. Esto es importante ya que las evidencias clínicas indican que los antidepresivos producen efectos terapéuticos en pacientes deprimidos después de su administración crónica (3-4 semanas) (Frazer y Benmansour, 2002). Además, parece ser que el aumento en la neurogénesis hipocampal adulta requiere un tratamiento antidepresivo crónico (Malberg et al., 2000). A nivel celular, solo hay un estudio en la

literatura en el que se ha observado que la desipramina puede promover la neurogénesis en el hipocampo adulto y revertir el comportamiento inducido en el test de indefensa aprendida (modelo de depresión). Sin embargo, no se ha determinado si la desipramina puede promover la neuroprotección y diferenciación en el hipocampo de rata (Chen et al., 2006). Por tanto, en este contexto y debido a la falta de información sobre los mecanismos implicados en el aumento de la neurogénesis con antidepresivos distintos a los serotoninérgicos, y en particular a la falta de bibliografía encontrada sobre los efectos de la desipramina en la neurogénesis adulta, parece de especial relevancia evaluar los posibles mecanismos subyacentes a la acción neurogénica inducida por la desipramina.

2.3. Mecanismos subyacentes a la acción neurogénica de los antidepresivos

Uno de los mecanismos fundamentales para mantener la función y la homeostasis celular es la regulación del ‘destino celular’, definido como el balance entre la proliferación, la diferenciación, o el inicio de la muerte celular. Entre estos mecanismos, la apoptosis o muerte celular programada es el más estudiado (Galluzzi et al., 2018). La apoptosis aberrante se ha relacionado con la depresión tanto en animales de experimentación (Harlan et al., 2006) como en humanos (Miguel-Hidalgo et al. 2014). Además, se ha demostrado que los antidepresivos inducen efectos anti-apoptóticos en modelos animales de depresión. En este contexto, proteínas pertenecientes a la vía extrínseca de la apoptosis (p. ej., receptor Fas, adaptador FADD: *Fas-Associated Death Domain* y caspasas efectoras) han ganado un interés especial en el estudio de los efectos neuroprotectores de los antidepresivos (véase p. ej., García-Fuster y García-Sevilla, 2016), gracias a su dualidad funcional; promoviendo la muerte celular o la supervivencia y/o diferenciación celular (Park et al., 2005).

En particular, la proteína multifuncional FADD interactúa con el receptor Fas y la superfamilia de receptores TNFR (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral) (Tourneur y Chiochia, 2010). Tradicionalmente, a FADD se le ha descrito una función proapoptótica (Galluzzi et al., 2018) y a su forma fosforilada (p-FADD) una función antiapoptótica, regulando la supervivencia y la proliferación celular (Scaffidi et al., 2000). Sin embargo, la dualidad de función de FADD ha quedado demostrada en otros estudios donde se le ha adscrito un papel neuroplástico no apoptótico (p. ej., el aumento de FADD en hipocampo por fármacos adrenérgicos se ha asociado a una mejora cognitiva en ratas viejas; Hernández-Hernández et al., 2018). En la Figura 2 se ilustran las distintas funciones adscritas a las formas de FADD.

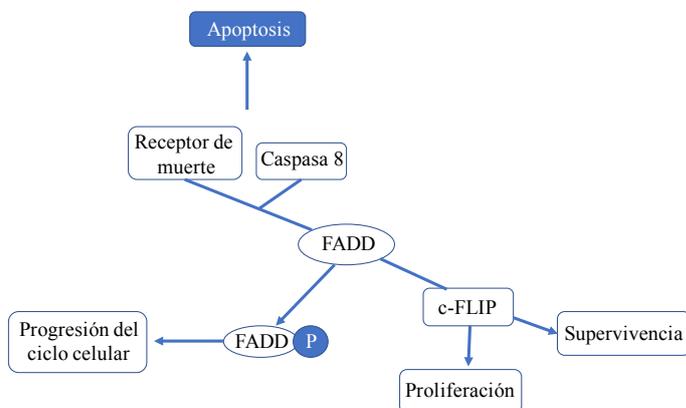


Figura 2. Mecanismos de acción de la proteína FADD. Además de su papel como adaptador con dominio de muerte, FADD también regula otros procesos celulares y de desarrollo. La mayoría de estas acciones están mediadas por la interacción de FADD con proteínas diana (c-FLIP, receptor de muerte, etc). Imagen modificada de Tourneur y Chiochia, 2010.

Por tanto, esta proteína puede presentar un papel importante en el destino neuronal tras la administración de distintos fármacos antidepresivos. En concreto se ha demostrado que la activación de autoreceptores y/o heteroreceptores (p. ej., receptor adrenérgico- α_{2A} , serotoninérgico $1A$ y dopamina D_2) produce una disminución de FADD y un incremento de p-FADD en el córtex cerebral de rata (García-Fuster y García-Sevilla, 2015) y que diversos fármacos antidepresivos, entre ellos la desipramina, pueden disminuir las señales pro-apoptóticas y promover la función anti-apoptótica, a través de la regulación de las formas de FADD (García-Fuster y García-Sevilla, 2016). En particular, este estudio demostró una correlación entre el fenotipo prodepresivo (medido como el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada) o la respuesta antidepresiva de la desipramina y la modulación de FADD, sugiriendo que esta proteína puede participar en los mecanismos moleculares que participan en las acciones anti-apoptóticas inducidas por los antidepresivos (García-Fuster y García-Sevilla, 2016).

Otra familia de proteínas que han ganado un especial interés en el estudio de los efectos neuroprotectores de los antidepresivos son las quinasas dependientes de ciclina (Cdk), ya que son altamente expresadas en células en proliferación y desempeñan un papel importante en fases específicas del ciclo celular (Shah y Lahiri, 2014). En concreto, la quinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk-5), cuya actividad se limita en gran medida a las neuronas post-mitóticas del sistema nervioso central (Hellmich et al., 1992) y depende de la asociación de los co-factores p35 y p39 (Tsai et al., 1994) (Figura 3), desempeña un papel importante en la migración y la supervivencia neuronal en el cerebro adulto (Lagace et al., 2008). Además, su desregulación en neuronas post-mitóticas puede producir una sobreactivación de varios componentes del ciclo celular, lo que lleva a la muerte celular (Chang et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que Cdk-5 presenta un papel crítico en la neurogénesis hipocampal adulta (Lagace et al., 2008). Además, se ha demostrado que la actividad de Cdk-5 en el cerebro regula los comportamientos depresivos y ansiolíticos. La microinyección de un inhibidor de Cdk-5 en el giro dentado del hipocampo en rata bloqueó el comportamiento depresivo inducido por el estrés crónico leve (Zhu et al., 2012).

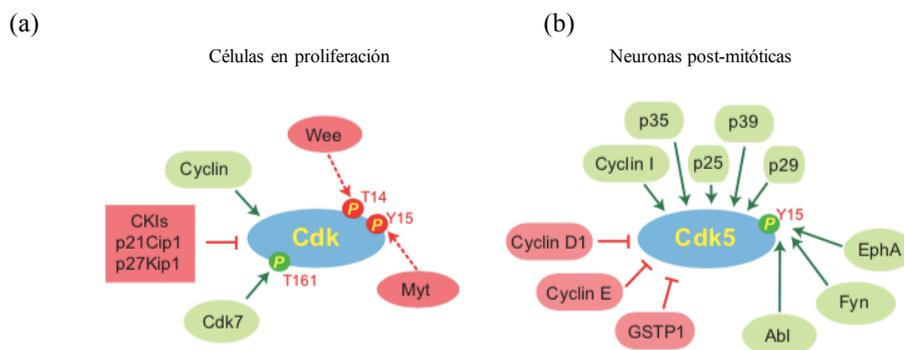


Figura 3. La regulación de Cdk5 difiere de la de otros miembros de la familia Cdk. **(a)** Reguladores de la familia Cdk distintos de Cdk5. En las células en proliferación, estas quinasas dependientes de ciclina se activan por ciclinas clásicas (pero no ciclina I) y se inhiben por inhibidores dependientes de Cdk (CKI), por ejemplo, p21Cip1 y p27Kip1. **(b)** Reguladores de Cdk5 (en neuronas postmitóticas). Los co-activadores como; p35, p25, p39, p29 o ciclina I, pueden activar Cdk5, mientras que GSTP1, ciclina D1 o ciclina E la inhiben. Las flechas verdes indican una regulación positiva de la actividad de Cdk, las flechas rojas discontinuas indican una regulación negativa a través de la fosforilación. Los óvalos verdes indican proteínas activadoras, los óvalos rojos o las cajas indican proteínas inhibidoras. Imagen tomada de Shah y Lahiri, 2014.

Estudios recientes han demostrado que en modelos de estrés se produce un aumento de la actividad de Cdk-5 junto con la translocación de su co-activador p35 del citoplasma a la membrana en el giro dentado del hipocampo y que la sobreexpresión de p35 es capaz de revertir el efecto antidepresivo ejercido por la venlafaxina en un modelo pro-depresivo. Además, los antidepresivos venlafaxina y mirtazapina reducen la actividad de Cdk-5 en el hipocampo a través de la redistribución de p35 desde la membrana celular hacia el citoplasma. Esto demuestra que el desarrollo del comportamiento depresivo está asociado a una mayor actividad de Cdk-5 y que el complejo Cdk-5/p35 desempeña un papel clave en la regulación de la acción antidepresiva (Zhu et al., 2012). Sin embargo, a pesar de la importancia de Cdk-5 en la regulación del efecto antidepresivo, no hay ningún artículo que haya evaluado previamente la regulación de Cdk5 tras la administración de desipramina.

Por tanto, debido a la falta de información sobre los mecanismos implicados en el aumento de la neurogénesis con antidepresivos distintos a los serotoninérgicos, y en particular a la falta de bibliografía encontrada sobre los efectos de la desipramina en la neurogénesis adulta, en el presente trabajo de fin de máster se pretende estudiar el curso temporal del efecto antidepresivo ejercido por diferentes paradigmas de dosificación de desipramina y su posible asociación con la regulación de la neurogénesis hipocampal en ratas, así como los posibles mecanismos farmacológicos subyacentes a la respuesta antidepresiva mediada por la desipramina.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es estudiar el curso temporal del efecto antidepresivo y neurogénico de la desipramina en rata adulta y su posible asociación con marcadores de neuroplasticidad relevantes.

Los objetivos específicos son:

1. Estudiar el curso temporal del efecto antidepresivo de la desipramina sobre la mejora en la desesperación conductual mediante el test de natación forzada en ratas adultas.
2. Estudiar el curso temporal de los efectos neurogénicos de la desipramina en el hipocampo de rata adulta, a nivel de la proliferación celular (Ki-67) y de la supervivencia neuronal temprana (NeuroD) mediante técnicas de inmunohistoquímica.
3. Estudiar el curso temporal de los efectos neuroplásticos de la desipramina en el hipocampo de rata adulta, a nivel de la regulación de las proteínas FADD, Cdk-5 y sus co-activadores p35 y p25 mediante técnicas de western blot.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales de experimentación

En el presente trabajo se han empleado ratas *Sprague Dawley* macho (n=59), criadas en el estabulario de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) y alojadas en cajas estándar (2-3 ratas por caja) bajo condiciones ambientales controladas (ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, 22 ± 1 °C y 70 % de humedad) con agua y comida disponible *ad libitum*. Los animales fueron tratados de acuerdo a las directrices establecidas por la guía ética del consejo europeo (Directiva 86/609/EEC), y cuyos protocolos fueron aprobados por la comisión local de bioética (CEEA, UIB-CAIB).

4.2. Diseños experimentales

4.2.1. Estudio 1

Para determinar el curso temporal del efecto antidepresivo inducido por la desipramina se utilizó como modelo experimental el test de natación forzada. Esta prueba fue desarrollada inicialmente por Porsolt (Porsolt et al., 1977) para determinar los efectos inducidos por la mayoría de antidepresivos conocidos en su momento. Actualmente, el test también se utiliza para testar los efectos pro-depresivos en modelos animales (Porsolt et al., 1978). Cuando los animales son expuestos al test, generalmente presentan una postura inmóvil que refleja un estado de “desespero conductual” y que se utiliza como un índice de desesperación o depresión (Porsolt et al., 1978). En el test también se pueden distinguir dos tipos de actividad: la natación; que se describe como un movimiento activo, más del necesario para mantener la cabeza fuera del agua, y la escalada; que se describe como un movimiento activo generado introduciendo y sacando las patas delanteras del agua, y que generalmente va dirigido contra la pared del tanque (Porsolt et al., 1978).

Para el primer estudio se utilizaron un total de 24 ratas (véase diseño experimental en la Figura 4). Los animales fueron habituados al experimentador dos días antes de iniciar los procedimientos y fueron posteriormente sometidos al test de natación forzada antes de iniciar el tratamiento (niveles basales de desesperación conductual para hacer grupos experimentales homogéneos en base a la respuesta conductual). A todos los animales se les administró durante un período de 14 días una dosis del tratamiento correspondiente vía intraperitoneal a un volumen equivalente de un 1 ml/kg. Las ratas pertenecientes al grupo control (n=8) y sub-crónico (n=8) recibieron respectivamente una dosis diaria de solución salina (0,9% NaCl) o del antidepresivo (10 mg/kg de desipramina) durante los 14 días de tratamiento. Los animales del grupo sub-agudo (n=8) recibieron un pulso diario de solución salina (0,9% NaCl) durante los 12 primeros días y tres dosis del antidepresivo (20 mg/kg de desipramina) 24 h, 5 h y 1 h antes de la prueba comportamental. Los animales fueron sometidos al test de natación forzada 1 h, 24 h y 3 días post-tratamiento. Finalmente, las ratas fueron sacrificadas 5 días después de la última administración (Figura 4).

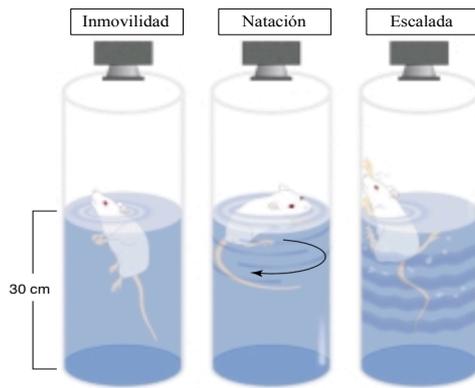


Figura 6. Ratas sometidas al test de natación forzada (FST). En el test las ratas pueden presentar al menos tres formas diferentes de comportamiento: Inmovilidad, natación y escalada. Imagen adaptada de Cryan et al., 2002.

Después del análisis de los vídeos comportamentales (inmovilidad vs. actividad = escalada y natación) (Figura 6) con el software *Behavior Tracker* (EE.UU.), las ratas fueron asignadas a tres grupos de tratamientos diferentes en función de su tiempo de inmovilidad en el test basal con el objetivo de homogeneizar los grupos (tal y como se describe en el apartado 4.2.1 de materiales y métodos). Tras los 14 días de tratamiento, las ratas fueron sometidas al test de natación forzada (5 minutos en el agua, grabación de los vídeos con la conducta realizada) a la 1 h, 24 h y 3 días tras la última administración. Para garantizar un análisis imparcial, los vídeos se analizaron de forma ciega mediante el proceso descrito anteriormente.

4.4. Recogida de muestras cerebrales

Tras la decapitación, los cerebros de los animales se diseccionaron en una placa de aluminio a 4 °C. Los cerebros se cortaron de forma sagital para separar ambos hemisferios. El hemisferio izquierdo se congeló rápidamente en una solución de isopentano entre -20 y -30 °C y se almacenó a -80 °C para posteriormente cortarlo con el criostato a lo largo de toda la extensión del hipocampo (desde -1,72 a -6,80 mm de Bregma), en secciones de 30 µm que se iban montando en portaobjetos (8 secciones por portaobjetos). Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta que se realizó posteriormente el análisis de marcadores de génesis celular (Ki-67 y NeuroD) mediante técnicas de inmunohistoquímica. La mitad derecha se usó para diseccionar el hipocampo que se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C hasta su uso posterior en experimentos de western blot (FADD, Cdk-5, p35-p25).

4.5. Inmunohistoquímica

Se usó el marcador Ki-67 para determinar la tasa de proliferación celular (Cameron y McKay, 2001) y el NeuroD para identificar neuronas jóvenes inmaduras (Lee, 1997). Siguiendo un protocolo estandarizado (García-Fuster et al., 2010) las secciones de tejido de hipocampo (30 µm) se fijaron en paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y se incubaron durante 1 h a 90 °C en una solución de citrato de sodio al 10 % (pH 6,0) para la recuperación de antígenos (solo protocolo Ki-67). Después, tras realizar tres lavados con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) se procedió a realizar el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ al 0,3 %. Tras finalizar el bloqueo y realizar tres lavados con PBS, las secciones se incubaron en cámaras de

incubación durante 1 h con una solución bloqueadora constituida por albúmina de suero bovino (BSA) que contenía suero de cabra al 1% (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y Triton X-100 al 0,05 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Las uniones inespecíficas que forman las proteínas de la solución de BSA evitan las uniones inespecíficas del anticuerpo e incrementa la probabilidad de que solo se una a su respectivo antígeno. Después del bloqueo, las secciones se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con uno de los siguientes anticuerpos: (1) anticuerpo policlonal de conejo anti-Ki-67 (1:40000, proporcionado por la Dra. Huda Akil y el Dr. Stanley J. Watson, de la Universidad de Michigan, EE.UU.); (2) anticuerpo policlonal de cabra anti-NeuroD (N-19) (1:25000; Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.). Al día siguiente, tras tres lavados con PBS, las secciones se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-cabra biotinilado 1:1000 (Vector Laboratories, EE.UU.). El anticuerpo unido se detectó con el complejo Avidina/Biotina (kit Vectastain Elite ABC; Vectors Laboratories, EE.UU.) ya que el trazador enzimático Biotina con lugares de unión a Avidina se une al anticuerpo secundario biotinilado formando el complejo Avidina-Biotina-ABC. Finalmente, el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich, EE.UU.), con cloruro de níquel para el NeuroD, se utilizó para la visualización de la señal, ya que en presencia de la enzima peroxidasa, el DAB produce un precipitado marrón que es insoluble en alcohol. Finalmente, las secciones se tiñeron con violeta de cresyl (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (solo para Ki-67), se deshidrataron a través de un gradiente creciente de alcoholes (50, 70, 80, 95, 100 %), se sumergieron en xileno y se cubrieron con Permount® (Fisher Scientific, EE.UU.), un medio de montaje hidrofóbico. Para garantizar un recuento imparcial, todos los portaobjetos fueron codificados aleatoriamente antes de cuantificarlos. Las células inmunopositivas se contaron en cada una de las secciones (8 por portaobjetos) a lo largo de toda la extensión septo-temporal del hipocampo con un microscopio de luz Leica DMR (lente de objetivo 63X), enfocando a lo largo del grosor de la sección (30 µm). El área total cuantificada en cada sección, se midió con un densitómetro (GS-800 Imaging Calibrated densitometer, Bio-Rad), por lo que los resultados se expresan como el número total de células de proliferación celular (Ki-67 +) o neuronas inmaduras jóvenes (NeuroD +) en el giro dentado en función del área total analizada (mm²). Este método de cuantificación permite la comparación entre grupos de tratamiento con diferentes áreas de análisis (García-Cabrerizo et al., 2015), lo que es particularmente relevante cuando se comparan diferentes marcadores celulares.

4.6. Western blot

Para preparar las muestras para su análisis mediante técnicas de western blot, en primer lugar, se homogenizaron los hipocampos en un homogeneizador de aspas Ultraturax, en dos ciclos de 10 segundos, 1:10 peso/volumen de tampón de homogenización (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 mM EDTA; 2 % SDS) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Después, las muestras se sonicaron (2 ciclos de 5 segundos). De los homogenados obtenidos se recogieron alícuotas de 50 µl para determinar la concentración de proteínas totales presentes en cada muestra mediante la técnica del ácido bicinonínico. Para conocer las concentraciones proteicas de cada muestra, se preparó una recta patrón a partir de diferentes diluciones de albúmina bovina sérica (BSA) a concentraciones conocidas en un rango de 0 a 70 µg en un volumen total de 100 µl. Por otro lado, las muestras a cuantificar, se diluyeron con agua mili-Q (5 µl de muestra en 95 µl de agua mili-Q). Las muestras fueron procesadas por triplicado y la recta patrón por duplicado. Después, tanto a las diluciones de BSA como a las muestras se les añadieron 2 ml de una mezcla (50:1) de reactivo A (compuesto por BCA en 0,1 M de

hidróxido de sodio) y reactivo B (compuesto por 4 % de sulfato cúprico). Los tubos se incubaron 30 minutos a 37 °C en agitación y, posteriormente, se dejaron reposar a temperatura ambiente. Después, se midieron los valores de absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm. Este proporciona automáticamente los valores proteicos de las muestras al extrapolar sus absorbancias con las de la curva patrón mediante regresión no lineal. La media obtenida de los valores por triplicado se dividió por 5 para obtener el contenido (μg) en 1 μl . Finalmente se obtuvo la estimación final de la concentración de proteínas en cada muestra. Una vez determinada la concentración total de proteínas, las muestras se ajustaron con tampón de homogenización para alcanzar una concentración de 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las muestras se diluyeron 1:1 con el tampón de carga Laemmli 2x que contenía 100 mM Tris HCl pH 6,8, 3 % SDS, 20 % de glicerol, 5 % de β -mercaptoetanol y $\approx 0,1$ % de azul de bromofenol, alcanzando una concentración final de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Finalmente, las muestras se hirvieron durante 4 minutos a 95 °C para desnaturalizar las proteínas y se almacenaron a -80 °C o a -20 °C hasta su uso posterior.

Como se describe en García-Cabrerizo et al. (2015), las proteínas cerebrales totales (40 μg) de los homogenados de hipocampo de rata se separaron mediante la técnica de electroforesis en minigeles de SDS-PAGE al 10 % o al 12 % (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) (Figura 7). Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro. Tras la realización de tres lavados con PBS, las membranas se incubaron durante 1 h con una solución bloqueadora para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana e incrementar la probabilidad de que este se uniese a sus respectivos antígenos. Tras finalizar el bloqueo y realizar tres lavados con PBS, las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante toda la noche a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos: (1) anti-FADD (H-181) (1:5000; sc-5559; Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), (2) anti- β -actina (clon AC-15) (1:10000; Sigma-Aldrich, EE. UU.), (3) anti-Cdk5 (DC17) (1:1000; Lab Vision, EE.UU.) y (4) anti-p35 (Ab-C19) (1:3000; Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

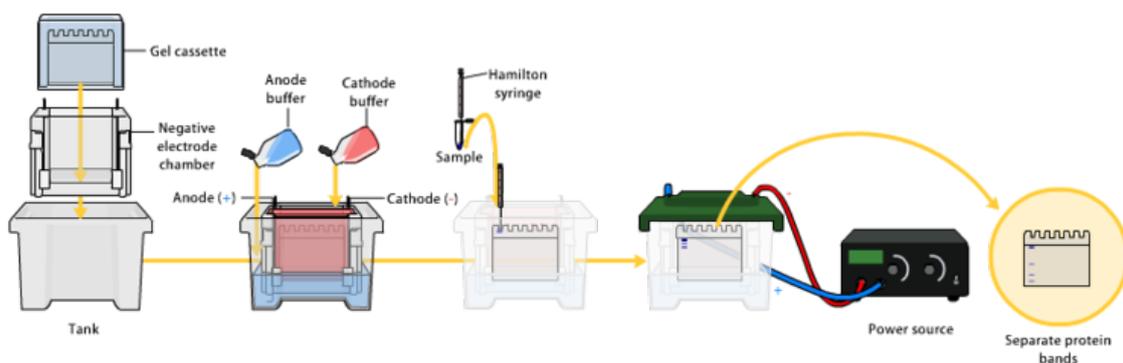


Figura 7. Esquema del proceso de electroforesis en minigeles de SDS-PAGE. Imagen tomada de Google

Al día siguiente, tras realizar tres lavados con PBS, las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón unido a peroxidasa de rábano 1:5000. La inmunorreactividad de las proteínas diana se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada ECL (Amersham, Reino Unido) y la señal emitida por el anticuerpo unido se visualizó al poner en contacto la membrana de nitrocelulosa (previamente incubada durante dos minutos en agitación con los reactivos de ECL) con una película fotográfica sensible a la luz azul (Hyperfilm, Amersham, Reino Unido), durante un periodo de tiempo variable (de 1 a 60 min). La cuantificación de los autorradiogramas se llevó a cabo mediante un escáner con

densitómetro (GS-800 Imaging Densitómetro calibrado, Bio-Rad). La cantidad de proteína diana en hipocampo de ratas sometidas a los distintos tratamientos fue comparada en el mismo gel con el de ratas de su respectivo grupo control. El procedimiento de cuantificación de cada muestra se realizó al menos 3 veces en geles diferentes, cada gel cargado con muestras cerebrales tanto de ratas de un determinado tratamiento como de su correspondiente grupo control. Finalmente, se calculó la variación en la inmunoreactividad de cada rata (variación de la densidad óptica integrada de cada muestra) sometida a cada tratamiento específico respecto a las muestras control (100 %) en distintos geles, usándose el valor medio como la estimación final. El contenido de β -actina se cuantificó como un control de carga ya que su contenido no se vio alterado por ningún tratamiento.

4.7. Análisis de los resultados

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism, versión 6. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos al presentar un nivel de probabilidad igual o inferior a 0,05 y se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). Los efectos del fármaco sobre la desesperación conductual y el peso del animal a lo largo del tiempo se evaluaron utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, donde el tratamiento (control, sub-agudo y sub-crónico) o el peso, y el tiempo post-tratamiento (1 h, 24 h y 3 días) se trataron como variables independientes, y seguido del post-hoc de comparaciones múltiples Bonferroni. Los efectos de la desipramina sobre la tasa de proliferación celular (Ki-67) y la supervivencia celular temprana (NeuroD) se evaluaron con un ANOVA de una o dos vías, seguido del post-hoc de comparaciones múltiples Bonferroni. Los resultados neuroquímicos se evaluaron con un ANOVA de dos vías, en el que el tratamiento (control, sub-agudo y sub-crónico) y el tiempo post-tratamiento (1 h y 24 h) se trataron como variables independientes, seguido del post-hoc Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre el peso corporal de los animales

Como se muestra en la Figura 8 (a, b), tanto en el primer estudio como en el segundo, la administración de desipramina durante 14 días indujo cambios en el peso corporal de los animales, tal como mostró la interacción significativa entre el tratamiento y los días de administración (Primer estudio: $F_{8,84} = 37,16$; $p < 0,0001$; Segundo estudio: $F_{8,128} = 124,5$; $p < 0,0001$). En particular, el análisis post-hoc reveló una disminución significativa del peso corporal en las ratas tratadas de forma sub-crónica con desipramina (14 x 10 mg/kg) con respecto al grupo control a partir del décimo día de tratamiento del primer experimento (días 10 y 13; $*p < 0,05$), y una disminución significativa del peso corporal con respecto del grupo control (días 9 y 12; $*p < 0,05$) y sub-agudo (día 9; $*p < 0,05$ y día 12; $*p < 0,05$) a partir del noveno día de tratamiento del segundo experimento. El tratamiento sub-agudo (3 x 20 mg/kg) no indujo cambios significativos en el peso corporal de los animales a lo largo del tratamiento ni en el primer estudio ni en el segundo ($p > 0,05$, Figura 8).

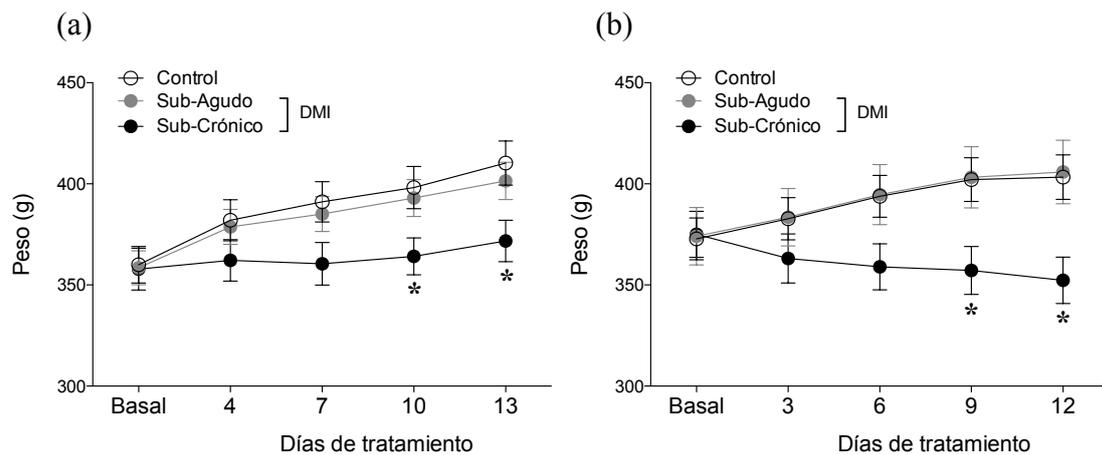


Figura 8. Efecto de la administración de la desipramina sobre el peso corporal de los animales, en el primer estudio (a) y en el segundo (b). La gráfica representa el cambio en el peso corporal de los animales (g) por día de tratamiento. Grupos experimentales: (1) Control (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 14 dosis, n=8-11), sub-agudo (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 12 dosis + 20 mg/kg de desipramina x 3 dosis, n=8-12) y sub-crónico (10 mg/kg de desipramina x 14 dosis, n=8-12). Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media del peso corporal de los animales (g). ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por el test post-hoc de Bonferroni, $*p < 0,05$ cuando se comparan las ratas tratadas con el grupo control. DMI: desipramina.

5.2. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la desesperación conductual

Los efectos temporales de la desipramina sobre la desesperación conductual se midieron como el incremento/reducción de la inmovilidad en el test de natación forzada. Aunque en los resultados no se observaron cambios significativos en el efecto del tratamiento sobre la desesperación conductual ($F_{2,19} = 3,34, p = 0,0572$), si se observó una interacción significativa entre el tiempo y el tratamiento ($F_{4,38} = 7,21, p = 0,0002$) y un efecto significativo del tiempo ($F_{2,38} = 19,8, p < 0,0001$) (Figura 9). En particular, el análisis post-hoc reveló una disminución significativa de la inmovilidad en el test de natación forzada, tanto en el grupo sub-agudo como en el grupo de administración sub-crónica con respecto al grupo control, tanto 1 h (sub-agudo: -104 ± 26 seg; sub-crónico: -109 ± 26 seg; $**p < 0.01$ vs. control) como 24 h (sub-agudo: -82 ± 28 seg; sub-crónico: -89 ± 24 seg; $*p < 0.05$ vs. control) post-tratamiento. A los 3 días post-tratamiento los niveles de inmovilidad de ambos grupos se equipararon a los del grupo control de tal forma que el efecto del antidepresivo sobre la mejora de la desesperación conductual dejó de observarse ($p > 0,05$, Figura 9).

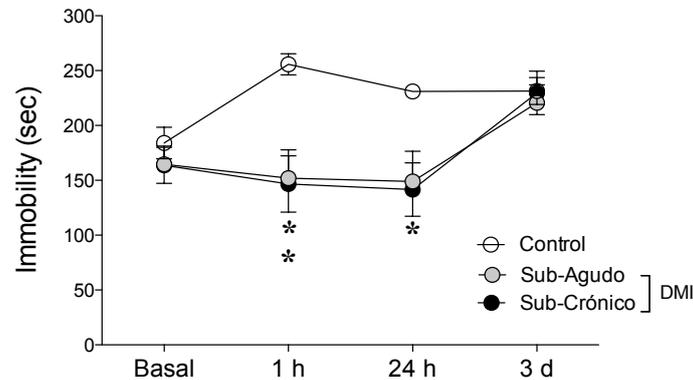


Figura 9. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la desesperación conductual en el test de natación forzada. Grupos experimentales: (1) control (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 14 dosis, n=8), sub-agudo (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 12 dosis + 20 mg/kg de desipramina x 3 dosis, n=8) y sub-crónico (10 mg/kg de desipramina x 14 dosis, n=8). Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media del tiempo (seg) de inmovilidad por tiempo post-tratamiento. ANOVA de dos vías seguido por el test post-hoc de Bonferroni, $**p < 0,01$ cuando se comparan las ratas tratadas con el grupo control 1 h post-tratamiento y $*p < 0,05$ cuando se comparan las ratas tratadas con el grupo control 24 h post-tratamiento. DMI: desipramina.

5.3. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proliferación celular y la supervivencia neuronal temprana hipocampal

Los resultados (Figura 10a) muestran como el tratamiento con desipramina ejerció un efecto significativo sobre la proliferación celular en el hipocampo de rata adulta (Células Ki-67 +/Área) ($F_{2,29} = 3,407$, $p = 0,0469$). Dado que el tiempo post-tratamiento no indujo un efecto significativo sobre la proliferación celular ($F_{1,29} = 0,0443$, $p = 0,8348$) ni interaccionó con el tratamiento antidepressivo ($F_{2,29} = 0,8120$, $p = 0,4538$), se decidió observar el efecto del tratamiento independientemente del tiempo de sacrificio de los animales, por lo que se juntaron los grupos de 1 h y 24 h post-tratamiento. Los resultados (Figura 10b) mostraron como el tratamiento con desipramina produjo un efecto significativo sobre la proliferación celular ($F_{2,32} = 3,438$, $p = 0,0444$). En concreto en el test post-hoc de Bonferroni se observó como la administración sub-crónica de desipramina (14 x 10 mg/kg) indujo un aumento significativo de la proliferación celular ($+7 \pm 3$ células Ki-67+/mm² vs. grupo control, $*p < 0,05$) con respecto del grupo control, un efecto que no se observó en el grupo tratado de forma sub-aguda con desipramina (3 x 20 mg/kg).

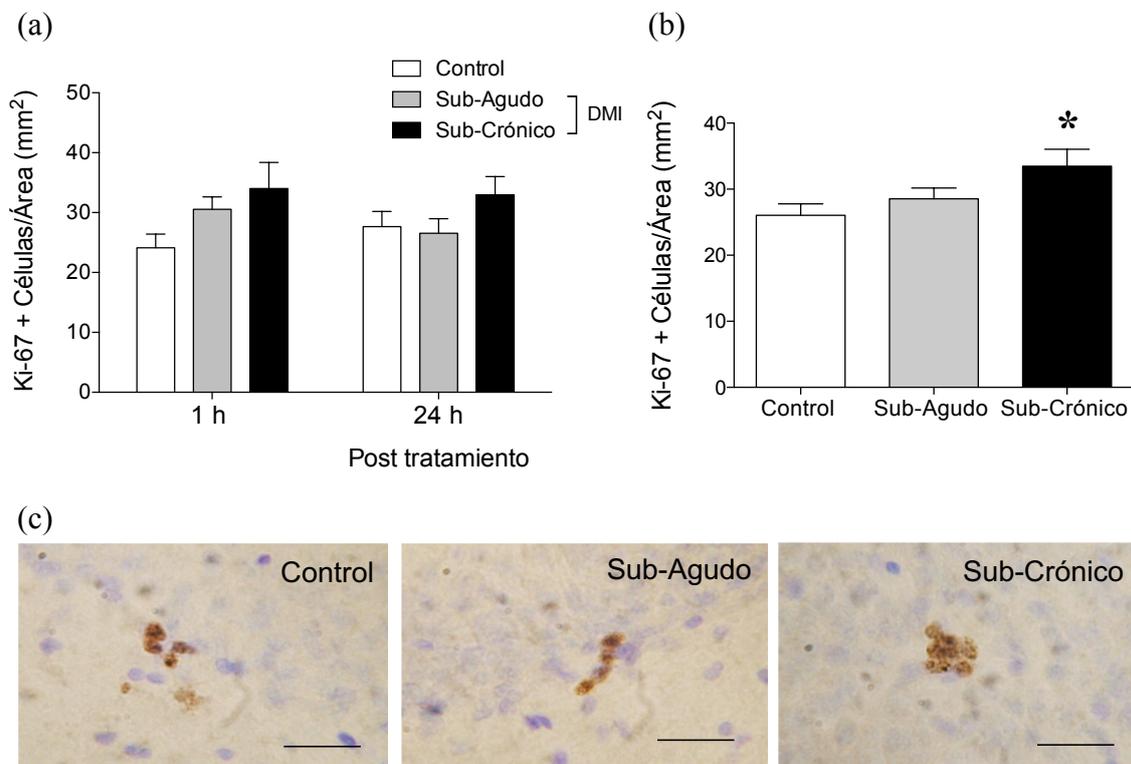


Figura 10. Curso temporal del efecto de la administración de desipramina sobre la proliferación celular. Análisis cuantitativo del número de células Ki-67 positivas por área cuantificadas 1 h y 24 h post-tratamiento (a) o juntando los grupos por tratamiento independientemente del tiempo (b). Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media del número de células Ki-67 +/área (mm²). ANOVA de dos vías o ANOVA de una vía seguido del test post-hoc Bonferroni, $*p < 0,05$ cuando se comparan las ratas tratadas con el grupo control. (c) Imágenes representativas de las células Ki-67 + marcadas en marrón dentro de la capa granular del giro dentado azul. La imagen representativa para cada grupo experimental se realizó con un microscopio óptico, utilizando el objetivo 63X. La escala de la barra es de 30 μ m. DMI: desipramina.

En el estudio de la supervivencia neuronal temprana hipocampal (Células NeuroD+/Área), no se observó un efecto significativo del tratamiento ($F_{2,29} = 2,358$, $p = 0,1125$), ni del tiempo post-tratamiento ($F_{1,29} = 0,3462$, $p = 0,5608$), ni una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo post-tratamiento ($F_{2,29} = 0,8166$, $p = 0,4518$) (Figura 11a).

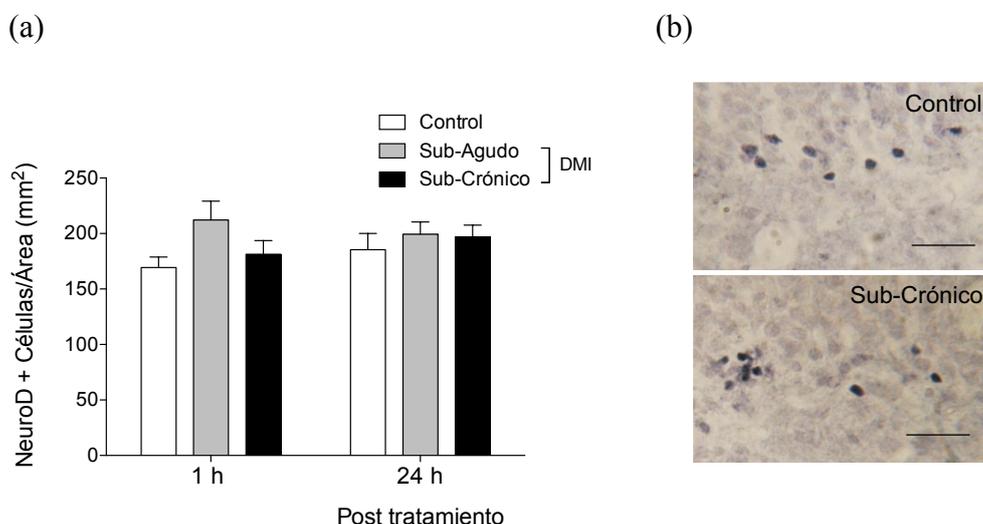


Figura 11. Curso temporal del efecto de la administración de desipramina sobre la diferenciación neuronal. Grupos experimentales: (1) Control (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 14 dosis, n=11), sub-agudo (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 12 dosis + 20 mg/kg de desipramina x 3 dosis, n=12) y sub-crónico (10 mg/kg de desipramina x 14 dosis, n=12). Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media del número de células NeuroD +/área por tiempo 1 h y 24 h post-tratamiento. ANOVA de dos vías. (b) Imágenes representativas de las células NeuroD + marcadas en azul oscuro dentro de la capa granular del giro dentado azul claro. La imagen representativa para cada grupo experimental se realizó con un microscopio óptico, utilizando el objetivo 63X. La escala de la barra es de 30 μ m. DMI: desipramina.

5.4. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proteína multifuncional FADD en hipocampo de rata

Como se muestra en la Figura 12, la administración de desipramina indujo cambios en los niveles de la proteína FADD, tal como mostró la interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo post-tratamiento ($F_{2,29} = 21,26$, $p < 0,0001$). En particular, tras el análisis post-hoc de Bonferroni se observó como la administración sub-aguda ($***p < 0,0001$) y sub-crónica ($**p < 0,01$) de desipramina fue capaz de inducir una disminución significativa en los niveles de la proteína FADD con respecto del grupo control en el hipocampo de rata, 1 h después de la última administración. Tras 24 h post-tratamiento, la administración sub-aguda del antidepresivo mostró un efecto rebote, aumentando significativamente los niveles de FADD ($**p < 0,01$) con respecto al grupo control, y para el grupo sub-crónico se dejó de observar el efecto significativo sobre los niveles de FADD ($p > 0,05$; Figura 12).

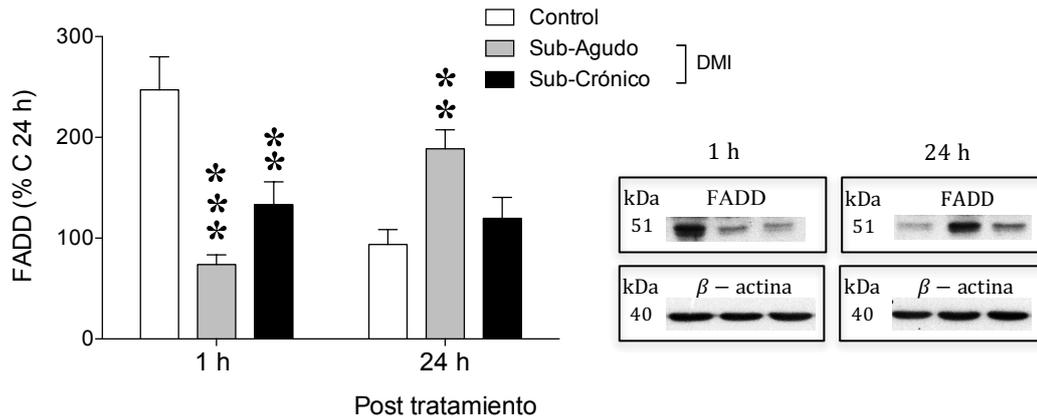


Figura 12. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proteína multifuncional FADD en hipocampo de rata. Grupos experimentales: (1) Control (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 14 dosis, n=11), sub-agudo (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 12 dosis + 20 mg/kg de desipramina x 3 dosis, n=12) y sub-crónico (10 mg/kg de desipramina x 14 dosis, n=12). Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media de los niveles de FADD 1 h y 24 h post-tratamiento y se expresan respecto al porcentaje de las ratas control 24 h post-tratamiento. ANOVA de dos vías seguido del test post-hoc Bonferroni. $***p < 0,0001$ y $**p < 0,01$ cuando se compara respectivamente el grupo sub-agudo y sub-crónico de desipramina con su grupo control respectivo. Se muestran western-blot representativos de los resultados obtenidos para los niveles de FADD y β -actina (representativos del control de carga).

5.5. Curso temporal de los efectos de la administración de desipramina sobre la proteína Cdk-5 y sus co-factores p35 y p25 en hipocampo de rata.

Como se muestra en la Figura 13a, la administración de desipramina indujo cambios en los niveles de Cdk-5 en el hipocampo de rata, tal como mostró la interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo post-tratamiento ($F_{2,29} = 5,141$, $p < 0,05$). En particular, tras el análisis post-hoc de Bonferroni se observó como la administración sub-aguda ($*p < 0,05$) y sub-crónica ($*p < 0,05$) de desipramina fue capaz de inducir una disminución significativa en los niveles de Cdk-5 con respecto del grupo control 1 h después de la última administración. A las 24 h post-tratamiento los niveles de Cdk-5 de ambos grupos (sub-agudo y sub-crónico) se equipararon a los del grupo control ($p > 0,05$).

La administración de desipramina también indujo cambios en los niveles de la proteína p35, tal como mostró la interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo post-tratamiento ($F_{2,29} = 5,351$, $p < 0,05$). En particular, en el análisis post-hoc de Bonferroni se observó como la administración sub-aguda ($*p < 0,05$) y sub-crónica ($*p < 0,05$) de desipramina fue capaz de inducir una disminución significativa en los niveles de p35 con respecto del grupo control 1 h post-tratamiento. A las 24 h, los niveles de p35 de ambos grupos se equipararon a los del grupo control, de tal forma que el efecto de la desipramina sobre p35 dejó de observarse ($p > 0,05$) (Figura 13b).

Por último, los resultados del análisis de los niveles de la proteína p25 revelaron un efecto significativo del tiempo post-tratamiento ($F_{1,29} = 8,513$, $p < 0,01$) sobre los niveles de p25, pero no se observó un efecto del tratamiento ($F_{2,29} = 2,452$, $p > 0,05$), ni una interacción del mismo con el tiempo post-tratamiento ($F_{2,29} = 0,2888$, $p > 0,05$) (Figura 13c).

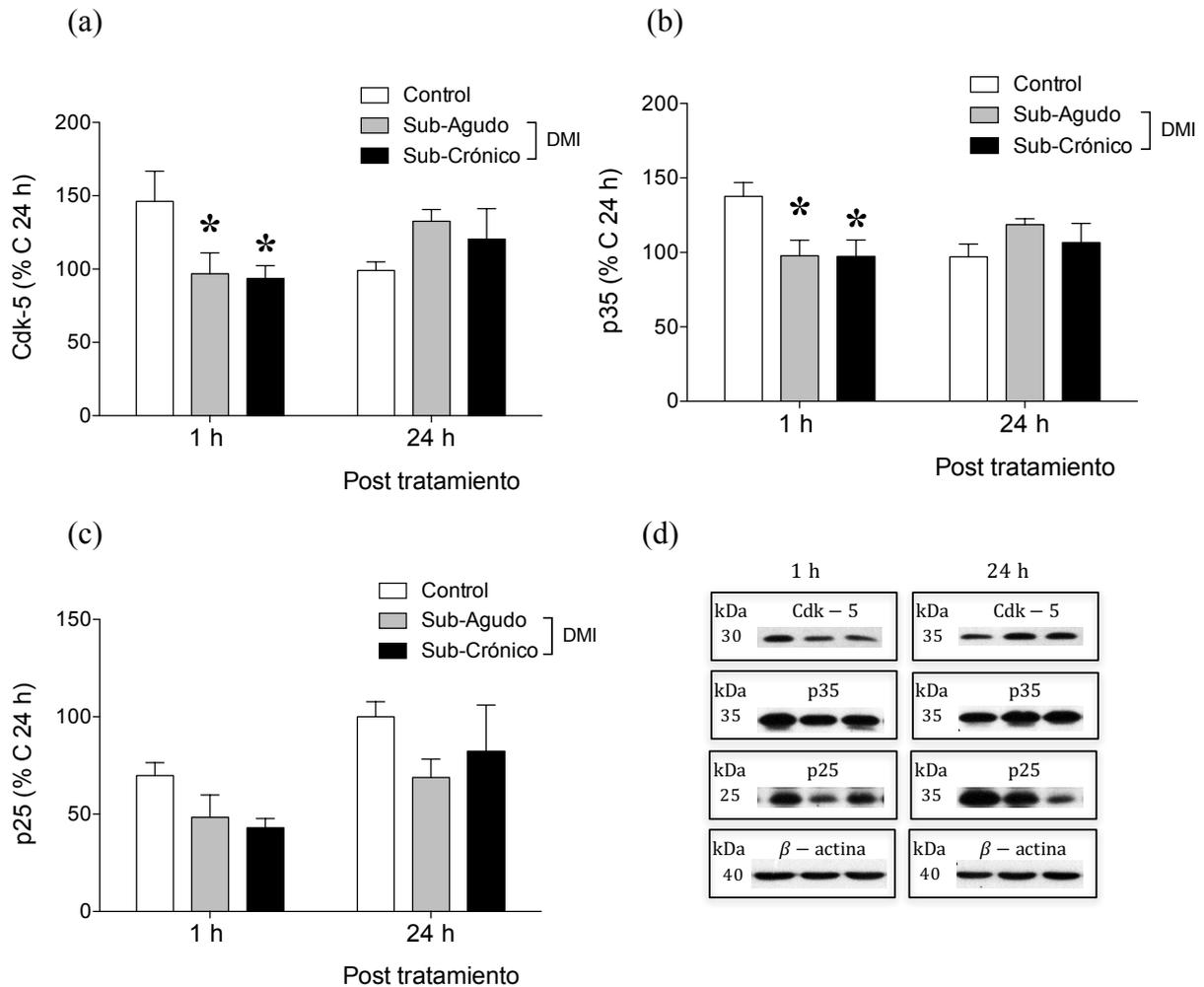


Figura 13. Curso temporal del efecto de la administración de desipramina sobre la proteína Cdk-5 y sus co-factores p35 y p25. Grupos experimentales: (1) Control (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 14 dosis, n=11), sub-agudo (1 ml/kg de NaCl 0,9% x 12 dosis + 20 mg/kg de desipramina x 3 dosis, n=12) y sub-crónico (10 mg/kg de desipramina x 14 dosis, n=12). Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media de los niveles de Cdk-5, p35 o p25 por tiempo post-tratamiento y se expresan respecto al porcentaje de las ratas control a las 24 h post-tratamiento. ANOVA de dos vías seguido del test post-hoc Bonferroni. $*p < 0,05$ cuando se compara respectivamente el grupo sub-agudo y sub-crónico de desipramina con el grupo control 1 h post-tratamiento. (d) Se muestran western-blot representativos de los resultados obtenidos para los niveles de Cdk-5, p35, p25 y β -actina (representativo del control de carga), 1 y 24 h post-tratamiento.

6. DISCUSIÓN

Los resultados principales obtenidos de este estudio realizado en ratas indican que la administración sub-aguda de desipramina es capaz de inducir un efecto antidepresivo tan potente y duradero como un paradigma más prolongado como es el tratamiento sub-crónico de 14 días. Sin embargo, existen diferencias en los cambios neuroquímicos inducidos por ambos tratamientos, mientras que tanto la administración sub-aguda como sub-crónica de desipramina regulan de manera similar ciertos marcadores neuroplásticos hipocámpales (i.e., disminución de los niveles de FADD, Cdk-5 y p35 en el hipocampo de rata 1 h post-tratamiento), solo la desipramina sub-crónica es capaz de modular de manera positiva los niveles de proliferación celular en el hipocampo. Además, solo la administración sub-crónica de desipramina produce una disminución en el peso corporal de los animales. A continuación, se discuten estos resultados en el contexto de la literatura existente.

Respecto al efecto observado sobre el peso corporal, los resultados obtenidos en el presente trabajo de fin de máster mostraron como la administración sub-crónica, pero no sub-aguda, de desipramina, produjo una disminución considerable del peso corporal de los animales, apreciable desde los primeros días de tratamiento en ambos experimentos. Estos resultados se ven respaldados por la literatura, donde no solo se ha demostrado que la desipramina produce una disminución significativa del peso corporal de los animales, sino que también es capaz de reducir significativamente la ingesta (Nobrega y Coscina, 1986). En este contexto, el tratamiento crónico con antidepresivos tricíclicos afecta al estado funcional de los sistemas neuroquímicos centrales que se encuentran implicados en el control del apetito y del comportamiento alimentario (Leibowitz, 1980), produciendo cambios bien documentados en la plasticidad sináptica y/o en la sensibilidad de los receptores en los sistemas noradrenérgicos y/o serotoninérgicos (Przegalinski y Mogilnicka, 1984).

Los resultados comportamentales revelaron que, tanto la administración sub-aguda como sub-crónica de desipramina fue capaz de inducir un efecto antidepresivo en ratas, disminuyendo los niveles de inmovilidad y mejorando el comportamiento activo, 1 h y 24 h post-tratamiento. Este efecto sobre la mejora en la desesperación conductual dejó de observarse 3 días post-tratamiento, donde los niveles de inmovilidad de ambos grupos se equipararon a los niveles del grupo control. Esto sugiere que el efecto de la desipramina presenta un curso temporal de 24 h y que transcurrido este tiempo los efectos del antidepresivo sobre la desesperación conductual se disipan. Estos resultados concuerdan con estudios realizados previamente, donde la administración sub-aguda de desipramina (3 x 20 mg/kg, 3 dosis en 24 h) produjo un efecto antidepresivo, reduciendo la inmovilidad y mejorando el comportamiento activo, concretamente la conducta de escalada (Detke y Lucki, 1997; García-Fuster y García-Sevilla, 2016) que se encuentra relacionada con los sistemas noradrenérgicos. Aunque el efecto antidepresivo ejercido en ratas por la desipramina sub-aguda estaba bien caracterizado, en la literatura existían hasta día de hoy muy pocos estudios en los que se hubiera estudiado su efecto tras la administración sub-crónica. Esto es importante ya que las evidencias clínicas indican que los antidepresivos producen efectos terapéuticos en pacientes deprimidos después de su administración crónica (3-4 semanas) (Frazer y Benmansour, 2002). La desipramina es un antidepresivo tricíclico relativamente selectivo que ejerce su acción a través de la inhibición de la receptación de noradrenalina y el subsiguiente aumento de la

concentración de la misma en el espacio extracelular (Frazer, 2000). A través de este mecanismo, la desipramina podría prevenir el comportamiento depresivo. En este contexto, recientemente se ha demostrado que el efecto de la desipramina se correlaciona con un aumento de la noradrenalina en la hendidura sináptica (Bravo et al., 2009), y que el tratamiento repetido con desipramina (15 mg/kg) induce una disminución de la expresión del transportador de noradrenalina en corteza cerebral e hipocampo y el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada (Zhao et al., 2008). Además, inhibiendo la síntesis de catecolaminas con α -metil-p-tirosina (inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa), se ha demostrado que el aumento de noradrenalina en el espacio sináptico es necesario para que se produzca un efecto antidepresivo persistente a nivel comportamental (Zhao et al., 2008). Por otro lado, la similitud observada en el efecto de la desipramina sobre la desesperación conductual después de los tratamientos sub-agudo y sub-crónico, parece indicar que los cambios producidos después de la administración sub-aguda ya han alcanzado un nivel que no se puede aumentar más con el tratamiento sub-crónico del antidepresivo. Esta hipótesis es consistente con la observación de que el mecanismo por el cual la desipramina reduce el tiempo de inmovilidad es similar, al menos en lo que respecta al sistema catecolaminérgico, cuando el fármaco se administra de forma sub-aguda o sub-crónica (Pulvirenti y Samanin 1986).

Mediante el estudio inmunohistoquímico se evaluaron distintos estadios de la neurogénesis hipocampal (índice de proliferación celular, Ki-67, y supervivencia neuronal temprana, NeuroD), y se observó que el tratamiento sub-crónico, pero no sub-agudo, con el antidepresivo desipramina fue capaz de inducir un aumento de la proliferación celular (células Ki-67 +) en el hipocampo de rata adulta. Estos hallazgos son consistentes con lo observado en otros estudios, donde la administración de desipramina promueve la neurogénesis hipocampal adulta y revierte el comportamiento inducido en el test de indefensa aprendida (modelo de depresión) (Chen et al., 2006). Además, se necesitan 14 días de administración consecutiva de desipramina para que se produzca un efecto en la proliferación celular del hipocampo, lo que podría estar relacionado con la aparición tardía de la acción terapéutica de los antidepresivos (Pechnick et al., 2011), y en línea con datos previos con otros antidepresivos que sugieren que para aumentar la neurogénesis hipocampal adulta se requiere un tratamiento crónico (Malberg et al., 2000). A pesar de que la administración sub-crónica de desipramina indujo un aumento en la proliferación celular, ni la administración sub-aguda ni sub-crónica del antidepresivo indujeron un aumento en la supervivencia neuronal temprana, siendo el número de neuronas jóvenes inmaduras (células NeuroD +) equiparable al obtenido en los animales del grupo control. Esto aporta nuevos datos a la literatura científica y se ve respaldado por estudios recientes que han demostrado que el tratamiento antidepresivo con otros antidepresivos como la fluoxetina, un inhibidor de la recaptación de serotonina, son capaces de aumentar la proliferación celular, pero no la diferenciación neuronal temprana en el hipocampo de rata (Bettio et al., 2016). En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento sub-crónico con desipramina produce un aumento de la proliferación celular en el hipocampo y que dicho aumento podría estar asociado con la mejora en la desesperación conductual observada en el test de natación forzada. Por tanto, a pesar de no observarse diferencias en la mejora conductual inducida tras el tratamiento sub-agudo y sub-crónico, sí existen diferencias neuroquímicas que podrían favorecer la administración de un paradigma más prolongado.

Los mecanismos subyacentes a la regulación de la neurogénesis hipocampal están siendo investigados activamente. En este contexto, los resultados obtenidos en el presente

estudio revelaron que tanto la administración sub-aguda como sub-crónica de desipramina indujo una disminución en los niveles de la proteína FADD en el hipocampo de rata 1 h post-tratamiento. Curiosamente, este efecto dejó de observarse e incluso se revirtió en el grupo tratado de forma sub-aguda con desipramina a las 24 h post-tratamiento, donde los niveles de la proteína aumentaron. En particular, la disminución de FADD coincide con la mejora en la desesperación conductual en el test de natación forzada, lo que sugiere que la proteína multifuncional FADD podría ser un posible mecanismo subyacente a la respuesta antidepresiva mediada por la administración tanto sub-aguda como sub-crónica de desipramina. Estudios recientes han demostrado que el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada se correlaciona con los niveles de FADD, lo que sugiere a esta proteína como un posible marcador de la desesperación conductual mediada en ratas (García-Fuster y García-Sevilla, 2016). Por otro lado, la disminución de la proteína FADD también coincide con el aumento de la proliferación celular inducido por la administración sub-crónica de desipramina. Esto sugiere que la regulación de la proteína FADD podría estar implicada en alguno de los mecanismos subyacentes a la regulación de la neurogénesis hipocampal inducida por la desipramina, como por ejemplo la disminución de la vía pro-apoptótica o mediando funciones de neuroplasticidad, otorgándole un papel crítico en la determinación de la muerte o supervivencia celular en el cerebro (García-Fuster et al., 2008). Sin embargo, se requieren más estudios para probar si FADD se encuentra verdaderamente implicado en la regulación de la neurogénesis inducida por los antidepresivos o si ambas regulaciones son mecanismos paralelos e independientes.

Otro posible mecanismo subyacente a la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta podría ser la regulación de la proteína Cdk-5. Los resultados del presente estudio revelaron que tanto la administración sub-aguda como sub-crónica de desipramina indujeron una disminución en los niveles de Cdk-5 y su co-activador p35 en el hipocampo de rata 1 h después de la última administración, un efecto que dejó de observarse 24 h post-tratamiento. La disminución de p35 podría relacionarse con un aumento de su producto de escisión p25, que es neurotóxico (Patrick et al., 1999), sin embargo, los resultados obtenidos revelaron que la desipramina no indujo cambios significativos en los niveles de p25 en el hipocampo 1 h y 24 h post-tratamiento. Esto sugiere que la disminución de Cdk-5 y su co-activador p35 podrían ser uno de los mecanismos a través de los cuales la desipramina induce una mejora en la desesperación conductual en el test de natación forzada. Esta hipótesis se ve respaldada por estudios recientes en los que se ha demostrado que la sobreexpresión de Cdk-5 en el hipocampo regula la ansiedad y el estado pro-depresivo. La microinyección de un inhibidor de Cdk-5 en el giro dentado del hipocampo bloqueó el efecto pro-depresivo inducido por estrés crónico leve, mientras que la sobreexpresión de p35 en el giro dentado bloqueó la acción antidepresiva de ciertos antidepresivos (Zhu et al., 2012). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la actividad de Cdk-5 no es necesaria en la proliferación o diferenciación de los precursores neuronales, pero sí lo es en la migración y maduración de las células neuronales inmaduras (Jessberger et al., 2008). Además, la eliminación genética de Cdk-5 en células precursoras del hipocampo reduce el número de neuronas maduras, sin afectar el número de neuronas inmaduras, lo que sugiere que dicha disminución en el número de neuronas maduras en ratones *knock out* para Cdk-5 resulta de una muerte celular aumentada (Lagace et al., 2008). Esto podría explicar que la administración sub-crónica de desipramina induzca un aumento en la proliferación celular, pero no una mejora en la supervivencia neuronal.

7. CONCLUSIONES

1. La administración de desipramina induce un efecto antidepresivo en ratas adultas al disminuir los niveles de desesperación conductual 1 y 24 h post-tratamiento. La magnitud de este efecto es similar tras la administración sub-aguda o sub-crónica.
2. La administración sub-crónica, pero no sub-aguda, de desipramina induce un aumento de la proliferación celular en el hipocampo de rata, lo que sugiere que la regulación de la neurogénesis hipocampal a través del aumento en la proliferación celular podría ser uno de los mecanismos de acción de la administración sub-crónica de desipramina para producir el efecto antidepresivo observado.
3. La administración sub-aguda o sub-crónica de desipramina produce una disminución de las proteínas FADD, Cdk-5 y p35 1 h post-tratamiento, lo que sugiere que la regulación de estas proteínas podría ser uno de los mecanismos de acción de la desipramina.

En su conjunto, los resultados sugieren que la regulación de los primeros estadios de la neurogénesis hipocampal adulta, como es la proliferación celular, podría ser uno de los mecanismos de acción de la administración sub-crónica, pero no sub-aguda, de la desipramina para producir una mejora en la desesperación conductual en ratas, y que las proteínas FADD, Cdk-5 y p35 podrían estar implicadas en alguno de los mecanismos subyacentes a la respuesta antidepresiva mediada por la administración tanto sub-aguda como sub-crónica de desipramina. Se requieren más estudios para completar estos resultados y profundizar en las diferencias observadas a nivel neuroquímico entre la administración sub-aguda y sub-crónica de desipramina, que podrían ayudar a entender el curso temporal del efecto antidepresivo observado en relación al efecto neurogénico.

8. AGRADECIMIENTOS

Los estudios incluidos en este trabajo de fin de máster se han financiado por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, proyecto 2012/011 (“Complicaciones derivadas del consumo de cocaína durante la adolescencia: Comorbilidad psiquiátrica en el adulto”), cuya investigadora principal es la Dra. M. Julia García Fuster. Además, estoy disfrutando de una beca de prácticas de verano García-Palmer del Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa), desde el 1 de julio hasta el 6 de septiembre de 2019.

Además, me gustaría agradecer a la Dra M. Julia García Fuster la oportunidad de realizar el presente trabajo de fin de master bajo su dirección, así como su apoyo y confianza en esta etapa científica. También me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio (Elena Hernández, Cristian Bis y Rubén García) por sus consejos, ayuda y paciencia, sin los que el presente trabajo no habría sido posible.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Balu, D. T., & Lucki, I. (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(3), 232-252.
- Bettio, L. E., Neis, V. B., Pazini, F. L., Brocardo, P. S., Patten, A. R., Gil-Mohapel, J., et al. (2016). The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. *European Journal of Neuroscience*, 43(8), 1006-1015.
- Bravo, J. A., Díaz-Veliz, G., Mora, S., Ulloa, J. L., Berthoud, V. M., Morales, P., et al. (2009). Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection. *Behavioural pharmacology*, 20(3), 273-285.
- Cameron, H. A., & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406-417.
- Chang, K. H., Vincent, F., & Shah, K. (2012). Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death. *J Cell Sci*, 125(21), 5124-5137.
- Chen, H., Pandey, G. N., & Dwivedi, Y. (2006). Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. *Neuroreport*, 17(9), 863-867.
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences*, 23(5), 238-245.
- Detke, M. J., Johnson, J., & Lucki, I. (1997). Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 5(2), 107.
- Dranovsky, A., & Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biological psychiatry*, 59(12), 1136-1143.
- Duman, R. S., Nakagawa, S., & Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*, 25(6), 836.
- Duman, R. S. (2004). Depression: a case of neuronal life and death?. *Biological psychiatry*, 56(3), 140-145.
- Frazer, A., & Benmansour, S. (2002). Delayed pharmacological effects of antidepressants. *Molecular psychiatry*, 7(S1), S23.
- Frazer A (2000). Norepinephrine involvement in antidepressant action. *J Clin Psychiatry* 61 (Suppl 10):25-30.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486.
- García-Fuster, M. J., Ramos-Miguel, A., Rivero, G., La Harpe, R., Meana, J. J., & García-Sevilla, J. A. (2008). Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short-and long-term human opiate abusers. *Neuroscience*, 157(1), 105-119.

- García-Fuster, M. J., Perez, J. A., Clinton, S. M., Watson, S. J., & Akil, H. (2010). Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *European Journal of Neuroscience*, *31*(1), 79-89.
- García-Fuster, M. J., Parks, G. S., Clinton, S. M., Watson, S. J., Akil, H., & Civelli, O. (2012). The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *European Neuropsychopharmacology*, *22*(8), 607-613.
- García-Cabrerizo, R., Keller, B., & García-Fuster, M. J. (2015). Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience*, *304*, 302-315.
- García-Fuster, M. J., & García-Sevilla, J. A. (2016). Effects of anti-depressant treatments on FADD and p-FADD protein in rat brain cortex: enhanced anti-apoptotic p-FADD/FADD ratio after chronic desipramine and fluoxetine administration. *Psychopharmacology*, *233*(15-16), 2955-2971.
- García-Fuster, M. J., & García-Sevilla, J. A. (2015). Monoamine receptor agonists, acting preferentially at presynaptic autoreceptors and heteroreceptors, downregulate the cell fate adaptor FADD in rat brain cortex. *Neuropharmacology*, *89*, 204-214.
- García-Cabrerizo, R., Bis-Humbert, C., & García-Fuster, M. J. (2018). Methamphetamine binge administration during late adolescence induced enduring hippocampal cell damage following prolonged withdrawal in rats. *Neurotoxicology*, *66*, 1-9.
- García-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Journal of neurobiology*, *36*(2), 234-248.
- Harlan, J., Chen, Y., Gubbins, E., Mueller, R., Roch, J. M., Walter, K., et al. (2006). Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. *Molecular psychiatry*, *11*(1), 76.
- Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF (1992) Neuronal cdc2-like kinase: A cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci USA* *89*:10867–10871.
- Hernández-Hernández, E., Miralles, A., Esteban, S., & García-Fuster, M. J. (2018). Repeated treatment with the α 2-adrenoceptor agonist UK-14304 improves cognitive performance in middle-age rats: Role of hippocampal Fas-associated death domain. *Journal of Psychopharmacology*, *32*(2), 248-255.
- Huang, Y. Y., Peng, C. H., Yang, Y. P., Wu, C. C., Hsu, W. M., Wang, H. J., & Chang, Y. L. (2007). Desipramine activated Bcl-2 expression and inhibited lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived adult neural stem cells. *Journal of pharmacological sciences*, *104*(1), 61-72.
- Jacobs, B. L., Van Praag, H., & Gage, F. H. (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular psychiatry*, *5*(3), 262.
- Jessberger, S., Aigner, S., Clemenson, G. D., Jr., Toni, N., Lie, D. C., Karalay, O., et al. (2008). Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus. *PLoS Biology*, *6*, e272.

- Jiang, W. G., Li, S. X., Zhou, S. J., Sun, Y., Shi, J., & Lu, L. (2011). Chronic unpredictable stress induces a reversible change of PER2 rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, *1399*, 25-32.
- Kang, E., Wen, Z., Song, H., Christian, K. M., & Ming, G. L. (2016). Adult neurogenesis and psychiatric disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *8*(9), a019026.
- Lagace, D. C., Benavides, D. R., Kansy, J. W., Mapelli, M., Greengard, P., Bibb, J. A., & Eisch, A. J. (2008). Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(47), 18567-18571.
- Lee, J.E., (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 13–20.
- Lee, H. J., Kim, J. W., Yim, S. V., Kim, M. J., Kim, S. A., Kim, Y. J., & Chung, J. H. (2001). Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Molecular psychiatry*, *6*(6), 725.
- Leibowitz, S. F. (1980). Neurochemical systems of the hypothalamus. Control of feeding and drinking behavior and water-electrolyte excretion. In: *Handbook ~" the Hypothalamus*, vol 3, Part A. Behavioral Studies oJ'the Hypothahmms. edited by P, J. Morgane and J. Panksepp. New York: Marcel Dekker, pp. 299—343.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* *20*(24), 9104–9110.
- McEwen BS (1999): Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* *22*:105–122
- Miguel-Hidalgo, J. J., Whitton, A., Villarreal, A., Soni, M., Meshram, A., Pickett, J. C., et al & Stockmeier, C. A. (2014). Apoptosis-related proteins and proliferation markers in the orbitofrontal cortex in major depressive disorder. *Journal of affective disorders*, *158*, 62-70.
- Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Malberg, J. E., Chen, J., Steffen, C., & Duman, R. S. (2002). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *Journal of Neuroscience*, *22*(9), 3673-3682.
- Nobrega, J., & Coscina, D. V. (1987). Effects of chronic amitriptyline and desipramine on food intake and body weight in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *27*(1), 105-112.
- Park, S. M., Schickel, R., & Peter, M. E. (2005). Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Current opinion in cell biology*, *17*(6), 610-616.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de La Monte, S., Dikkes, P., & Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, *402*(6762), 615.
- Pechnick, R. N., Zonis, S., Wawrowsky, K., Cosgayon, R., Farrokhi, C., Lacayo, L., & Chesnokova, V. (2011). Antidepressants stimulate hippocampal neurogenesis by inhibiting p21 expression in the subgranular zone of the hippocampus. *PLoS one*, *6*(11), e27290.
- Porsolt, R. D.; Anton, G.; Blavet, N.; Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur. J. Pharmacol.* *47*:379–391.

- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 229(2), 327-336.
- Pulvirenti, L., & Samanin, R. (1986). Antagonism by dopamine, but not noradrenaline receptor blockers of the anti-immobility activity of desipramine after different treatment schedules in the rat. *Pharmacological research communications*, 18(1), 73-80.
- Sahay, A., & Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience*, 10(9), 1110.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., & Belzung, C. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *science*, 301(5634), 805-809.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, et al. (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17501–17506.
- Scaffidi, C., Volkland, J., Blomberg, I., Hoffmann, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (2000). Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *The Journal of Immunology*, 164(3), 1236-1242.
- Shah, K., & Lahiri, D. K. (2014). Cdk5 activity in the brain—multiple paths of regulation. *J Cell Sci*, 127(11), 2391-2400.
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., & Vannier, M. W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 3908-3913.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S. (1992). BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *Journal of neurocytology*, 21(3), 185-197.
- Tourneur, L., & Chiocchia, G. (2010). FADD: a regulator of life and death. *Trends in immunology*, 31(7), 260-269.
- Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae T, Harlow E (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:419 – 423.
- Van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030.
- Warner-Schmidt, J. L., & Duman, R. S. (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16(3), 239-249.
- Wong, M. L., & Licinio, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(5), 343.
- Zhao, Z., Baros, A. M., Zhang, H. T., Lapiz, M. D. S., Bondi, C. O., Morilak, D. A., & O'donnell, J. M. (2008). Norepinephrine transporter regulation mediates the long-term behavioral effects of the antidepressant desipramine. *Neuropsychopharmacology*, 33(13), 3190.
- Zhu WL, Shi HS, Wang SJ, Xu CM, Jiang WG, Wang X, Wu P, Li QQ, Ding ZB, Lu L (2012) Increased Cdk5/p35 activity in the dentate gyrus mediates depressive-like behaviour in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 15: 795– 809. CrossRef Medline

10. APÉNDICE

Trabajo experimental presentado en el congreso *European College of Neuropsychopharmacology* (ECNP), 7-10 de octubre, Dinamarca

Evaluation of the time-course effects exerted by desipramine on behavioral despair and hippocampal neurogenesis in rats

Sandra Ledesma Corvi⁽¹⁾, M^a Julia García-Fuster⁽¹⁾

⁽¹⁾IUNICS, University of the Balearic Islands, and IdISBa, Palma, Spain

sandra.ledesma1@estudiant.uib.es

Purpose: The recent observation that adult hippocampal neurogenesis is decreased by stress and increased by chronic antidepressants suggested that this process may be involved in both the pathogenesis and treatment of mood disorders ^[1]. In this regard, desipramine (DMI), a typical tricyclic antidepressant that increases the concentrations of monoamine neurotransmitters in the synaptic cleft through inhibiting the reuptake of serotonin and norepinephrine ^[2], can reverse stress levels in rodents and promote hippocampal neurogenesis ^[3]. The present study evaluated the time-course effects exerted by different dosing paradigms of DMI on improving behavioral despair in the forced swim test (FST), and its possible association with the regulation of hippocampal neurogenesis.

Methods: Two parallel experiments with a total of 59 male Sprague-Dawley rats were performed. Rats from both experiments (n=24 and 35 respectively) were separated in 3 experimental groups: (1) control rats received 14 days of saline (0.9% NaCl, 1ml/kg, i.p., n=8-11), (2) sub-acute DMI rats received 12 days of saline (0.9% NaCl, 1ml/kg, i.p.) followed by 3 doses of 20 mg/kg of DMI in the course of 2 days (i.p., n=8-12), and (3) repeated DMI rats received 14 days of DMI (10 mg/kg, i.p., n=8-12). Rats from the first study were used to evaluate the effects of DMI on behavioral despair and were tested prior to any drug treatment (basal levels) and following 1 h, 24 h and 3 days post-treatment. Rats from the second study were used to determine changes in hippocampal neurogenesis induced by DMI that might parallel changes in behavior and were either killed by decapitation 1 h (n=17, 6 rats/group) or 24 h (n=18, 6 rats/group) after the last injection. Cell genesis markers (e.g., Ki-67, NeuroD) were evaluated in the left-half brain by immunohistochemistry.

Results: DMI decreased immobility in the FST 1 h (sub-acute DMI: -104 ± 26 sec; repeated DMI: -109 ± 26 sec; $**p < 0.01$ vs. control-treated rats) and 24 h (sub-acute DMI: -82 ± 28 sec; repeated DMI: -89 ± 24 sec; $*p < 0.05$ vs. control-treated rats) post-treatment. This antidepressant-like effect was dissipated 3 days post-treatment. The main molecular results showed that repeated (combined data at 1 and 24 h post-treatment), but not sub-acute, DMI increased hippocampal cell proliferation (repeated DMI: $+7 \pm 3$ Ki-67 +cells; $*p < 0.05$ vs. control-treated rats). No effects were observed in the survival of newborn neurons by sub-acute or repeated DMI treatment.

Conclusions: The present results demonstrate a temporal antidepressant-like effect induced by DMI, that lasts up to 24 h post-treatment and presents a similar magnitude of change following sub-acute or repeated administration. However, a repeated DMI paradigm (14 consecutive injections) is needed to observe an increase in hippocampal

cell proliferation (Ki-67 +cells), thus suggesting that the regulation of hippocampal neurogenesis might be one of the downstream events following repeated but not sub-acute DMI administration.

Disclosure statement: Grant 2016/002 (MSSSI, Spain) to MJGF. MJGF is a member of RETICS-RTA (RD16/0017/010; Insituto de Salud Carlos III, MINECO, Spain).

References:

[¹] Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., ... & Belzung, C. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *science*, 301(5634), 805-809.

[²] Jiang, W. G., Li, S. X., Zhou, S. J., Sun, Y., Shi, J., & Lu, L. (2011). Chronic unpredictable stress induces a reversible change of PER2 rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, 1399, 25-32.

[³] Chen, H., Pandey, G. N., & Dwivedi, Y. (2006). Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. *Neuroreport*, 17(9), 863-867.