



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina

A coronal MRI scan of a rat brain, showing the cerebral cortex, hippocampus, and other structures. The image is rendered in a color scale from red to yellow, highlighting different tissue densities. The brain is centered in the frame, with the skull visible around the edges.

**APORTACIONES DE LA BULBECTOMÍA
OLFATORIA BILATERAL EN LA RATA
A LA NEUROBIOLOGÍA Y
TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN**

Antonio Rodríguez Gaztelumendi
Santander, 2010

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina



TESIS DOCTORAL

**APORTACIONES DE LA BULBECTOMÍA
OLFATORIA BILATERAL EN LA RATA A LA
NEUROBIOLOGÍA Y TRATAMIENTO
DE LA DEPRESIÓN**

Antonio Rodríguez Gaztelumendi

Santander, 2010



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Departamento de Fisiología y Farmacología

Dn. Ángel Pazos Carro, Catedrático de Farmacología y Dn. Álvaro Díaz Martínez, Profesor Titular de Farmacología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Cantabria,

Certifican:

Que Dn. Antonio Rodríguez Gaztelumendi, Licenciado en Biología ha realizado la Tesis Doctoral titulada “APORTACIONES DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA BILATERAL EN LA RATA A LA NEUROBIOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN”, bajo nuestra dirección y supervisión en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina.

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

Y para que conste a los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmamos este certificado en Santander a 2 de noviembre de 2009.

Firma: Ángel Pazos Carro

Firma: Álvaro Díaz

A María Luisa

Agradecimientos

Acordarse de toda la gente a la que uno le tiene que agradecer su apoyo o su ayuda en el transcurso de estos cinco años y medio de tesis es muy complicado, y me será imposible agradecerérselo a todas esas personas. Pero al menos en este par de páginas espero acordarme de aquellos que ahora, a cinco mil quilómetros de distancia de Santander, más me vienen a la cabeza, ya sea por su ayuda en el trabajo o por sus continuos ánimos en los buenos y malos momentos.

En primer lugar debo agradecer sobre todo a Álvaro Díaz por confiar en mí desde el primer momento, por iniciarme en la vida científica, y porque por encima de todas las cosas se ha convertido en mi amigo.

A Ángel Pazos por hacerme sentir como un becario más de su grupo de investigación desde el principio, y por toda la ayuda y consejos que han hecho que finalmente esta tesis pueda estar escrita, al fin.

A Pepi, por toda la ayuda prestada en mis comienzos, a Elsa por toda la ayuda con los westerns, a Ricardo por ser siempre el primero en ayudar y a Elena Castro porque la biblioteca sin ella sería mucho más aburrida y porque la echo de menos a primera hora de la mañana.

A Javier Ayesta y a Maruja Hurlé, porque siempre he tenido la sensación de ser uno más de vuestros grupos. Por supuesto, gracias a toda la gente de vuestros laboratorios, Miriam, Susana, Cecilia, Lara, Raquel, Ana, Nieves, David y Aquilino. Sobre todo a Mónica, con la que he pasado innumerables ratos riendo y otros no tanto.

A Chris, porque él ha sido el sprint final y tan necesario de la tesis, y por aportarme una enorme dosis de tranquilidad en estos últimos tiempos tan tormentosos.

Al resto de sufridores en silencio. Maigüi, Marcos, Jorge, Nacho, Vanessa, Montse, Sonia, Juanan, Lore, las Paulas, Adán, Ana y sobre todo a Nuria a Héctor y a Javi que por algo los conozco desde hace ya doce años. Todos habéis hecho que estos años hayan sido mucho más llevaderos.

A Dani, Andrés, Marta y Mar por amenizar los largos ratos de estabulario.

A Begoña, Seve, Bea, Aly por todo este tiempo.

A Isa y a Jesús, gracias a su trabajo en las inmunos he podido concluir esta tesis, a Rebeca Madureira por ser mi Lady western favorita.

A Helena y a Patri. Los ratos pasados con vosotras han sido de lo mejor que voy a recordar de estos años en Santander, hermosas. Helena, ojalá hubieras venido antes, Patri, ojalá te hubieras quedado más.

A Ruth Pena, por enseñarme tanto del laboratorio al principio, y porque a pesar del tiempo siempre estarás ahí.

A Eva, Carmen, Noemí, Vero, Fuen, y sobre todo Lulu y Rebeca. Gracias a todas por ser un respiro en los peores momentos y por las risas en los buenos. Vero, Fuen, Lulu, Reme... espero que nos sigamos viendo mucho aunque ya no estemos por ahí.

A Oscar, Jose Ramón, Marta, Jose Antonio y todos aquellos amigos de la carrera que siempre se han preocupado por mí.

A Chus y a Emilio. Los consejos de sabios en el club Sayato han logrado que mis pasos me conduzcan por el camino recto. Parece que las cosas acaban por evolucionar.

A Luis, Tina, Flor, Jose, Pili, Félix y demás familia. Gracias por vuestro apoyo y por darme siempre ánimos. A Héctor, por ser mi sobrino favorito.

A mis tíos, tías y abuelas que os habéis preocupado por mí. A David y sobre todo a Jano, a quien admiro. Que la suerte acompañe siempre a Nicrom y a Talos en sus viajes.

A mi hermano, quien siempre me ha aconsejado que hiciera lo que me gustara, y a mis padres, por darme una educación y transmitirme unos valores que he intentado seguir.

Al profesor Tolkien, a George Lucas y a Gary Gygax. A R.A.Salvatore, Robert E. Howard, Akira Toriyama y Stan Lee. A Galendil y a Aalok. A todos aquellos que me han ayudado a tomarme un respiro, y a veces a inspirarme en muchos momentos difíciles.

Por último, y la más importante, gracias a María Luisa, porque nadie como tú sabes cuánto me ha costado lograr terminar esta tesis. Sin ti, no habría habido manera de hacerlo. Gracias por tu cariño y tu comprensión en casa, y por tu compañía y por tu trabajo en el laboratorio. Esta tesis es tanto mía como tuya.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1.- Depresión	3
1.1.- Importancia sanitaria y socioeconómica	3
1.2.- Clasificación y diagnóstico de la depresión	4
1.3.- Factores de riesgo: ambiente <i>versus</i> genes.....	5
1.4.-Neurobiología de la depresión: desde la hipótesis neuroquímica a la neurogenética. Utilidad de modelos animales.....	7
2.- Sistemas de neurotransmisión implicados en la neurobiología y tratamiento de la depresión	8
2.1.- Sistema serotoninérgico	9
2.1.1.- Síntesis y almacenamiento de serotonina	9
2.1.2.- Liberación y metabolización de la serotonina	10
2.1.3.- Las vías serotoninérgicas centrales.....	10
2.1.4.- Transportador de serotonina (5-HTT).....	12
2.1.5.- Subtipos de receptores serotoninérgicos: 5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} y 5-HT _{2A}	14
2.1.5.1- Receptor 5-HT _{1A} ,	15
Características estructurales.....	16
Distribución	18
Farmacología del receptor 5-HT _{1A}	19
Sistemas efectores y segundos mensajeros	20
2.1.5.2- Receptor 5-HT _{1B} ,.....	25
Características estructurales.....	25
Distribución	26
Farmacología del receptor 5-HT _{1B}	27
Sistemas efectores y segundos mensajeros	29
2.1.5.3. Receptor 5-HT _{2A} ,.....	30
Características estructurales.....	30
Distribución	31
Farmacología del receptor 5-HT _{2A}	32
Sistemas efectores y segundos mensajeros	33
2.2.- Sistema endocannabinoide.....	34
2.2.1.- Receptor CB ₁	36
Características estructurales.....	36

Distribución	37
Farmacología del receptor CB ₁	38
Sistemas efectores y segundos mensajeros	39
2.3.- Cambios en los sistemas serotoninérgico y cannabinoide relacionados con la depresión:	
estudios postmortem en humanos	42
2.3.1.- Receptores serotoninérgicos y transportador de serotonina.....	42
2.3.2.- Sistema endocannabinoide: receptor CB ₁	43
2.3.3.- Interrelación entre los sistemas endocannabinoide y serotoninérgico: implicación en la neurobiología y tratamiento de la depresión.....	44
3.- Mecanismo de acción de los antidepresivos.....	46
3.1.- Generalidades.....	46
3.2.- Modos de acción de los antidepresivos.....	48
3.2.1.- Inhibición de la recaptación: bloqueo del transportador de 5-HT.....	49
3.2.2.- Bloqueo de autorreceptores	50
3.2.3.- Bloqueo de receptores postsinápticos	52
3.2.4.- Inhibición de la monoamino oxidasa	52
3.2.5.- Efectos de la recaptación de serotonina y noradrenalina	53
4.- Bulbectomía olfatoria bilateral en la rata como un modelo animal de depresión crónica	54
4.1.- Anatomía del sistema olfatorio en la rata.....	54
4.2.- Cambios en los sistemas de neurotransmisión en la rata bulbectomizada	59
4.2.1.- Sistema serotoninérgico.....	59
4.2.2.- Sistema noradrenérgico	61
4.2.3.- Otros neurotransmisores clásicos: acetilcolina, glutamato y GABA	61
4.2.4.- Sistema endocannabinoide-receptor CB ₁	63
4.3.- Cambios inmunológicos tras la bulbectomía	64
4.4.- Cambios en vías relacionadas con neurogénesis y plasticidad neuronal.....	65
4.5.- Cambios conductuales en la rata bulbectomizada.....	66
4.5.1.- Actividad locomotora y exploratoria	66
4.5.2.- Aprendizaje y memoria.....	67
4.5.3.- Otros cambios conductuales	67
4.6.- Cambios conductuales en ratas bulbectomizadas tras la administración crónica de antidepresivos.....	68

5.- Hipótesis neurogenética de la depresión.....	70
5.1.- Alteraciones estructurales en trastornos emocionales.....	70
5.2.- Regulación de la neurogénesis en el adulto.....	71
5.3.- El estrés disminuye la neurogénesis adulta.....	72
5.4.- El tratamiento con antidepresivos incrementa la neurogénesis en adultos.....	73
5.5.- Factores implicados en la regulación de neurogénesis adulta.....	74
5.5.1.- Factores neurotróficos.....	74
5.5.2.- Regulación por serotonina.....	74
5.5.3.- Cascada de señalización celular -CREB.....	75
OBJETIVOS.....	77
MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
1.- Animales de experimentación.....	83
2.- Grupos experimentales.....	83
3.- Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral.....	84
4.- Tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina.....	85
5.- Protocolo o cronograma experimental.....	86
6.- Estudios conductuales: test del campo abierto.....	87
7.- Estudios de autorradiografía de receptores en SNC.....	88
7.1.- Preparación de tejidos para los estudios de autorradiografía anatómica y funcional.....	88
7.2.- Autorradiografía anatómica.....	88
7.2.1.- Autorradiografía del transportador de serotonina (5-HTT): fijación de [³ H]-citalopram.....	88
7.2.2.- Autorradiografía del receptor 5HT _{1A} : fijación de [³ H]-8-OH-DPAT.....	89
7.2.3.- Autorradiografía del receptor 5HT _{1B} : fijación de [³ H]-GR125,743.....	90
7.2.4.- Autorradiografía del receptor 5HT _{2A} : fijación de [³ H]-ketanserina.....	90
7.2.5.- Autorradiografía del receptor CB ₁ : fijación de [³ H]-CP55,940.....	91
7.3.- Autorradiografía funcional: fijación de [³⁵ S]GTPγS.....	92
7.3.1.- Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{1A} : estimulación de la fijación de [³⁵ S]-GTPγS por el agonista 5HT _{1A} (±)-8-OH-DPAT.....	92
7.3.2.- Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{1B} : estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS por el agonista 5HT _{1B/D} GTI.....	92
7.3.3.- Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{2A} : estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS por el agonista 5HT _{2A} TCB-2.....	93

7.3.4.- Autorradiografía funcional del receptor CB ₁ : estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS por el agonista CB ₁ WIN 55212-2.....	94
7.4.- Generación de los autorradiogramas.....	95
7.5.- Análisis de los datos de los autorradiogramas.....	96
8.- Estudios de fijación de radioligandos en homogenizados de membranas.....	96
8.1.- Preparación de homogeneizados de membranas de corteza prefrontal.....	97
8.2.- Fijación de [³ H]-CP55,940 en membranas de corteza prefrontal.....	97
8.3.- Estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS en membranas de corteza prefrontal por el agonista CB ₁ WIN 55,212-2.....	98
8.4.- Análisis de datos.....	99
9.- Estudios de hibridación <i>in situ</i> del receptor TrkB y de BDNF.....	99
9.1.- Pretratamiento de los tejidos para la hibridación <i>in situ</i>	99
9.2.- Marcado de la sonda.....	100
9.3.- Purificación de la sonda.....	101
9.4.- Ensayo de hibridación.....	101
9.5.- Lavado de los portas.....	102
9.6.- Cuantificación densitométrica y análisis estadístico.....	102
10.- Estudios de expresión de proteínas mediante Western Blot.....	103
10.1.- Preparación de tejidos.....	103
10.2.- Preparación de geles de acrilamida.....	103
10.3.- Electroforesis y transferencia.....	104
10.4.- Bloqueo con anticuerpos.....	105
10.5.- Cuantificación densitométrica y análisis estadístico.....	105
11.- Inmunohistoquímica de β-catenina por DAB en cerebro de rata.....	106
11.1.- Preparación de tejidos.....	106
11.2.- Inmunohistoquímica de β-catenina.....	106
11.3.- Cuantificación y análisis estadístico.....	107
12.- Estudios de neurogénesis: inmunofluorescencia de Brdu en cerebro de rata.....	108
12.1.- Preparación de tejidos.....	108
12.2.- Inmunofluorescencia de la BrdU.....	108
12.3.- Cuantificación y análisis estadístico.....	109

RESULTADOS	111
1.- Alteraciones conductuales inducidas por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata	113
1.1.- Evaluación conductual a los 15 días de la bulbectomía olfatoria.....	113
1.1.1- Deambulaciones.....	113
1.1.2- Alzamientos.....	116
1.1.3.- Acicalamientos	117
1.1.4.- Defecaciones.....	117
1.2.- Patrón temporal del síndrome de bulbectomía olfatoria: evaluación conductual a los 15, 30, 45 y 90 días postcirugía	118
2.- Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina sobre las alteraciones conductuales inducidas por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata	119
2.1.- Deambulaciones	120
2.2.-Alzamientos	121
2.3.- Acicalamientos.....	121
2.4.- Defecaciones.....	122
3.- Estudios autorradiográficos anatómicos y funcionales	123
3.1.- Autorradiografía anatómica y funcional del sistema serotoninérgico	124
3.1.1- Autorradiografía anatómica del 5-HTT: fijación de [³ H]-citalopram	124
3.1.2- Autorradiografía anatómica del receptor 5-HT _{1A} : fijación de [³ H]-8-OH-DPAT ...	129
3.1.3.- Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{1A}	133
3.1.4.- Autorradiografía anatómica del receptor 5-HT _{1B} : fijación de [³ H]-GR125743	141
3.1.5.- Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{1B}	145
3.1.6.-Autorradiografía anatómica del receptor 5-HT _{2A} : fijación de [³ H]-ketanserina.....	151
3.1.7.- Autorradiografía funcional del receptor 5-HT _{2A}	155
3.2.- Autorradiografía anatómica y funcional del sistema endocannabinoide: receptor CB ₁	159
3.2.1- Autorradiografía anatómica del receptor CB ₁ : fijación de [³ H]-CP55,940.....	159
3.2.2.- Autorradiografía funcional del receptor CB ₁	161
4.- Estudios fijación de radioligandos en homogenizados de membranas de corteza prefrontal	171
4.1.- Fijación de [³ H]-CP55,940 a receptores CB ₁ en membranas de corteza prefrontal	171
4.2.- Estimulación de la fijación de [³⁵ S]GTPγS binding por el agonista cannabioide WIN 55,212-2 en membranas de corteza prefrontal.....	173

5.- Estudios de marcadores moleculares relacionados con plasticidad neuronal y neurogénesis	174
5.1.- Estudios de hibridación <i>in situ</i> (HIS).....	174
5.1.1- Hibridación <i>in situ</i> de BDNF.....	175
5.1.2.- Hibridación <i>in situ</i> del receptor TrkB para BDNF.....	177
5.2.- Estudio del curso temporal de la expresión de marcadores moleculares implicados en plasticidad neuronal y neurogénesis hipocampal en la rata bulbectomizada mediante técnicas de western-blot	179
5.2.1- AKT.....	180
5.2.2.- Receptor TrkB	180
5.2.3- ERK/pERK	182
5.2.4.- CREB/pCREB	183
5.2.5- β -catenina	184
5.3.- Estudios de expresión de proteínas implicadas en plasticidad neuronal y neurogénesis hipocampal por técnicas de western-blot: efecto de la bulbectomía olfatoria y del tratamiento crónico con fluoxetina	184
5.3.1.- AKT.....	184
5.3.2.- Receptor TrkB	185
5.3.3.- ERK/pERK	186
5.3.4.- CREB/pCREB	187
5.3.5- β -catenina	188
6.- Estudios inmunocitoquímicos en el hipocampo de rata	190
6.1.- Marcaje de β -catenina en hipocampo de rata: inmunohistoquímica por DAB	190
6.2.- Marcaje de BrdU en hipocampo de rata: inmunofluorescencia de células BrdU ⁺	192
DISCUSIÓN	195
1.- Alteraciones conductuales del síndrome de bulbectomía olfatoria bilateral en la rata: efecto de la administración crónica de fluoxetina	197
2.- Cambios adaptativos en el sistema serotoninérgico inducidos por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata: efecto de la administración crónica de fluoxetina	203
2.1.- Transportador de serotonina: 5-HTT	203
2.2.- Receptor 5-HT _{1A}	211
2.3.- Receptor 5-HT _{1B}	222
2.4.- Receptor 5-HT _{2A}	231

3.- Cambios adaptativos en el sistema endocannabinoide (receptor CB₁) inducidos por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata y efecto de la administración crónica de fluoxetina:	236
4.- Cambios adaptativos en las vías de plasticidad neuronal y neurogénesis inducidos por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata: efecto de la administración crónica de fluoxetina	242
4.1.- Receptor TrkB y factor BDNF.....	243
4.2.- AKT	246
4.3.- ERK/pERK	247
4.4.- CREB/pCREB	248
4.5.- β -catenina	250
4.6.- BrdU	251
4.7.- Correlación entre los cambios en la conducta y los marcadores de neuroplasticidad	253
CONCLUSIONES	255
BIBLIOGRAFÍA	261

INTRODUCCIÓN

1. Depresión

1.1. Importancia sanitaria y socioeconómica

La civilización helénica fue la primera que introdujo términos como manía y melancolía. Sin embargo, el significado moderno de los mismos sólo tiene unos 100 años; muchos de esos términos usados en psiquiatría, incluyendo neurosis, psicosis, manía y melancolía cambiaron a inicios del siglo XX. La diagnosis de la depresión como tal no existió hasta esa fecha; asimismo, desde la Primera Guerra Mundial, la diagnosis de la manía entró a formar parte del diagnóstico del trastorno maníaco-depresivo.

La depresión es una enfermedad neuropsiquiátrica caracterizada por una alteración del afecto que sufren cientos de millones de personas en todo el mundo. Las previsiones de la Organización Mundial de la Salud en su informe sobre las enfermedades causantes de discapacidad y bajas laborales indican que para el año 2020 la depresión mayor será una de la principales patologías responsables, ocupando el segundo lugar tras las cardiopatías isquémicas (Kullkarni y Dhir, 2009). Puede desarrollarse a cualquier edad desde la infancia hasta la vejez, supone un tremendo coste a la sociedad y, si no es tratada, puede incluso conducir a la muerte. La psicopatología de la depresión comprende una serie de síntomas como el ánimo decaído, la anhedonia y la fatiga. Otros síntomas, como los trastornos del sueño y psicomotores, los sentimientos de culpabilidad, la baja autoestima, las tendencias suicidas y los trastornos gastrointestinales suelen también estar presentes. La depresión no es una enfermedad homogénea, sino un fenómeno complejo, que comprende muchos subtipos y más de una etiología, incluyendo desde una predisposición a trastornos del ánimo a depresiones con diferencias en la intensidad de la sintomatología (desde cuadros ligeros a severos), con y sin características psicóticas, así como asociada a otros trastornos psiquiátricos y somáticos (Manji y Lenox, 2000).

Los datos hablan de un padecimiento de la depresión por parte de un 20% de la población con una ratio entre sexos de 5:2, siendo mucho más acusado en mujeres que

hombres. Típicamente, el cuadro de la enfermedad es recurrente, y si bien la mayoría de pacientes se recuperan de la depresión mayor, aproximadamente un 10% continúan deprimidos después de 10 años. Entre los pacientes que se recuperan, hay una alta proporción de recurrencia, y un 75% vuelve a sufrir un cuadro depresivo en un período de 10 años.

El suicidio es un riesgo considerable de mortalidad dentro de la depresión, entre un 10 y un 20%, siendo la tasa de suicidios más alta entre las edades de 15-24 años. Además, numerosos estudios han demostrado una relación entre la depresión y aquellos trastornos cardiovasculares que presentan una mortalidad incrementada: la depresión incrementaría el riesgo de desarrollar alteraciones cardíacas, en particular relacionadas con la patología coronaria.

Otro rasgo muy importante de la depresión es la alta tasa de comorbilidad compartida con otras alteraciones psiquiátricas y/o neurológicas. La ansiedad, en particular, está muy frecuentemente asociada con alteraciones afectivas (Katon y Roy-Byrne, 1991) también es muy frecuente encontrar en la práctica clínica el binomio depresión-dolor crónico (Bair et al., 2003).

1.2. Clasificación y diagnóstico de la depresión

Hoy día, la esencia del trastorno depresivo mayor es un cuadro clínico que se caracteriza por uno o más episodios de depresión mayor sin características o episodios maníacos, de acuerdo con el criterio de el “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Health, Fourth Edition (DSM-IV)*”. Para una diagnosis apropiada, cinco de los nueve síntomas descritos en el DSM-IV deben estar presentes de una forma continuada durante un período mínimo de dos semanas:

1. Ánimo deprimido
2. Pérdida de interés o placer
3. Alteración del peso corporal y/o apetito

4. Insomnio o hiposomnia
5. Alteración o retardo psicomotor
6. Fatiga o pérdida de energía
7. Sentimientos de inutilidad, o falta de valor
8. Indecisión, dificultad de concentración
9. Ideas suicidas.

Históricamente, ha habido mucha controversia sobre la clasificación de la depresión. Dos conceptos diferentes, el de enfermedad de Emil Kraepelin y el de manifestación de enojo y decaimiento de Sigmund Freud fueron los dos puntos de vista opuestos al principio del siglo XX. Fue mérito de Sir Martín Roth el contribuir al entendimiento de la depresión, clasificando la manifestación clínica de la depresión (desde ligera a severa) y separándola en dos distintos subtipos, endógena y reactiva. Este concepto se usó durante décadas en la investigación psiquiátrica con objeto de identificar etiológicamente diferentes subtipos de la enfermedad depresiva. Las ediciones recientes del DSM-IV, y el *International Statistical Classification of Diseases, 10th Revisión (ICD-10)* distinguen los trastornos unipolares (depresivos) de los bipolares (maníaco-depresivos).

1.3. Factores de riesgo: ambiente *versus* genes

La influencia del estrés crónico y de los eventos vitales adversos en el desarrollo y desencadenamiento de la depresión han estado estrechamente ligados desde los inicios de la investigación de esta enfermedad (Nestler et al., 2002).

Hay suficientes evidencias en estudios con familias, gemelos, y adopciones que nos permiten afirmar que existen factores genéticos que juegan un papel muy importante en la etiología de los trastornos afectivos, especialmente en trastornos bipolares, donde la heredabilidad puede llegar a contribuir un 80% a la posible aparición de la enfermedad. La herencia de estos genes no sigue una genética mendeliana clásica en la que un gen o un grupo de genes pueden aumentar el riesgo de

padecer la enfermedad, sino más bien sería un trastorno complejo, con multitud de genes que interactúan entre sí y/o con una amplia variedad de factores ambientales que incrementarían la probabilidad de padecer la depresión. Un problema añadido es que hay dificultades para establecer un fenotipo clínico de la enfermedad. A pesar de ello, hay estudios prometedores que han identificado regiones en cromosomas relacionados con trastornos bipolares como pueden ser el 4, 5, 12, 18, 21, y el cromosoma X.

Por su parte, la influencia genética en la depresión unipolar es menos clara que en la bipolar. Aunque los estudios en gemelos han demostrado una heredabilidad sustancial de la probabilidad de padecer depresión, los factores ambientales parecen contribuir mucho más a la aparición de la enfermedad que en la depresión bipolar. Así pues, se ha propuesto que existe una tendencia genética muy influenciada por los eventos vitales adversos para la posible aparición de la enfermedad (Nestler et al., 2002).

El estudio de genes implicados en la depresión incluye aquellos que codifican para diversas proteínas del sistema serotoninérgico, como son los polimorfismos del recaptador o transportador de serotonina (5-HTT) y de algunos de los receptores serotoninérgicos (Bellivier et al., 1998). Se ha estudiado la posible asociación entre la predisposición suicida de los enfermos deprimidos y los polimorfismos de las siguientes proteínas del sistema serotoninérgico: el transportador de serotonina (5-HTT, alelo 5-HTTLPR), el receptor 5-HT_{1B} (G861C), el receptor 5HT_{2A} (T102C) y el enzima triptófano hidroxilasa (THP) de la ruta biosintética de la 5-HT. Algunos estudios apuntan a una clara asociación de la tendencia suicida en deprimidos con el polimorfismo para el 5-HTT (Du et al., 1999; Anguelova et al., 2003). Otros estudios demuestran una mayor asociación de la tendencia suicida, de un mayor nivel de agresión y de una neurotransmisión serotoninérgica deficitaria con los polimorfismos para la TPH pero ninguna asociación con los polimorfismos para el 5-HTT (Arango et al., 2003). También se ha encontrado una asociación positiva entre el polimorfismo del 5-HTT y la respuesta al tratamiento con antidepresivos ISRS (tipo fluoxetina) (Min et al, 2009). Hasta la fecha, no parece haberse encontrado una clara asociación del riesgo de padecer depresión/suicidio o de la respuesta al tratamiento con los polimorfismos para los receptores 5-HT_{1B} y 5HT_{2A} (Arango et al., 2003).

1.4. Neurobiología de la depresión: desde la hipótesis neuroquímica a la neurogenética. Utilidad de los modelos animales

A pesar de que la depresión es el trastorno neuropsiquiátrico diagnosticado con mayor frecuencia, todavía no se conocen con detalle las bases patogenéticas y neurobiológicas (Manji et al., 2001; Nemeroff, 2002; Nestler et al. 2002) por las que se produce la enfermedad. La mayor parte del conocimiento procede del estudio, tanto en el ser humano como en el animal de experimentación, de las acciones de los fármacos eficaces en el tratamiento de la depresión, principalmente aquellos que modulan los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica cerebral (Vetulani y Nalepa, 2000; Nutt, 2002; Nemeroff y Owens, 2002). De hecho, es ya clásica la teoría de la hipofunción de estos sistemas monoaminérgicos (teoría monoaminérgica de la depresión), en particular el serotoninérgico (5-HT) y el noradrenérgico (NA) (Bunney y Davis, 1965; Schildkraut, 1965; Coppen, 1969). Esta hipótesis está basada en las acciones que los antidepresivos tienen sobre los niveles cerebrales de estas monoaminas, sobre los cambios inducidos en la funcionalidad de sus receptores y en los hallazgos correspondientes en muestras postmortem de pacientes deprimidos (Arango et al., 1990; Meyer et al., 1999; González-Maeso et al., 2002).

Sin embargo, en los últimos años se ha visto que la hipótesis clásica tiene sus limitaciones y que la causa última de los trastornos afectivos es mucho más compleja que el simple hecho de una alteración en la actividad de los sistemas de neurotransmisión. De hecho cada vez hay más evidencias experimentales que apuntan al papel que ciertos sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico, pueden jugar en la modulación de otros sistemas neurobiológicos implicados en la depresión, en particular sobre los mecanismos que gobiernan la supervivencia y la plasticidad neuronal (Duman et al., 1997; Manji et al. 2001; Farvolden et al., 2003).

Por otra parte y desde el punto de vista de la investigación básica, una de las principales limitaciones en la comprensión de la neurobiología de la depresión y del mecanismo de acción íntimo de los antidepresivos es la carencia de modelos animales capaces de simular la depresión humana desde sus aspectos etiológicos hasta las

manifestaciones sindrómicas que definen este cuadro afectivo (Willner, 1990; McKinney y Bunney, 1969; Richardson, 1991) El modelo de la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata, objeto de estudio de esta tesis, es posiblemente el único modelo de lesión del SNC que representa un proceso neurodegenerativo en el que se propone la existencia de una disfunción en varios sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema serotoninérgico (Kelly et al., 1997; Song y Leonard, 2005). Además, las manifestaciones conductuales de este modelo preclínico de depresión son revertidas tras el tratamiento crónico, y no agudo, de una amplia variedad de antidepresivos efectivos en clínica, lo que le confiere una clara validez predictiva (Song y Leonard, 2005). Estas características lo han hecho tremendamente interesante a la hora de investigar de forma integrada, valiéndose de herramientas farmacológicas, cuál es el grado de implicación de varios sistemas de neurotransmisión en la interrelación entre alteraciones conductuales, cambios neuroquímicos y consecuencias neurobiológicas.

2. Sistemas de neurotransmisión implicados en la neurobiología y el tratamiento de la depresión

Existen una gran variedad de sistemas de neurotransmisión implicados en la patología depresiva, como pueden ser la familia de monoaminas (noradrenalina, adrenalina, dopamina y serotonina), los sistemas glutamatérgico y GABAérgico, diversos neuropéptidos como la sustancia P, la hormona liberadora de tiroxina (TRH) o la galanina, entre otros. En esta tesis nos hemos centrado en el sistema de neurotransmisión serotoninérgica (particularmente el transportador de serotonina 5-HTT y los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}), por ser el sistema de neurotransmisión más estudiado tanto en pacientes deprimidos como en varios modelos animales de depresión, además de ser la diana terapéutica de la mayoría de los fármacos antidepresivos utilizados actualmente en clínica. También nos hemos decidido por estudiar el sistema endocannabinoide (receptor cannabinoide CB₁) tanto por las múltiples evidencias de interrelación con el sistema serotoninérgico como por ser un sistema de neurotransmisión relativamente novedoso y que podría representar una

herramienta farmacológica prometedora para el tratamiento de enfermedades como la depresión.

2.1. Sistema serotoninérgico

2.1.1. Síntesis y almacenamiento de serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino. Fue aislada e identificada en el plasma en 1948 por Rapport et al. (1984) y en las células cromafines del intestino en 1952 (Rapport y Virno, 1952).

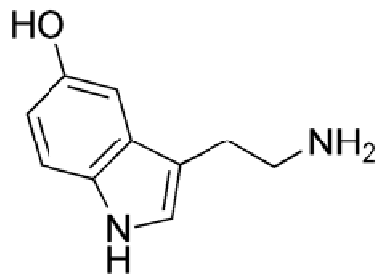


Figura 1. Estructura química de la 5-HT

Se sintetiza en las células enterocromafines y en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central (SNC) pero también se localiza en las plaquetas, donde es almacenada por un mecanismo de transporte activo. La síntesis tiene lugar a partir del aminoácido L-triptófano de la dieta. Este es captado por la célula y en su interior es oxidado en el C5 del anillo indólico mediante la triptófano hidroxilasa, que lo convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTTP). Este paso, limitante de la síntesis de serotonina, necesita como cofactores oxígeno molecular y teridina. El 5-HTTP sufre la descarboxilación de la cadena lateral por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD) y es convertido en 5-hidroxitriptamina. Una vez sintetizada, la serotonina es almacenada en las vesículas, estando así protegida de enzimas intracelulares como la MAO, y unida a ATP y cationes divalentes (Flórez y Pazos, 2008).

2.1.2. Liberación y metabolización de la serotonina

En el SNC la liberación de la 5-HT se produce en la terminación nerviosa por despolarización y entrada de calcio iónico en la terminal sináptica. Una parte de la serotonina liberada actúa sobre receptores específicos, otra difunde al espacio extracelular y otra es recaptada por la propia terminación nerviosa. La serotonina es metabolizada primero por la MAO (subtipo A) y posteriormente la enzima aldehído deshidrogenasa para convertirse en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que difunde al espacio extracelular y al líquido cefalorraquídeo (LCR). Cada vez es más frecuente el hallazgo de células que contienen simultáneamente serotonina así como otros neurotransmisores o neuroreguladores (sustancia P, dopamina, prostaglandinas, etc.); su papel, entre otros, podría ser el de modular la liberación de serotonina (Flórez y Pazos, 2008)

2.1.3. Las vías serotoninérgicas centrales

Los somas de las neuronas serotoninérgicas en el SNC están agrupados en núcleos localizados en la región medial y paramedial a lo largo del tronco del encéfalo, formando los denominados núcleos del rafe. A partir de su distribución en la rata han sido numerados de B1 a B9, siendo esta distribución similar en otras especies animales y también en la humana.

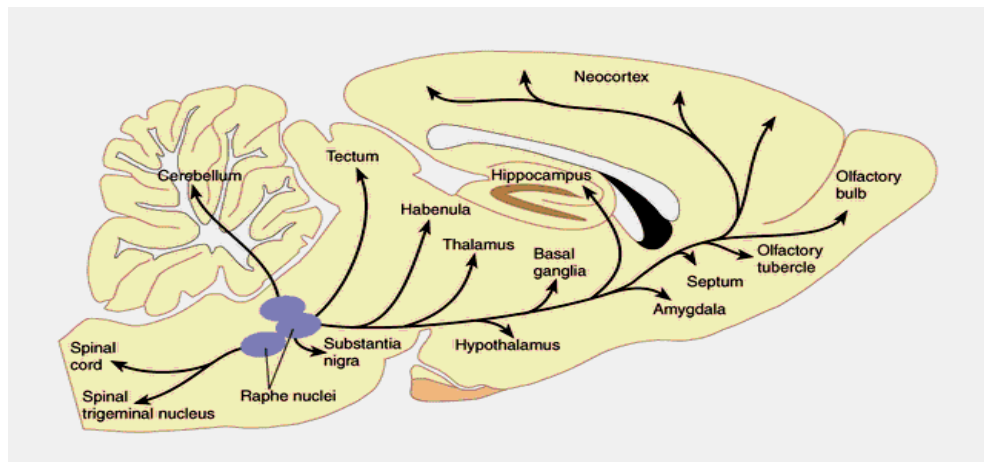


Figura 2. Principales vías serotoninérgicas que tienen su origen en los núcleos del rafe y sus múltiples proyecciones hacia áreas corticales, límbicas, cerebelo, otros núcleos del tronco cerebral y médula espinal.

Las principales vías serotoninérgicas (Flórez y Pazos, 2008) son las siguientes:

a) Vía ascendente ventral

Está originada en los núcleos B6 y B8, que forman parte del núcleo ventral superior, y en el B7 localizado en el núcleo dorsal del rafe. A través del mesencéfalo emite proyecciones al núcleo interpeduncular y a la sustancia negra, a los núcleos habenuar, talámico medial, parafascicular y de la línea media; al hipotálamo lateral, cuerpo mamilar, los núcleos caudado-putamen y a la corteza cerebral. Por delante del hipotálamo, la vía ascendente ventral se divide en varias proyecciones que llegan a diversas estructuras del cerebro límbico: a) la región preóptica, el séptum, el tubérculo olfatorio y la corteza frontal; b) por el asa peduncularis, el núcleo de la banda diagonal de Broca, la amígdala y la corteza entorrinal; c) el núcleo accumbens y partes anteriores del caudado y putamen; d) a lo largo del cíngulo, hasta el hipocampo.

b) Vía ascendente dorsal

Nace en los siguientes grupos celulares: el B3, que forma parte del núcleo magno del rafe, el B5 en los núcleos pontinos del rafe, y el B6. Proyecta hacia la sustancia gris periacueductal y el área hipotalámica posterior. Algunas fibras alcanzan también la superficie ependimaria de los ventrículos cerebrales y los plexos coroideos.

c) Vía cerebelosa

Sale de los núcleos B5 y B6 hacia la corteza y los núcleos profundos del cerebelo.

d) Vía descendente propiobulbar

Desde los núcleos B6 a B8 y B3 a B5 envía proyecciones a otros núcleos del tronco: el locus coeruleus, la formación reticular bulbar y pontina, el núcleo tegmental dorsal y el complejo olivar.

e) Vía descendente bulboespinal

Partiendo de los núcleos B1 a B3 (núcleos oscuro, magno y ambiguo del rafe) desciende por los cordones anteriores y laterales de la médula, para terminar en las astas anteriores y posteriores de la médula y en el núcleo intermediolateral.

2.1.4. Transportador de serotonina (5-HTT)

El transportador de serotonina (5-HTT) es una proteína de membrana que intercambia selectivamente serotonina junto con iones (Na^+ y Cl^-) hacia el interior de la célula e iones K^+ hacia el exterior de la célula utilizando la diferencia en el potencial de membrana (Rudnick y Clark, 1993). Constituye el primer paso del reciclaje de la molécula de serotonina; además la neurotransmisión termina cuando deja de haber neurotransmisor en la hendidura sináptica, bien porque se degrada o bien porque se recapta hacia las mismas células que lo liberaron, y por lo tanto es necesaria la presencia de un sistema de transporte.

Gracias a la clonación del gen que codifica el transportador de noradrenalina se pudo identificar una nueva familia de genes para las proteínas transportadoras de neurotransmisores, entre las que se encuentra el 5-HTT. Está compuesto por 12 dominios transmembrana, con 5 bucles intracelulares y 6 extracelulares y tanto el extremo amino-terminal como el carboxi-terminal, se encuentran en el citoplasma. El 5-HTT es un miembro de la familia de genes SLC6 designada como familia de importadores de sodio de los neurotransmisores (NSS). Dentro de esta familia hay varios transportadores más que se encargan de la recaptación de neurotransmisores como glicina, GABA, dopamina, noradrenalina y serotonina a través de la membrana plasmática de las neuronas y de las células gliales (Rudnick y Clark, 1993).

El 5-HTT se encuentra distribuido ampliamente por todo el cerebro, y se le puede encontrar en áreas corticales, tubérculos olfatorios, núcleo accumbens, septo, hipocampo dorsal y ventral, tálamo, hipotálamo y amígdala (Hebert et al., 2001). Por técnicas autorradiográficas usando [^3H]imipramina (Cortés et al., 1988; Kovachich et al., 1988), [^3H]paroxetina (Cortés et al., 1988), [^{11}C]DASB (Hipolide et al., 2005) y [^3H]citalopram (D'Amato et al., 1987) se ha visto que se encuentra tanto en las terminaciones axonales como también en los somas de las neuronas serotoninérgicas, encontrándose las densidades más elevadas en los núcleos del rafe, especialmente el rafe dorsal. También se encuentra en estriado, tálamo y en la corteza entorrinal. El

ARNm de este transportador se localiza principalmente en los núcleos del rafe y también en el núcleo hipotalámico dorsomedial (Hoffman et al., 1998).

El 5-HTT presenta sitios de fijación para 5-HT, Na⁺ y un sitio de unión para los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). La fijación de Na⁺ al transportador incrementa la afinidad por la serotonina (modulación alostérica positiva) mientras que la fijación de un ISRS la disminuye (modulación alostérica negativa), inhibiendo su unión y por lo tanto aumentando los niveles de 5-HT en el espacio sináptico (Rudnick y Clark, 1993).

Debido a su capacidad para descender los niveles de 5-HT en el medio sináptico, éste transportador es una importante diana farmacológica usada en el tratamiento de diversas enfermedades mentales, como la depresión. Hay diversos fármacos ISRS que inhiben directamente el 5-HTT, desarrollados a partir de los conocimientos adquiridos en la investigación de la fluoxetina, como son sertralina, paroxetina, citalopram y fluvoxamina. Además de fármacos específicos para el 5-HTT, otros fármacos como cocaína o las anfetaminas afectan al transportador. La cocaína actúa como un inhibidor del 5-HTT así como de los transportadores de noradrenalina y dopamina (Gu et al., 1994).

A lo largo de los años, se han descrito numerosas interacciones entre los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico y noradrenérgico en varios modelos animales (Pujol et al., 1978; Agren et al., 1986) así como en diversos casos clínicos de depresión (Agren et al., 1986; Potter, 1996). Algunas de estas interacciones ocurren a nivel receptorial postsináptico debido a cambios en los niveles endógenos de los neurotransmisores o a modificaciones en la expresión de las proteínas receptoriales. Sin embargo, también pueden deberse a alteraciones a nivel presináptico causadas por cambios específicos en ambos transportadores. De hecho hay fármacos que son inhibidores duales de la recaptación de 5-HT y NA, bloqueando ambos transportadores, como la venlafaxina (Stahl, 1998), aunque bloquea más potentemente el 5-HTT; más recientemente se ha descrito otro inhibidor dual la recaptación de monoaminas, la duloxetina (Wong et al., 1988).

2.1.5. Subtipos de receptores serotoninérgicos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}

Durante muchos años, los efectos fisiológicos de la serotonina, incluyendo sus efectos en SNC, fueron atribuidos sólo a 2 grandes subtipos de receptores serotoninérgicos (Gaddum y Picarelli, 1957). Tras el desarrollo de sofisticadas herramientas farmacológicas en los años ochenta, se evidenció que debía haber más subtipos de receptores serotoninérgicos. Estudios moleculares de clonación en estos últimos años han confirmado la existencia de al menos catorce subtipos de receptores serotoninérgicos, cada uno codificado por distintos genes. Se han descubierto todavía más variantes en la edición de muchos de estos subtipos de receptores, resultando en unos treinta productos proteicos distintos que reconocen la serotonina como su ligando fisiológico. La gran mayoría de estos receptores pertenecen a la familia que transduce señales a través de proteínas reguladoras que intercambian moléculas de guanina (proteínas G). Los receptores de serotonina se han dividido en siete subfamilias que se caracterizan por compartir propiedades farmacológicas, secuencias de aminoácidos, organización genética y vías de señalización intracelular. Los subtipos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ acoplan a proteínas G, mientras que los 5-HT₃ son receptores acoplados a canales iónicos (Hoyer et al., 1994).

La arquitectura básica de los receptores de 5-HT acoplados a proteínas G es similar al resto de receptores de esta gran familia (GPCRs). Son proteínas de membrana integradas con siete dominios transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos intracelulares y tres extracelulares. El extremo amino terminal está orientado hacia el espacio extracelular, mientras que el carboxilo terminal se orienta hacia el citoplasma. El núcleo proteico conserva sitios de unión para modificaciones post-translacionales. Los dominios extracelulares están típicamente glicosilados, y poseen residuos de cisteína que participan en puentes disulfuro que proporcionan estabilidad estructural en la conformación de los receptores. Los dominios intracelulares conservan sitios de unión para interactuar con proteínas G y otras proteínas reguladoras, y sitios de fosforilación para varias quinasas serina-treonina. Muchos de los receptores de serotonina poseen residuos de cisteína en su carbono terminal que le permiten

palmitolizarse, creando posibles anclajes de membrana que pueden llegar a formar un cuarto lazo intracelular (Hoyer et al., 1994).

La familia de receptores 5-HT₁ comprende cinco subtipos de receptores distintos que presentan una elevada homología en su secuencia de aminoácidos y que se encuentran todos ellos acoplados de forma negativa a la adenilato ciclasa a través de proteínas G sensibles a la toxina *pertussis* (G_{i/o}). Originalmente, la familia de receptores 5-HT₁ se identificó a partir de estudios de unión de radioligandos a receptores, como un conjunto de lugares de unión que presentaban una elevada afinidad por serotonina y una baja afinidad por espiperona (Peroutka y Snyder, 1979). Posteriormente, gracias a la aparición de ligandos más selectivos, se fueron caracterizando los distintos subtipos de receptores que constituyen esta familia (Pazos et al., 1985; Pazos y Palacios, 1985; Hoyer et al., 1994). En la actualidad, se dispone ya de amplia información acerca de los genes que codifican para la síntesis de estos receptores, así como de las características estructurales de los mismos gracias a las técnicas de clonación molecular.

2.1.5.1. Receptor 5-HT_{1A}

Dentro de la familia de receptores 5-HT₁, el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} es uno de los mejor caracterizados y posiblemente el que más literatura ha generado en los últimos años debido al gran número de funciones fisiológicas en que se encuentra implicado, así como a la importancia que su modulación tiene en el control y tratamiento de distintas patologías de carácter psiquiátrico y cognitivo. Desde su identificación a principios de los 80 mediante técnicas de unión de radioligandos a receptores (Pedigo et al., 1981; Middlemiss y Fozard, 1983), dos hechos fundamentales han contribuido a promover el interés y desarrollar el conocimiento sobre la farmacología y la funcionalidad de este receptor. Por un lado, el temprano desarrollo de un agonista selectivo para estos receptores, el 8-OH-DPAT favoreció el conocimiento sobre las características farmacológicas de este receptor, ya que permitió la obtención del perfil farmacológico (Gozlan et al., 1983), y el estudio de la distribución anatómica de este receptor 5-HT_{1A}. Asimismo, y por otro lado, la observación de que distintas

arilpiperazinas, como la buspirona, gepirona e ipsapirona, que presentaban elevada afinidad por este receptor, poseían actividad ansiolítica y antidepresiva (Robinson et al., 1990), impulsó el interés por el estudio y la búsqueda de fármacos que interaccionasen con este receptor.

Características estructurales

El conocimiento acerca de las características moleculares del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} comenzó a principios de los años noventa con los estudios que llevaron a conocer la secuencia de ácidos nucleicos que formaban el ADN codificante para la síntesis del mismo y que permitieron su clonación (Kobilka et al., 1987; Albert et al., 1990; Fargin et al., 1989; Stam et al., 1992). El gen responsable de la síntesis del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, al igual que los genes responsables de la síntesis de todos los receptores de la familia 5-HT₁, carece de intrones en su secuencia codificadora y su secuencia de ácidos nucleicos presenta una elevada homología entre la rata y el humano, siendo sin embargo mucho menor la homología con respecto a otros receptores serotoninérgicos acoplados a proteínas G (Fujiwara et al., 1993).

El receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} pertenece a la gran familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas, y estructuralmente se corresponde con una proteína de 422 aminoácidos que tiene un peso molecular de 46 Kda y un punto isoeléctrico de 8,8. Esta proteína se encuentra orientada en la membrana plasmática con el extremo amino terminal hacia el espacio extracelular, presentando tres lugares potencialmente susceptibles de N-glicosilación, y con el extremo carboxi-terminal hacia el interior celular, atravesando la membrana plasmática siete veces. Estos siete dominios transmembrana están compuestos por entre 20 y 26 aminoácidos hidrofóbicos y se encuentran conectados entre sí por tres lazos extracelulares y tres intracelulares compuestos por aminoácidos hidrofílicos. El primer y segundo lazo se encuentran unidos por un puente disulfuro entre los residuos Cys¹⁰⁹ y Cys¹⁸⁶ que parece conferir una cierta estabilidad estructural al receptor (Dohlman et al., 1990).

Una de las características farmacológicas más destacables del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} es su elevada afinidad por ciertos fármacos β -bloqueantes como el pindolol. Esta propiedad parece descansar en un único residuo presente en el dominio transmembrana 7 (Ans³⁸⁶), altamente conservado en todos los receptores 5-HT_{1A} y β -adrenérgicos de distintas especies, cuya mutación conduce a la pérdida de afinidad de este receptor por ciertos ligandos β -bloqueantes como el pindolol, sin afectar las propiedades de unión de otros ligandos al receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (Guan et al., 1992).

Los dominios estructurales implicados en el acoplamiento del receptor a las proteínas G y en la desensibilización del mismo por distintas proteínas quinasas se encuentran localizados en las regiones intracelulares del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. En este sentido, el segundo bucle intracelular y determinadas regiones del tercer bucle intracelular contienen los residuos aminoacídicos claves para el acoplamiento del receptor a las proteínas G y la fosforilación por determinadas quinasas que conducirá a la desensibilización (Lembo y Albert, 1995; Lembo et al., 1997). Además, todo el segundo bucle intracelular y determinados fragmentos del tercero parecen ordenarse estructuralmente formando una hélice α anfipática, con una cara cargada positivamente y otra cara hidrofóbica, que conforma el dominio intracelular de anclaje de las proteínas G (Albert et al., 1998). Debido al gran número de vías de señalización, descritas en sistemas heterólogos, a las que puede acoplarse el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (Raymond et al., 1999), los estudios estructurales que han intentado relacionar la presencia de determinados residuos aminoacídicos concretos, presentes en el segundo y tercer bucle intracelular, con la señalización mediada por el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} nos han proporcionado resultados unívocos y han tendido a consolidar como hipótesis general la existencia de distintos subdominios estructurales, presentes en los bucles intracelulares dos y tres, responsables del acoplamiento del receptor a las subunidades α_i , α_o y $\beta\gamma$ (Lembo y Albert, 1995; Lembo et al., 1997). En concreto, distintas serinas y treoninas presentes en estas regiones parecen jugar un papel clave en dirigir y seleccionar las vías de señalización que van a ponerse en marcha como consecuencia de la activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. Así, la Thre¹⁴⁹, presente en el segundo bucle intracelular, parece jugar un papel relevante en el

acoplamiento del receptor a las vías de señalización activadas por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas $G_{i/o}$ (Albert et al., 1998), siendo por tanto responsable de los efectos de elevación del calcio intracelular y del bloqueo de los canales de calcio mediados por el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, mientras que apenas participa en el acoplamiento del receptor a la inhibición de la actividad adenilato ciclasa (Lembo et al., 1997). De igual forma, la Thre²²⁹, presente en el tercer bucle intracelular, es importante para el acoplamiento del receptor tanto a la inhibición de la actividad adenilato ciclasa como a la elevación del calcio intracelular, y junto con la S²⁵³ y Thre³⁴³, también en el tercer bucle intracelular, forman los tres residuos claves implicados en la desensibilización del receptor mediada por PKC (Lembo y Albert, 1995). Por otro lado, la Thre²²⁹ y la Thre³⁴³ son también susceptibles de fosforilación por PKA (Raymond et al., 1999).

Distribución

La distribución del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} en cerebro se ha mapeado de una forma extensiva por técnicas autorradiográficas usando un amplio rango de radioligandos incluyendo [³H]5-HT, [³H]8-OH-DPAT, [³H]-ipsapirona, [¹²⁵I]BH-8-MeO-N-PAT, y más recientemente [¹²⁵I]-p-MPPI y [³H]-WAY 100635 (Pazos y Palacios, 1985; Verge et al., 1986; Radja et al., 1992; Khawaja, 1995a; Kung et al., 1995). Recientemente, se ha usado [¹¹C]WAY 100635 para obtener imágenes *in vivo* del receptor 5-HT_{1A} en el cerebro humano mediante estudios de PET (Pike et al., 1995). La densidad de sitios de unión al receptor 5-HT_{1A} es alta en áreas límbicas del cerebro, sobre todo en el hipocampo, el septo lateral, las áreas corticales (particularmente corteza cingular y entorrinal), y también en los núcleos mesencefálicos del rafe (núcleos medianos y dorsales). Por el contrario, los niveles de los sitios de unión al receptor 5-HT_{1A} en los ganglios basales y el cerebelo son prácticamente indetectables. La distribución del ARNm codificante para el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} es casi exacta a la distribución de los sitios de unión al receptor (Pompeiano et al., 1992; Burnet et al., 1995). El patrón de distribución del ARNm de los receptores 5-HT_{1A} en áreas corticales e hipocampales difiere algo entre humanos y roedores (Burnet et al., 1995).

Se ha descrito la localización del receptor 5-HT_{1A} a partir de estudios de lesiones neuronales, y más recientemente en estudios de localización celular del receptor 5-HT_{1A} usando técnicas inmunocitoquímicas (Miquel et al., 1992; Radja et al., 1991). Los receptores 5-HT_{1A} estarían localizados tanto postsinápticamente con relación a las neuronas serotoninérgicas como presinápticamente en las propias neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe a nivel del soma y las dendritas. A nivel celular, estudios de hibridación *in situ* e inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de receptores 5-HT_{1A} tanto en neuronas piramidales de la corteza como en neuronas piramidales y granulares del hipocampo (Pompeiano et al., 1992; Burnet et al., 1995; Francis et al., 1992). El receptor 5-HT_{1A} se expresa en núcleos colinérgicos en el septo, y también en neuronas glutamatérgicas (piramidales) de la corteza y el hipocampo (Francis et al., 1992). Un estudio ultraestructural más reciente demuestra que el receptor 5-HT_{1A} está presente en las membranas sinápticas, como también en las extrasinápticas (Kia et al., 1996). También se encuentran en la literatura evidencias de la presencia de estos receptores en células gliales del cerebro (Azmitia et al., 1996), aunque este es un tema más discutido.

Farmacología del receptor 5-HT_{1A}

Las características farmacológicas del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} difieren bastante de otros miembros de la familia de receptores 5-HT₁ e incluso de los demás receptores de serotonina. Entre los agonistas selectivos para el receptor 5-HT_{1A} se encuentran la 8-OH-DPAT, que es el agonista prototipo de los receptores 5-HT_{1A} (Hoyer et al., 1994), el dipropil-5-CT, la buspirona y la gepirona. Varios ligandos del receptor 5-HT_{1A}, incluyendo BMY 7378, NAN-190, MDL 73005EF, SDZ 216525 se identificaron inicialmente como antagonistas claros en varios modelos del receptor postsináptico 5-HT_{1A}. Sin embargo, como grupo estos fármacos no son demasiado selectivos y han demostrado tener propiedades de agonistas parciales (Hjorth y Shap, 1990; Sharp et al., 1990 y 1993; Fletcher et al., 1993), lo que complica su uso para posibles estudios farmacológicos. Después de una larga búsqueda, se ha logrado

desarrollar un buen número de antagonistas: (S)-UH-301, WAY 100635 (Hillver et al., 1990), y más recientemente, NAD-299 (Johansson et al., 1997).

La caracterización de las respuestas mediadas por el receptor 5-HT_{1A} se ha podido conocer también gracias a los antagonistas de receptores 5-HT₁ serotoninérgico/ β -adrenérgico como el pindolol, penbutolol y tertatolol (Hjorth y Sharp, 1993; Prisco et al., 1993). Sin embargo, datos recientes sugieren que como grupo, estos fármacos tienen varios grados de afinidad hacia el receptor 5-HT_{1A} (pindolol > tertatolol > penbutolol > WAY 100635; Sánchez et al., 1996; Clifford et al., 1998). De hecho, las propiedades de agonista parcial del pindolol sobre el receptor 5-HT_{1A} podrían ser relevantes dentro de la actual controversia sobre su posible administración como tratamiento para la depresión.

Sistemas efectores y segundos mensajeros

La activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} puede modular la actividad de un gran número de vías de señalización intracelular, así como la producción de segundos mensajeros intracelulares. En todos los casos la modulación que ejerce el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} sobre estas vías de señalización es sensible a la acción de la toxina *pertussis*, demostrando por tanto la participación de proteínas G_{i/o}. La selección de una u otra vía de señalización, así como la importancia relativa de cada una de ellas vendrá en gran medida condicionada por el proceso de acoplamiento del receptor a los distintos subtipos de proteínas G_{i/o}, y la subsiguiente especificidad de acción de las distintas subunidades que componen estas proteínas G _{α i/o} sobre uno u otro sistema efector.

a) Modulación de la actividad adenilato ciclasa

El acoplamiento del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} a la inhibición de la actividad adenilato ciclasa y la consiguiente disminución en la producción de AMPc supone la vía

de señalización intracelular más contrastada para el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, manifestándose tanto en tejido nativo como en distintas líneas celulares (Boess y Martín, 1994; Saudou y Hen, 1994; Albert et al., 1996). Además, la eficiencia de acoplamiento a esta vía de señalización es muy elevada, manteniéndose la máxima eficacia de acoplamiento incluso con niveles de expresión del receptor muy bajos (Boddeke et al., 1992). Sin embargo, a pesar de la alta densidad de receptores 5-HT_{1A} presentes en los núcleos del rafe, la inhibición de la actividad adenilato ciclasa no parece ser la vía de señalización más importante en esta región (Clarke et al., 1996). Adicionalmente, diversos trabajos también han demostrado el acoplamiento del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} a la estimulación de la actividad adenilato ciclasa en hipocampo (Shenker et al., 1983) y en líneas celulares como las HEK 293 vía subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G_{i/o} (Albert et al., 1999).

La capacidad del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} para inducir efectos contrapuestos sobre la actividad adenilato ciclasa puede comprenderse atendiendo a la complejidad que encierra la modulación del conjunto de isoenzimas que conforman la familia adenilato ciclasa y atendiendo también a la actividad de cada una de sus subunidades (Hurley et al., 1999). Por todo ello, la modulación de la actividad adenilato ciclasa por el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} es un proceso extremadamente complejo, pudiendo interpretarse el efecto final observado como el resultado del concurso de las distintas señales que pueden ser activadas dependiendo además de la ubicación regional del tejido examinado.

b) Modulación de fosfolipasas

La función de distintas fosfolipasas puede verse modulada como consecuencia de la activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. En concreto, diversos estudios realizados en sistemas de expresión heterólogos han descrito la capacidad del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} para activar la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (Fargin et al., 1989), la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) (Cowen et al., 1996) y la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Harrington et al., 1994) generando

como resultado la producción de dos segundos mensajeros: el inositol 1,3,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG), responsables de mediar los efectos intracelulares de la activación del sistema efector (PI-PLC). Sin embargo, el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, acoplado a proteínas G_{i/o}, puede producir también la activación de este sistema efector (Fargin et al., 1989), a través de la subunidad βγ de las proteínas G, si bien la eficacia de acoplamiento es mucho menor (Raymond et al., 1999).

c) Modulación de quinasas

Numerosos grupos han documentado que el receptor 5-HT_{1A} activa la vía de ERK/MAP quinasas en células CHO (Cowen et al., 1996; Garnovskaya et al., 1996, 1998). Como otros GPCRs, el receptor 5-HT_{1A} activa ERK a través de un intrincado sistema de señalización que requiere algunas de las mismas moléculas usadas por los receptores tirosín quinasas (Marshall, 1995). La activación de ERK por el receptor 5-HT_{1A} resulta en la activación de la tirosín quinasa Src y la fosforilación de tirosinas de Shc. Esta fosforilación resulta en la reclusión de la quinasa PI-3', Grb2 (una proteína adaptadora), y una proteína activadora de Ras denominada Sos. La activación de Ras lleva a una activación secuencial de Raf, una quinasa reguladora mitogénica y extracelular (MEK) y ERK (Cowen et al., 1996; Garnovskaya et al., 1996, 1998). Cowen et al., (1996) hipotetizaron que PC-PLC aumenta la activación de Raf que es inducida por Ras. Entonces, es posible que el receptor 5-HT_{1A} en células CHO active ERK a través de dos rutas de señalización de lípidos. La primera requiere la quinasa PI-3' e intersecta la ruta de ERK a la altura de Ras, mientras que la segunda requiere PC-PLC e intersecta la ruta de ERK a la altura de Raf.

d) Canales iónicos

Los estudios de expresión del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} en sistemas heterólogos han demostrado la capacidad de este receptor para estimular o inhibir distintos canales iónicos, como los canales de rectificación de reentrada de potasio

dependientes de proteínas G (GIRK), canales aniónicos de alta conductancia, canales de cloruro y canales de calcio. El acoplamiento a la activación de canales GIRK a través de proteínas de las subunidades $G_{i/o}$ es el mecanismo responsable de la hiperpolarización del potencial sináptico que se da en sistema nervioso central tras la activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (Andrade et al., 1986; Colino y Halliwell, 1987). La apertura de canales GIRK tras la activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} sucede como consecuencia de la interacción de las subunidades $\beta\gamma$, liberadas de las proteínas $G_{i/o}$ activadas, con sitios reguladores presentes en el canal (Doupnik et al., 1997). En este sentido la expresión conjunta, en sistemas heterólogos, del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, canales GIRK-1 y distintas proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS), demostró la participación de las proteínas RGS-1, RGS-3 y RGS-4 en la activación del canal GIRK por el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, ya que la inclusión de estas reproducía las características cinéticas de activación observadas en tejido nativo (Doupnik et al., 1997). Otros efectos del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} sobre canales iónicos descritos en sistemas heterólogos son la inhibición de canales aniónicos de alta conductancia, implicados en la regulación del volumen celular y el mantenimiento del potencial de membrana, a través de proteínas $G_{\alpha 2}$ y $G_{\alpha 3}$ (Mangel et al., 1993), y la inhibición de la entrada de calcio estimulada por Bay K 8644 (Liu y Albert, 1991). A pesar de todo, la importancia relativa de estos mecanismos en tejido nativo no está firmemente establecida.

e) Modulación de mecanismos de transporte activo de iones

Además del efecto sobre distintos canales iónicos, el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} es capaz de modular determinados procesos de transporte activo de iones. Así, se ha demostrado la capacidad de este receptor para estimular distintos procesos, como la incorporación de fosfato independiente de sodio al interior celular a través de un mecanismo mediado por PLC (Raymond et al., 1999), la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, un mecanismo dependiente de Ca^{2+} (Middleton et al., 1990), y la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (Garnovskaya et al., 1998).

En conjunto, estos mecanismos sugieren que el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} puede jugar un importante papel en regular la energía celular, a través de su acoplamiento al transportador de fosfatos dependiente de Na⁺, así como en regular el volumen celular, a través de su acoplamiento con la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa y con el intercambiador Na⁺/H⁺.

f) Papel regulador en proliferación celular y supervivencia celular

La activación del receptor 5-HT_{1A} puede estimular vías de proliferación y mitogénicas en varios sistemas celulares (Cowen et al., 1997). Los receptores 5-HT_{1A} estimulan la proliferación de linfocitos T (Iken et al., 1995) y la activación de receptores 5-HT_{1A} expresada en células NIH 3T3 potencia la estimulación de la síntesis del DNA por factores de crecimiento epidérmicos (Varrault et al., 1992). Los receptores 5-HT_{1A} de rata transfectados a células BALB/c-3T3 mejoran la recaptación de timidina (Abdel-Baset et al., 1992). Todos estos estudios son consistentes con un efecto estimulador del receptor 5-HT_{1A} sobre la proliferación celular.

El receptor 5-HT_{1A} también está implicado en la morfogénesis y la supervivencia celular. Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario humano, la expresión de este receptor es máxima en áreas como el cerebelo, demostrándose su papel en la morfogénesis del SNC (Del Olmo et al., 1998). El bloqueo de receptores endógenos 5-HT_{1A} revierte el efecto estimulador serotoninérgico sobre el desarrollo celular en cultivos de dientes germinales de mandíbula de ratón (Moiseiwitsch et al., 1998), sugiriendo un papel sobre desarrollo celular para este receptor. En estudios con receptores 5-HT_{1A} transfectados se ha demostrado la inhibición de la enzima caspasa-3 y la atenuación en un 65% de la apoptosis inducida por la anoxia en las células HN2-5 neuronales a través de una ruta dependiente de ERK (Adayev et al., 1999), sugiriendo, por tanto, también un papel potencial para el receptor 5-HT_{1A} en la supervivencia neuronal.

2.1.5.2. Receptor 5-HT_{1B}

El receptor 5-HT_{1B} fue inicialmente caracterizado como un sitio de unión para serotonina tritiada pero con baja afinidad por espiperona tritiada en el cerebro de roedor (Pedigo et al., 1981). El descubrimiento de que ese sitio tenía una baja afinidad por la 8-OH-DPAT estableció que ese receptor tenía propiedades farmacológicas diferentes del receptor 5-HT_{1A} (y 5-HT₂) (Middlemiss y Fozard, 1983). Otro sitio de unión para la serotonina tritiada fue detectado en cerebro bovino, y fue originalmente clasificado como 5-HT_{1D}, diferenciándolo del receptor 5-HT_{1B} de roedor. Hoy día es generalmente aceptado que el receptor 5-HT_{1D} es una variante de especie del receptor 5-HT_{1B} (Hartig et al., 1996).

Características estructurales

El receptor 5-HT_{1B} está presente en altos niveles de expresión en roedores (rata, ratón, hámster) mientras que el receptor 5-HT_{1D} es más abundante en otras especies (perro, humano). El hecho de que la distribución en el SNC de los originalmente definidos 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} fuera muy similar condujo a numerosos investigadores a especular (antes de la obtención de datos de clonaje) que los dos sitios de unión para radioligandos eran equivalentes interespecie pero con una distinta farmacología (Hoyer et al., 1994). Esta idea inicial comenzó a cuestionarse tras el descubrimiento de dos genes humanos relacionados con los receptores, que fueron aislados siguiendo un patrón de secuencias homólogas con un receptor “huérfano” (perro RDC4) y que presentaba características similares a las del receptor 5-HT₁. Cuando se expresaron estos dos genes se demostró la farmacología de los originalmente descritos como sitios 5-HT_{1D}, no sitios 5-HT_{1B}, y que pasaron a designarse 5-HT_{1D α} y 5-HT_{1D β} (77% de secuencia homóloga transmembrana) (Hartig et al., 1996). Sin embargo, el receptor de roedor 5-HT_{1B} se clonó más tarde y se vio que tenía una gran homología en su secuencia (96% de homología en secuencias transmembrana) con el receptor humano 5-HT_{1D β} . Estos hallazgos, junto con el descubrimiento de un gen de rata homólogo con el receptor humano 5-HT_{1D α} y que codificaba para un receptor con un sitio de unión con perfil de

receptor 5-HT_{1D} llevó a una nomenclatura para los receptores 5-HT_{1B/D}. Esta nomenclatura reconoció que a pesar de una farmacología diferente, el receptor humano 5-HT_{1DB} es una especie equivalente del receptor de roedores 5-HT_{1B}. Además, el receptor 5-HT_{1DB} se reasignó a la clasificación de los 5-HT_{1B}. Para resaltar el hecho de que la farmacología del receptor 5-HT_{1B} presenta diferencias significativas entre especies, se usan prefijos: el de rata se reasignó como r5-HT_{1B} y el humano como h5-HT_{1B} (Hoyer et al., 1994; Hartig et al., 1996). Los genes codificantes para el receptor 5-HT_{1B} de humano y ratón se localizan en el cromosoma 9 (posición 9E) y 6 (6q13) respectivamente (Saudou y Hen, 1994). Con la nueva nomenclatura y asignación, el receptor 5-HT_{1D α} expresado en la rata y el humano, y otras especies, pasó a denominarse receptor 5-HT_{1D}.

Distribución

Estudios autorradiográficos usando [³H]5-HT (en presencia de 8-OH-DPAT), [¹²⁵I]cianopindolol (en presencia de isoprenalina) o [¹²⁵I]GTI han demostrado una alta densidad de sitios de unión al receptor 5-HT_{1B} en los ganglios basales del cerebro de la rata particularmente la sustancia negra, el globo pálido, el pálido ventral y el núcleo entopeduncular, aunque también está presente en otras regiones (Pazos y Palacios, 1985; Verge et al., 1986). Tanto el [¹²⁵I]cianopindolol como el [¹²⁵I]GTI permiten discriminar los sitios de unión 5-HT_{1B} de los sitios 5-HT_{1D} en roedores pero no hay todavía radioligandos selectivos que permitan hacer esta distinción en especies no-roedoras. La discriminación entre los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} tanto en roedores como en no-roedores se ha visto facilitada gracias a la disponibilidad de un nuevo radioligando 5-HT_{1B/D}, el [³H]GR125,743 (Doménech et al., 1997).

También se han llevado a cabo estudios de unión de radioligandos tras inducir lesiones en neuronas serotoninérgicas con el fin de determinar la localización sináptica de los receptores 5-HT_{1B}, si bien los resultados han sido bastante contradictorios, demostrándose tanto una regulación a la alta de estos receptores como una regulación a la baja en las mismas áreas (Middlemiss y Hutson, 1990; Bruinvels et al., 1994).

Sin embargo, los estudios de hibridación *in situ* (Boschert et al., 1994) demuestran la localización del ARNm codificante para el receptor 5-HT_{1B} en los núcleos mediano y dorsal del rafe; de hecho, su expresión se reduce drásticamente tras la lesión neuronal de estas áreas (Doucet et al., 1995). Algunas áreas cerebrales presentan altos niveles de expresión de los sitios de unión al receptor 5-HT_{1B}, como son el estriado, donde también se expresa de forma abundante el ARNm para el receptor. Sin embargo, otras áreas con alta densidad de sitios de unión presentan poca o ninguna cantidad detectable del ARNm codificante para el receptor 5-HT_{1B} (sustancia negra, globo pálido y núcleo entopeduncular). Se han encontrado estas diferencias tanto en humano como en primates (Jin et al., 1992).

Todo esto indica que los receptores 5-HT_{1B} están localizados tanto presinápticamente como postsinápticamente en neuronas serotoninérgicas. Se especula que en algunas áreas cerebrales (incluyendo la sustancia negra y el globo pálido) los receptores 5-HT_{1B} pueden estar en terminales nerviosos no serotoninérgicos, habiendo sido transportados desde los somas serotoninérgicos hacia otras regiones (Boschert et al., 1994; Bruinvels et al., 1994). En general, los estudios sobre la localización anatómica de los receptores 5-HT_{1B} apoyan la idea de que el receptor 5-HT_{1B} tiene un papel como auto y heterorreceptor, controlando la liberación de neurotransmisores.

A nivel celular, la hibridación *in situ* ha demostrado la presencia del ARNm para el receptor 5-HT_{1B} en las células granulares y piramidales del hipocampo (Doucet et al., 1995), y en las neuronas del caudado-putamen que sean probablemente de tipo GABAérgico (Boschert et al., 1994).

Farmacología del receptor 5-HT_{1B}

Hay un gran número de ligandos con alta afinidad por el receptor 5-HT_{1B} pero muchos de ellos no son selectivos (Hoyer et al., 1994). Los agonistas más potentes son L-694247, RU 24969, 5-CT y CP 93129; por su parte, la metiotepina es un potente antagonista. Todos estos compuestos comparten afinidad por otros subtipos de

receptores serotoninérgicos, particularmente el receptor 5-HT_{1A}, pero la baja afinidad de fármacos como la 8-OH-DPAT, el WAY 100635, la ritanserina y el tropisetron por los receptores 5-HT_{1B} ayudan a la discriminación de este receptor.

Por su parte, el compuesto GR 127,935 tiene una gran selectividad 5-HT_{1B/D} con respecto a otros receptores serotoninérgicos y es un potente antagonista en modelos funcionales (Skingle et al., 1995). Recientemente, se han descubierto los primeros antagonistas con alta afinidad y selectividad para los receptores 5-HT_{1B} sobre los receptores 5-HT_{1D}, son el SB-224289 y el SB-216641 (Price et al., 1997; Roberts et al., 1997a, b). Datos recientes indican que otro antagonista, el WAY 100135 tiene propiedades de agonista parcial, al menos en algunos modelos experimentales (Davidson et al., 1997). Estas herramientas farmacológicas resultan esenciales para futuros estudios en animales con el objetivo de caracterizar la función de los receptores 5-HT_{1B/D}.

A pesar de su alta homología secuencial y similar distribución cerebral, los receptores 5-HT_{1B} de rata y ratón son farmacológicamente distintos del humano (Hoyer et al., 1994). Las diferencias más significativas son que ciertos antagonistas β -adrenérgicos incluyendo cianopindolol, SDZ 21009, isamoltano, pindolol, y propranolol presentan una afinidad más alta por los receptores 5-HT_{1B} en roedores que en humano. La diferencia más significativa está entre los receptores humanos 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}. A pesar de que algún estudio indica lo contrario, existen numerosas evidencias en la literatura que demuestran una clara diferencia en la farmacología de estos receptores (Boess y Martin, 1994). En particular los antagonistas para el receptor 5-HT₂ como la ketanserina y la ritanserina muestran una gran selectividad para el receptor humano 5-HT_{1D} *versus* el receptor 5-HT_{1B}.

Más recientemente se han descubierto antagonistas selectivos para el receptor humano 5-HT_{1B} (SB-216641, SB-224289) y el receptor 5-HT_{1D} (BRL-15572) (Price et al., 1997; Roberts et al., 1997a, b).

Sistemas efectores y segundos mensajeros

a) Regulación de la adenilato ciclasa

La activación del receptor 5-HT_{1B} se relaciona, como en el caso del receptor 5-HT_{1A}, con la inhibición de la adenilato ciclasa en tejidos como la sustancia negra (Schoeffer et al., 1989) y en células CHO-K1 (Giles et al., 1996). Como en el caso del receptor 5-HT_{1A}, su activación también aumenta los niveles de AMPc en células HEK 293 mediante un proceso en el que interviene la isoforma de adenilato ciclasa ACII y las subunidades βγ de las proteínas G_{i/o} (Albert et al., 1999).

b) Activación de fosfolipasas

La activación del receptor 5-HT_{1B} puede activar PLC en varios tipos celulares: en células CHO no se ha visto un incremento en la acumulación de inositol fosfato pero en células CHO transfectadas con receptores 5-HT_{1B} humanos se observaron incrementos de Ca²⁺ sensibles a toxina *pertussis* y acumulación de inositol fosfato mediados a través de proteínas G y PLC (Dickenson y Hill, 1998). Además, la serotonina puede estimular la PLD vía receptores 5-HT_{1B} en la arteria mesentérica a través de una ruta que requiere Ca²⁺ extracelular y la activación de PKC, pero independiente de PLC (Hinton et al., 1999).

c) Regulación de quinasas

Existen estudios que han demostrado que los receptores 5-HT_{1B} en fibroblastos estimulaban la síntesis de DNA mediante una ruta sensible a toxina *pertussis*, y que no era mediante la PLC (Seuwen et al., 1988). Estudios posteriores revelaron que el receptor 5-HT_{1B} puede activar ERK en células endoteliales aórticas bovinas (McDuffie et al., 2000), células de neuroblastoma BE₂-C (Leone et al., 2000), y células CHO (Pullarkat et al., 1998). En células CHO esto ocurre mediante una ruta que implica

proteínas G sensibles a *pertussis*, la quinasa PI-3' y la MEK (Pullarkat et al., 1998). La quinasa de AKT también se activa mediante los receptores 5-HT_{1B} actuando a través de proteínas G sensibles a *pertussis* en células de neuroblastoma BE₂-C (Leone et al., 2000). En células CHO, los receptores 5-HT_{1B} activan la quinasa p70 S6 a través de una ruta que implica a la quinasa PI-3' y la MEK, y que es sensible a toxina *pertussis*. Interesantemente, este acople del receptor 5-HT_{1B} a ERK en células CHO fue más eficiente que el inducido por el receptor 5-HT_{1A}.

2.1.5.3. Receptor 5-HT_{2A}

Existen tres miembros descritos de la familia de receptores 5-HT₂, denominados receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (Hoyer et al., 1994). Los receptores 5-HT_{2A} son probablemente el receptor 5-HT_M descrito por Gaddum y Picarelli (1957). Los receptores 5-HT_{2B} fueron llamados receptores 5-HT_{2F} (Foguet et al., 1992), y los 5-HT_{2C} previamente se clasificaron como 5-HT_{1C}. Los receptores 5-HT₂ se acoplan a la cascada de señalización de la PLC-β en tejidos nativos y en células heterólogas (Peroutka, 1995). El receptor cerebral 5-HT_{2A} se descubrió en membranas cerebrales de rata como un sitio de unión de alta afinidad para la espiperona tritiada, con una relativamente baja afinidad por la serotonina tritiada, pero con un perfil farmacológico de receptor serotoninérgico (Peroutka y Snyder, 1979).

Características estructurales

A mediados de los ochenta, se había visto que los receptores 5-HT₂ y 5-HT_{1C} (vieja nomenclatura) tenían propiedades farmacológicas y cascadas de señalización muy similares, y que estaban probablemente relacionados. Los genes para el receptor 5-HT_{2A} humano y de rata fueron aislados por *screenings* homólogos muy poco tiempo después de los primeros estudios sobre el 5-HT_{2C}. El receptor 5-HT_{2A} se localizó en el cromosoma 13q14-q21 y tenía una alta similitud con el receptor 5-HT_{2C} humano, aunque es baja cuando se compara con la del receptor 5-HT_{2B}. La secuencia

aminoacídica del receptor 5-HT_{2A} tiene potencial para glicosilación, forforilación y palmitoilación. Experimentos implicados en mutagénesis dirigida han identificado residuos de aminoácidos con efectos importantes en la unión de ligandos y sobre las propiedades de acoplamiento con el receptor (Boess y Martín, 1994; Saudou y Hen, 1994; Baxter et al., 1995).

Distribución

La distribución en el SNC del receptor 5-HT_{2A} se ha estudiado mediante autorradiografía de receptor, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Los estudios de autorradiografía usando [³H]espiperona, [³H]ketanserina, [¹²⁵I]DOI, y más recientemente [³H]MDL100907 como radioligandos, han encontrado niveles altos de sitios de unión al receptor 5-HT_{2A} en varias áreas cerebrales, sobre todo en áreas corticales (neocorteza, corteza entorrinal y piriforme, claustró, núcleos caudados, accumbens, tubérculos olfatorios e hipocampo de todas las especies estudiadas) (Pazos et al. 1985).

Suele haber concordancia entre la distribución de los sitios de unión a los receptores 5-HT_{2A}, los niveles de expresión del ARNm del receptor 5-HT_{2A} y la inmunoreactividad para estos receptores (Mengod et al., 1990; Morilak et al., 1993, 1994; Pompeiano et al., 1994; Burnet et al., 1995), sugiriendo que las células que expresan estos receptores están localizadas en los mismos sitios en los que se detectan los receptores (y postsinápticamente a la neurona serotoninérgica). También, hay varias evidencias a partir de estudios de hibridación *in situ*, de inmunocitoquímica y de autorradiografía de receptores sobre la localización de estos receptores en interneuronas GABAérgicas así como en neuronas glutamatérgicas (Burnet et al., 1995). Además, experimentos de inmunoreactividad han revelado que también pueden estar localizados en neuronas colinérgicas en varias áreas cerebrales (Morilak et al., 1993).

La distribución de los receptores 5-HT_{2A} parece coincidir con la distribución de los axones serotoninérgicos que parten del núcleo dorsal del rafe (DRN) (Blue et al., 1988). Por ejemplo, en la rata, la inervación serotoninérgica del DRN de la corteza frontal

parece seguir la distribución laminar de los sitios de unión al receptor 5-HT_{2A}. En estudios electrofisiológicos, también se ha visto que las respuestas en corteza frontal mediadas por los receptores 5-HT_{2A} pueden ser evocadas por estimulación en el rafe mediano (MnR) (Godbout et al., 1991).

Farmacología del receptor 5-HT_{2A}

Toda la familia de receptores 5-HT₂ se caracteriza por una relativamente baja afinidad por la serotonina, una alta afinidad por el agonista selectivo DOI, una alta afinidad para varios antagonistas 5-HT₂, cuyo prototipo es la ketanserina pero también para otros ligandos como la ritanserina y el ICI 170,809. Hasta hace poco, ha sido dificultoso discriminar los miembros de esta familia de receptores aunque la ketanserina y la espiperona presentan una mayor selectividad para el receptor 5-HT_{2A} (unos dos órdenes de magnitud) que para el resto de subtipos de receptores; estas moléculas también tienen cierta afinidad por otros receptores de monoaminas. Sin embargo, hoy día hay un amplio rango de antagonistas muy selectivos para la familia (Baxter et al., 1995). EL MDL100907 es un potente antagonista selectivo para los receptores 5-HT_{2A} (Kehne et al., 1996). Otros antagonistas recientes son el SB-200646A y el SB-206553 que discriminan entre el receptor 5-HT_{2A} y los receptores 5-HT_{2B/2C}. Sin embargo, no existen agonistas muy selectivos para los subtipos de receptores de esta familia, aunque puede destacar el agonista para el receptor 5-HT_{2C} RO 60-0175 (Millan et al., 1997).

Todos los receptores 5-HT₂ se desensibilizan tras su exposición prolongada a la serotonina y otros agonistas, aunque la sensibilidad a los agonistas y el mecanismo subyacente a la desensibilización de cada subtipo puede ser diferente (Sanders-Bush, 1990). Una curiosa propiedad de los receptores 5-HT_{2A} es que en algunos modelos *in vivo* e *in vitro* se regulan a la baja después de una constante exposición a algunos antagonistas (i.e. mianserina, espiperona y mesulergina) (Grotewiel y Sanders-Bush, 1994). Una de las explicaciones es que bajo ciertas condiciones, estos receptores estarían constitutivamente activos, y que algunos de los ligandos actuarían como agonistas inversos.

Sistemas efectores y segundos mensajeros

a) Modulación de la actividad de la adenilato ciclasa

La activación de este receptor puede regular la actividad de la adenilato ciclasa en algunos tejidos y grupos celulares. Berg et al. (1994) demostraron que los receptores 5-HT_{2A} pueden amplificar la formación de AMPC en células A1A1 mediante las acciones intermediarias de la PKCs y la Ca²⁺/Cam. En células tiroideas FRTL-5, estos receptores incrementan el AMPC a través de un mecanismo sensible a toxina *pertussis* (Tamir et al., 1992). Sin embargo, Garnovskaya et al. (1995) demostraron que estos receptores en células renales de rata podían inhibir la acumulación de AMPc estimulada por forskolina. Esta inhibición no implicaba PLC, calcio o PKCs, pero era sensible a toxina *pertussis*, sugiriendo que estos receptores pueden inhibir el sistema de la adenilato ciclasa a través de cascadas que requieren la activación de proteínas G_{i/o}.

b) Regulación de fosfolipasas

Toda la familia de receptores 5-HT_{2A} se acopla positivamente a la PLC y tiende a incrementar la acumulación de los inositol fosfato y el Ca²⁺ intracelular (Boess y Martín, 1994). Los receptores 5-HT_{2A} también activan otras fosfolipasas, como la PLA₂ y la PLD (Sanders-Bush, 1990).

c) Regulación de quinasas

Varios grupos han demostrado que estos receptores activan las ERK quinasas en ciertos tipos celulares (Watts, 1998). En células musculares la activación de ERK fue compleja y requirió la participación de la PLC, los canales de calcio y la MEK1 (Watts, 1998). Guillet-Deniau (1997) también ha descrito el acoplamiento de la quinasa Janus (Jak) a este subtipo de receptores.

d) Regulación de las vías de proliferación y apoptosis

Hay estudios que demuestran que la estimulación de los receptores 5-HT_{2A} causa la activación de ciertas cascadas de señalización que tienen como destino final incrementar las cantidades totales de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro). Estos cambios podrían estar relacionados con el incremento en la expresión de BDNF observado después del tratamiento crónico con antidepresivos (Duman et al., 1997).

e) Canales iónicos

Los receptores 5-HT_{2A} incrementan el calcio intracelular, liberándolo de los depósitos intracelulares y/o activando canales de calcio. No sorprende que la calmodulina (Cam) sea una diana dentro de la vía de señalización a través de receptores 5-HT_{2A}, ya que es a su vez una diana para la movilización del calcio (Turner y Raymond, 2005).

2.2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide comprende ligandos endógenos para los receptores cannabinoides, los receptores cannabinoides de por sí, y diversas proteínas implicadas en la regulación y metabolismo de los endocannabinoides. El primer endocannabinoide descrito fue la anandamida en el año 1992 (Devane et al. 1992), y hasta la actualidad se han descubierto un buen número de otros agonistas endocannabinoides. Estos se encuentran repartidos sobre todo por la corteza cerebral, los ganglios basales y las estructuras límbicas, y ejercen la mayoría de sus funciones a través de su interacción con los receptores cannabinoides (Elphick y Egertova, 2001).

Se conocen dos subtipos principales de receptores endocannabinoides, el CB₁ (Matsuda et al. 1990) y el CB₂ (Munro et al., 1993). Los receptores CB₁ se localizan principalmente en el sistema nervioso central mientras que los receptores CB₂

tradicionalmente se habrían localizado en el sistema nervioso periférico (Munro et al., 1993), y por tanto, no son objeto de estudio en la presente tesis, si bien recientemente se ha descrito su presencia en las células gliales del cerebro (Pazos et al., 2004)

Los endocannabinoides, o cannabinoides endógenos, son una familia de lípidos bioactivos que activan los receptores cannabinoides para que estos puedan ejercer sus efectos de modulación de la transmisión neural. Puesto que se sintetizan localmente y a demanda se encuentran en muy baja concentración en el cerebro y otros tejidos, donde participan en la regulación de varias funciones cerebrales como el control del estado de ánimo, el apetito, la memoria y el dolor. Se sintetizan en los terminales postsinápticos, en un proceso que requiere la entrada de Ca^{+2} en la célula, y se liberan en las regiones seleccionadas para que ejerzan su efecto sobre receptores presinápticos. Se inactivan rápidamente debido a un proceso de recaptación y degradación rápida (Di Marzo et al., 1994; Piomelli et al., 1998).

El primer endocannabinoides aislado fue la araquidonil etanolamida o anandamida (AEA) (Devane et al., 1992). La AEA es un derivado del ácido araquidónico, se sintetiza por hidrólisis de su precursor el N-araquidonoil fosfatidiletanolamina mediante la enzima fosfodiesterasa fosfolipasa D. Se retira rápidamente del espacio sináptico por un sistema de recaptación, y se degrada mediante la enzima ácido-graso amino hidrolasa (FAAH). El 2-araquidonilglicerol (2-AG) es otro endocannabinoides producido por las células del sistema nervioso a demanda, a partir del inositol-1,2-diacilglicerol catalizado por la fosfolipasa C (Di Marzo et al. 1994). Los niveles de 2-AG en algunas partes del cerebro son mayores que los de AEA, y la biosíntesis de ambas moléculas se controla de manera separada (Porter y Felder, 2001). Se une a los receptores cannabinoides ejerciendo su acción de manera rápida, y rápido es también su transporte al interior de la célula y su degradación (Mechoulam et al., 1995).

Además de AEA y 2-AG existen otros endocannabinoides aún poco conocidos, como el 2-araquidonil glicerol éter o noladin éter, N-araquidonoil dopamina (NADA) y virodamina (Hanus et al., 2001; Waltert al. 2002; Porter et al., 2002).

2.2.1. Receptor CB_1

El receptor CB_1 pertenece a la familia de los GPCRs (receptores acoplados a proteínas G) y están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (AC) y a canales de calcio, mientras que se acoplan positivamente a canales de potasio y a MAP quinasas a través de proteínas $G_{i/o}$. (Howlett, 2004). Algunos cannabinoides endógenos también producen efectos biológicos mediante la activación del receptor vanilloide 1 (TRPV1), regulador de un canal de cationes activados por capsaicina. También se habla de la existencia de un subtipo CB_{1A} y se cree que existen otros subtipos por descubrir (Manzanares et al., 2006).

Características estructurales

El receptor cannabinoide CB_1 es miembro de la subfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Son proteínas transmembrana con siete dominios transmembrana hidrofóbicos enlazados mediante tres lazos intracelulares y tres extracelulares. El extremo amino terminal se orienta al espacio extracelular, mientras que el carboxilo terminal lo hace hacia el citoplasma. El dominio extracelular se encuentra unido a grupos glucídicos y poseen residuos de cisteína que participan en puentes disulfuro que proporcionan estabilidad estructural en la conformación de los receptores. Los agonistas cannabinoides interactúan con el receptor a través del poro formado en su hélice transmembrana (Mukhopadhyay et al., 2002). Los tres lazos citosólicos y un posible cuarto lazo formado por palmitoilación en la región C-terminal contribuyen a la activación de las proteínas G. El dominio proximal intracelular del C-terminal (aminoácidos 401-417) es crítico para la unión con la proteína G, y la cola del dominio C-terminal (aminoácidos 418-472) modulan la cinética y magnitud de la transducción de señales (Nie y Lewis, 2001). Muchos efectos cannabinoides son sensibles a la toxina *pertussis* confirmando el acoplamiento a proteínas $G_{i/o}$, si bien hay evidencias sobre la interacción de los receptores CB_1 con proteínas G_s , bajo determinadas condiciones (Howlet et al., 1986).

Distribución

Se ha analizado la distribución de los receptores CB₁ mediante estudios de los sitios de unión de [³H]CP-55,940 (agonista de los receptores CB₁) en cerebro de rata (Herkenham et al., 1991). Las concentraciones más altas de sitios de unión al receptor cannabinoide están en los ganglios basales (estriado, sustancia negra y globo pálido), el hipocampo y el cerebelo, todas ellas regiones implicadas en el inicio y coordinación del movimiento. Esto concuerda con los bien caracterizados efectos del cannabinoide ⁹Δ-tetrahidrocannabinol (Δ⁹-THC) sobre la actividad motora en roedores. También está presente en la corteza cerebral y la amígdala, mientras que hay escasos niveles de expresión en el tronco cerebral, consistente con la ausencia de actividad cannabinoide en las funciones respiratorias y cardiovasculares.

El patrón de distribución del ARNm codificante para los receptores CB₁ en el cerebro de rata es similar a la distribución de los sitios de unión de [³H]CP-55,940 pero con algunas discrepancias que pueden ser debidas a la translocación de las proteínas CB₁ a través de los axones hacia sitios distales de los somas neuronales donde se transcriben los genes codificantes para los receptores CB₁ (Matsuda et al., 1993).

En estudios inmunocitoquímicos se han ensayado anticuerpos para los receptores CB₁ para poder estudiar la distribución de los mismos. Pettit et al. (1998) usaron anticuerpos para los aminoácidos 83-98 localizados en la región membranal de la cola N-terminal del receptor. Egertová et al. (2003) usaron anticuerpos con diana en el extremo C-terminal (aminoácidos 461-473) que forma su segmento más distal. Todos estos estudios revelaron un patrón de expresión que se corresponde con la distribución de los sitios de unión al receptor cannabinoide (Pettit et al., 1998; Tsou et al., 1998).

Todos estos estudios aportan evidencias de que el receptor CB₁ es el máximo responsable mediador de los efectos de los cannabinoides en el cerebro. Esta teoría es apoyada por los estudios autorradiográficos en ratones KO para el receptor CB₁ en los que no hay detección de sitios de unión para [³H]CP-55,940 (Zimmer et al., 1999). Sin embargo, estudios más recientes de unión de radioligandos cannabinoides en ratones

KO para el CB₁ indican un receptor (no CB₁/ CB₂) que puede estar presente en cerebro (Di Marzo et al., 2000). De todos modos, en comparación con los datos existentes tanto de autorradiografía como datos inmunocitoquímicos, este posible nuevo receptor cannabinoide representaría un pequeño componente de los sitios de unión cannabinoide totales en cerebro de roedor.

Farmacología del receptor CB₁

El componente psicoactivo del *cannabis*, el Δ^9 -THC, fue purificado por Gaoni y Mechoulam en 1964 (Mechoulam et al., 1965), y desde entonces fue ampliamente utilizado en los estudios de unión de radioligandos a receptores cannabinoideos, si bien presentaba numerosos problemas debido a la alta naturaleza lipofílica de la molécula. El punto clave del desarrollo de los estudios de unión de radioligandos llegó con el desarrollo de agonistas análogos de la molécula, menos lipofílicos como el CP-55,940 (Devane et al., 1988). El descubrimiento del segundo receptor cannabinoide (Munro et al., 1993) hizo necesario el desarrollo de agonistas/antagonistas selectivos para ambos receptores, y así, se sintetizó el primer antagonista CB₁, el SR141716A (rimonabant), que presentaba afinidad nanomolar por el receptor CB₁, y solamente afinidad micromolar por el receptor CB₂ en los estudios con radioligandos (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Más tarde, se desarrolló el antagonista CB₂ SR144528 que presentaba unas 700 veces menos afinidad por el receptor CB₁ que por el CB₂ (Rinaldi-Carmona et al., 1998). En todos esos años se ha seguido desarrollando tanto agonistas como el WIN 55,512-2 y el HU-210, como antagonistas, como el AM281 o AM251.

Muchos de los compuestos cannabinoideos incrementan la disponibilidad sináptica de monoaminas en cerebro, cambios que pueden ser determinantes para la efectividad clínica de los antidepresivos. Así, se ha demostrado que la inyección de rimonabant incrementa el flujo de noradrenalina y serotonina en la corteza prefrontal media, el hipotálamo y el hipocampo de rata, y selectivamente el flujo de dopamina y acetilcolina en estas mismas regiones (Tzavara et al., 2001; Tzavara et al., 2003a y 2003b). Esta selectividad cortical sobre la dopamina también se ha observado con los antidepresivos

clásicos, incluyendo ISRSs, que también incrementan serotonina y noradrenalina en el cerebro (Bymaster et al., 2002). En experimentos de microdiálisis llevados a cabo en la rata, varios antagonistas CB₁ (SLV319 y AVE1625) (Smith y Fathi, 2005) también incrementan la liberación de dopamina y acetilcolina cortical. El sentido de algunos de los efectos neuroquímicos inducidos por agonistas y antagonistas CB₁ depende de la dosis: en varios experimentos, el antagonista rimonabant incrementa la liberación de acetilcolina en hipocampo de rata, pero también una baja dosis de un agonista CB₁ tiene el mismo efecto en la misma región cerebral (Tzavara et al., 2003b). En definitiva, parece que, al igual que con los fármacos antidepresivos típicos, el incremento de la neurotransmisión mediado por monoaminas evocado por los antagonistas CB₁ podría estabilizar una red de neurotransmisión implicada en el control de los procesos afectivos. Por otra parte, el eje HPA tiene un papel crucial en la regulación de la alteración del ánimo. Existe una regulación a la alta de niveles circulantes de hormonas glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) en la depresión y en respuesta al estrés. Tras la estimulación de neuronas que contienen factor de liberación de corticotropina se ha visto una activación del eje HPA por mediación de los receptores CB₁ (Rodríguez de Fonseca et al., 1995). Además, este aumento de corticotropina y corticosterona a través de estos receptores se atenuó tras la administración de rimonabant (González et al., 2004). Todos estos hallazgos anteriores sugieren un importante papel para el sistema endocannabinoide en la patofisiología de la depresión.

Sistemas efectores y segundos mensajeros

a) Modulación de la actividad adenilato ciclasa

La inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa es la transducción de señales mejor conocida, y quizá la más importante dentro del rango de acciones que ejerce la activación del receptor CB₁. Se describió en 1984 por Howlett y Fleming (1984) en células de neuroblastoma N18TG2. Esta respuesta fue bloqueada por toxina *pertussis* sugiriendo la implicación de proteínas G_{i/o} (Howlett et al., 1986). Desde entonces, la

inhibición de la actividad de esta enzima y la consecuente disminución en la producción de AMPc se ha descrito en numerosas ocasiones (Felder et al., 1993; Hillard et al., 1999). Esta acción inhibitoria se ha descrito en rodajas de hipocampo, estriado, corteza cerebral y cerebelo de rata (Bidaut-Russell et al., 1990). Además, el WIN 55,212-2, el CP-55,940 y la anandamida inducen este efecto también en membranas de cerebelo (Childers et al., 1994). Se debe apuntar que el efecto contrario, el incremento de AMPc mediado por agonistas cannabinoides también se ha descrito, y que dicho efecto es inhibido tras la administración del antagonista AM281 (Busch et al., 2004), siendo estos aparentes efectos contradictorios debidos seguramente al tipo de isoenzima de adenilato ciclasa presente en cada tipo de tejido (Rhee et al., 1997).

b) Modulación de quinasas

La cascada de las MAP quinasas es clave en los mecanismos regulatorios como crecimiento celular, transformación y apoptosis e incluye enzimas como Raf, MEK con el objetivo final de fosforilar y activar otras proteínas. Los receptores CB₁ activan esta cascada de MAP quinasas. En astrocitos humanos U373MG y en células CHO, que expresan estos receptores, los agonistas HU-210 y CP-55,940 activan varias de estas MAP quinasas (Bouaboula et al., 1995) y estos efectos fueron sensibles a toxina *pertussis* y al rimonabant. *In vivo*, la administración aguda de Δ^9 -THC induce la activación de varias MAP quinasas en el hipocampo (Derkinderen et al., 2003) y el cerebelo (Rubino et al., 2004), y todos estos efectos se bloquean con la administración de rimonabant, sugiriendo la mediación del receptor CB₁. El CP-55,940, el WIN 55,212-2, la anandamida y el 2-AG también estimulan varias MAP quinasas en el hipocampo de rata, siendo bloqueado el efecto por rimonabant y mostrando estos agonistas un efecto negativo en el ratón KO para el receptor CB₁ (Derkinderen et al., 2001).

El mecanismo por el que los receptores CB₁ activan varios tipos de MAP quinasas no está claro, aunque se descarta la mediación del receptor tirosina-quinasa, y se proponen otros sistemas de mediación como la activación del PI3K vía PKB, siendo

sensible esta activación al rimonabant (Gómez del Pulgar et al., 2000; Galve-Roperh et al., 2002). Otro posible mecanismo implicaría al mensajero ceramida (Sánchez et al., 1998; Galve-Roperh et al., 2000). Concuerd a con la hipótesis de la participación de esta cascada PI3K/PKB el hecho de que los antagonistas CB₁ y CB₂ inhiben la estimulación de esta vía.

Es de gran importancia reseñar los estudios de Derkinderen et al. (2003) en los que el Δ^9 -THC indujo la expresión de moléculas como el BDNF, proteínas *c-fos*, y krox-24, muy importantes en plasticidad sináptica, y como dicho efecto fue revertido tras el tratamiento mediante la inhibición de la cascada de las MAP quinasas, sugiriendo que la regulación genética mediante la activación de las MAP quinasas es un importante mecanismo fisiológico por el cual los cannabinoides modulan la plasticidad neuronal.

c) Canales iónicos

Se cree que la inhibición de la liberación de neurotransmisores en sitios presinápticos inducidos por la activación del receptor cannabinoide es mediada por la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje, si bien el mecanismo por el cual se produce este efecto es discutido en la literatura habiendo evidencias de la dependencia e independencia de la implicación de los receptores CB₁.

Hay también evidencias en la literatura sobre la inhibición de canales de calcio tipo N que conducen a un descenso en el flujo de calcio, como se ve tras la administración de anandamida, WIN 55,212-2 y CP-55,940 (Mackie y Hille, 1992; Felder et al., 1993) y el que las proteínas G_{i/o} están implicadas. La anandamida inhibe canales tipo Q de calcio (Mackie et al., 1995), también vía proteínas G_{i/o}. El WIN 55,212-2, la anandamida y el CP-55,940 inhiben canales N y P/Q de calcio (Twitchell et al., 1997). Los canales de calcio tipo L también son regulados por la acción de los cannabinoides como el WIN 55,212-2 (Gebremedhin et al., 1999). La anandamida inhibe también canales de calcio tipo T, aunque los cannabinoides sintéticos no han demostrado tener este efecto (Chemin et al., 2001).

En células de hipocampo cultivadas, el WIN 55212-2 incrementa la actividad de los canales de potasio tipo A (Deadwyler et al., 1995) y disminuye la actividad de los canales de potasio de tipo D (Mu et al., 1999), así como los de tipo M (Schweitzer, 2000). Con respecto a canales de sodio, se ha demostrado que la anandamida y el WIN 55,212-2 inhiben su actividad en sinaptosomas de ratón (Nicholson et al., 2003). Los cannabinoides son también capaces de activar canales GIRK como mecanismo para la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Robbe et al., 2001). Además, García et al. (1998) demostraron que la activación de canales GIRK mediante WIN 55,212-2 podría ser inhibida por la estimulación de PKC. El hallazgo de que una mutación en los receptores CB₁ prevenía la habilidad de la PKC de interrumpir la activación del canal iónico sugirió que la fosforilación de las proteínas G acopladas al receptor podría inhibir esta actividad (García et al., 1998). Así pues, la estimulación de PKC puede ser un mecanismo para devolver la excitabilidad neuronal cuando los niveles de los endocannabinoides están elevados.

2.3. Cambios en los sistemas serotoninérgico y cannabinoide relacionados con la depresión: estudios postmortem en humanos

2.3.1. Receptores serotoninérgicos y transportador de serotonina

Con relación al receptor 5-HT_{1A}, se han descrito cambios adaptativos tanto a nivel presináptico como postsináptico. Por lo que se refiere al núcleo dorsal del rafe, se ha observado un aumento de su densidad (Stockmeier et al., 1997) aunque parece estar restringido a los aspectos más rostrales (Boldroni et al., 2008). En lo que respecta a los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos, la información disponible es contradictoria, habiéndose observado incrementos o ausencia de cambios a nivel cortical en muestras postmortem (Arango et al., 1995), en áreas tan relevantes como la corteza prefrontal por ser una región implicada en la inhibición de la conducta (Bechara et al., 2000). Sin embargo, se describen reducciones de la densidad en estudios de neuroimagen en humanos (Sargent et al., 2000; Drevets et al., 2007). En otras áreas de proyección, como

el hipocampo, no se ven cambios claros en la densidad del receptor 5-HT_{1A} (Dillon et al., 1991; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997).

En lo que respecta al receptor 5-HT_{1B}, no hay datos concluyentes en la literatura sobre cambios en los niveles de expresión y/o funcionalidad en el cerebro de deprimidos suicidas.

En cambio es mayoritariamente asumida la presencia de cambios adaptativos en la densidad del receptor 5-HT_{2A} (regulación a alta o *up-regulation*) en deprimidos suicidas en áreas como la corteza frontal o la amígdala (Arango et al., 1990), indicando que estos receptores están incrementados en la depresión (Mundunkotuwa, 1996); además, la mayoría de los antidepresivos, administrados crónicamente, disminuye el número de receptores 5-HT_{2A} en el animal de experimentación y en los pacientes deprimidos (Goodwin et al., 1984; Peroutka y Snyder, 1980).

En cuanto al transportador de serotonina (5-HTT), hay estudios en pacientes con síntomas recientes de episodios depresivos que demuestran la ausencia de cambios en la densidad del 5-HTT en el rafe dorsal y en el locus coeruleus (Bligh-Glover et al, 2000; Klimek et al., 2003). En áreas de proyección serotoninérgica, como la corteza prefrontal se ha descrito tanto una disminución como ausencia de cambios en la densidad del 5-HTT (Perry et al., 1983; Austin et al., 2002). Sin embargo, los hallazgos en muestras postmortem deben ser tomados con cautela por la heterogeneidad de los casos incluidos: variabilidad en el estadio clínico de la depresión mayor, presencia de otros trastornos psiquiátricos como la enfermedad bipolar, así como presencia o ausencia de tratamiento antidepresivo (Stockmeier, 1997; Meyer, 2007).

2.3.2. Sistema endocannabinoide: receptor CB₁

Estudios postmortem en muestras cerebrales de deprimidos y estudios genéticos han sugerido una relación entre estos receptores y los trastornos afectivos. Los niveles de expresión del receptor CB₁ y su función están incrementados en la corteza prefrontal

de pacientes deprimidos y alcohólicos suicidas (Hungund et al., 2004), más que en alcohólicos *per se* (Vinod et al., 2005). Aunque aún no es posible interpretar en detalle las causas o consecuencias del incremento de la señalización CB₁ en deprimidos, es evidente que este hallazgo apoya la participación del sistema endocannabinoide en la patogenia de esta enfermedad. Por otro lado, se han descrito varios polimorfismos correspondientes al receptor CB₁ (CNR1) (Zhang et al., 2004). El uso crónico del cannabis también parece estar asociado con reducciones en la actividad neuronal en regiones corticales frontales que son cruciales para la depresión y el aprendizaje (Gruber y Yurgelun-Todd, 2005). Otras evidencias de la posible implicación del sistema endocannabinoide en la depresión se derivan de la observación de que el tratamiento con fármacos antidepresivos modula la actividad del receptor CB₁ (Hill et al., 2006a y 2008), así como de la existencia de un estado comportamental “pseudodepresivo” en los animales knockout para este receptor (Martin et al., 2002).

Basándose en los hallazgos neuroquímicos, se hipotetizó que antagonistas como el rimonabant, el AM251 y otros (Gatley et al., 1996), deberían presentar efectos beneficiosos en diversos tests antidepresivos. Hay evidencias confirmatorias sobre la implicación de los receptores CB₁ en los efectos antidepresivos del rimonabant y del AM251 en diversos test de depresión como el test de la suspensión de la cola o el de la natación forzada (Tzavara et al., 2003a; Sherman et al., 2003; Griebel et al., 2005). Un dato crucial para la demostración de la eficacia antidepresiva de estos antagonistas es que el ratón KO para los receptores CB₁ no presenta los efectos antidepresivos tras la administración de AM251 (Witkin et al, 2005).

2.3.3. Interrelación entre los sistemas endocannabinoide y serotoninérgico: implicación en la neurobiología y tratamiento de la depresión

Hay varias evidencias preclínicas sobre la modulación de la neurotransmisión serotoninérgica por el sistema endocannabinoide: hay receptores CB₁ y enzimas que regulan los niveles cerebrales de anandamida (FAAH) en el núcleo dorsal del rafe (DRN) del cerebro de ratón (Egertová et al. 2003), origen de las vías serotoninérgicas; los

cannabinoides producen efectos conductuales similares a los antidepresivos activando las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal (Bambico et al. 2007); la acción de los agonistas CB₁ incrementa la tasa de descarga de las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal (Gobbi et al. 2005), suprime la liberación de serotonina en la corteza cerebral de ratón (Nakazi et al. 2000) y bloquea la recaptación de serotonina en la corteza cerebral de rata (Banerjee et al. 1975) mientras que los antagonistas CB₁ estimulan la liberación de serotonina en la corteza prefrontal de rata (Tzavara et al. 2003a). El tratamiento crónico con cannabinoides parece regular a la alta la actividad del receptor 5-HT_{2A} mientras que regula a la baja la actividad del receptor 5-HT_{1A} en cerebro de rata, un fenómeno similar al que se observa en la depresión (Hill et al. 2006b); también se ha encontrado un descenso en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A/C} en ratones knockout del receptor CB₁ que exhiben un fenotipo tipo depresivo (Mato et al. 2007).

Por otro lado, existen evidencias sobre la modulación de la actividad cannabinoide mediante la manipulación farmacológica de la transmisión serotoninérgica en el cerebro, casi todas provienen precisamente de estudios realizados tras la administración de antidepresivos. El tratamiento agudo con fluoxetina modula la hipotermia inducida por ⁹Δ-tetrahidrocannabinol en la rata (Malone y Taylor, 1998), un efecto en el cual parece que están implicados los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} (Malone y Taylor 2001). El tratamiento crónico con fluoxetina disminuye la expresión de genes codificantes para el receptor CB₁ en el caudado-putamen (Oliva et al. 2005) del cerebro de rata, y el tratamiento crónico con citalopram disminuye el acoplamiento a proteínas G mediado por receptores cannabinoides CB₁ en el hipotálamo y el hipocampo de rata, dos áreas muy importantes en el control de la función neuroendocrina y anímica (Hesketh et al. 2008); sin embargo, la administración crónica del antidepresivo desipramina, un fármaco que no actúa a través de la inhibición selectiva de la recaptación de serotonina, induce un incremento de la densidad del receptor CB₁ en el hipocampo y el hipotálamo del cerebro de rata (Hill et al. 2006a).

3. Mecanismo de acción de los antidepresivos

3.1. Generalidades

Mucho de lo que se sabe sobre la patofisiología de la depresión se ha descubierto gracias al estudio del mecanismo de acción de los antidepresivos. Sin embargo, el desarrollo de estos fármacos ha sido largo, a veces casual, y la etiología exacta de la depresión continúa siendo desconocida. Los primeros agentes descubiertos en los años cincuenta del siglo pasado incluyen antidepresivos tricíclicos (TCAs) e inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAOs). La eficacia antidepresiva de los TCAs, que fue la piedra angular de los tratamientos hasta los años noventa, se basa en su habilidad para modular la transmisión sináptica de noradrenalina y serotonina. En particular, la clomipramina, que inhibe la recaptación de la serotonina directamente y la noradrenalina a través de uno de sus metabolitos, ha probado ser más efectiva que los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs) en la depresión mayor (Vestergaard et al., 1993; Gram 2008). Sin embargo, mientras que estos agentes no selectivos son antidepresivos efectivos, su utilidad se ha visto limitada por los efectos anticolinérgicos y cardiovasculares adversos asociados a estos mismos compuestos. Los IMAOs están asociados con hipertensión y con interacciones con otros fármacos, y a consecuencia de ello, generalmente no son utilizados (Feighner, 1999). La pobre tolerabilidad y los riesgos asociados con estos antidepresivos han llevado a la búsqueda de agentes más selectivos.

Al comienzo del desarrollo de nuevos fármacos antidepresivos, hubo mucho interés en el sistema serotoninérgico, y en su asociación con la patofisiología y tratamiento de la depresión. Esto condujo a la introducción en esos años de los ISRSs, que dominaron el campo del tratamiento de la depresión en la década de los 80. Ya que estos compuestos demostraron poca o ninguna afinidad por los α -adrenoreceptores del sistema noradrenérgico, como tampoco por los receptores muscarínicos colinérgicos, o receptores de histamina, presentaban muchos menos efectos adversos que los típicamente asociados a los TCAs (Peretti et al., 2000). Sin embargo, la habilidad de varios fármacos de este tipo para inhibir diversas enzimas del citocromo P450, hace

incrementar las posibles interacciones con otros fármacos (Ereshefsky, 1996). Aún así, los ISRSs han sido ampliamente usados para el tratamiento de trastornos afectivos, aunque están asociados con un comienzo de acción lento, lo que es una limitación para la adecuada eficacia clínica en el tratamiento de la depresión mayor (Feighner, 1999). De hecho, la búsqueda ha continuado y continúa para diseñar y desarrollar nuevos fármacos con la esperanza de encontrar fármacos con una eficacia más alta y sobre todo con un comienzo de acción más rápido. Debido a las múltiples evidencias sobre la implicación de ambos sistemas, serotoninérgico y noradrenérgico, en la etiología de la depresión (Delgado y Moreno, 2000), se han introducido un amplio rango de antidepresivos que actúan sobre ellos, como la venlafaxina, nefazodona, mirtazapina y reboxetina (Kent et al., 2000). Por ejemplo, la venlafaxina es la primera de una nueva clase de fármacos conocidos como inhibidores duales de la recaptación de serotonina y noradrenalina (SNRIs), bloqueando los transportadores de ambas aminas; la nefazodona es un antagonista potente de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃; y, la reboxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina (Stahl, 1998).

De cualquier manera, el gran reto que afecta al desarrollo de nuevos fármacos con potencialidad antidepresiva consiste en lograr superar las hipótesis monoaminérgicas, y lograr moléculas cuyo mecanismo de acción se base en los múltiples hallazgos que en los últimos años han relacionado a la depresión con la alteración de otros sistemas (peptidérgicos, aminoacídicos, mecanismos de señalización intracelular) (Adell et al., 2005; Mathew et al., 2008). Aunque el trabajo en este sentido está siendo muy intenso, hasta ahora no ha llegado todavía a la clínica ninguna molécula de este tipo: la investigación llevada a cabo sobre fármacos antagonistas de neuroquininas (sustancia P) y sobre antagonistas de receptor CRF (Nemeroff y Vale, 2005) son dos buenos ejemplos de ello: en el primer caso, la ausencia clara de eficacia ha dado lugar a que el trabajo en este ámbito se haya ralentizado en los últimos años (McLean, 2005); en el segundo caso, tampoco se ha llegado todavía a desarrollar ninguna molécula que haya alcanzado ya con éxito la fase III de ensayo clínico. Esta situación ilustra la dificultad de conseguir nuevas aproximaciones terapéuticas alejadas de la serotonina y la noradrenalina, aunque las modernas teorías neurogenéticas invitan a ser relativamente optimistas de cara al futuro.

3.2. Modos de acción de los antidepresivos

La evolución sobre el desarrollo de nuevos antidepresivos, como los ISRSs, y los SNRIs, y los conocimientos adquiridos sobre su mecanismo de acción, han ayudado a establecer conceptos claros como el que la serotonina y la noradrenalina juegan un papel decisivo en la patofisiología de la depresión. De hecho, los pacientes con depresión mayor tratados con estos agentes mejoran tras el tratamiento crónico (Delgado, 2000). Aunque la serotonina y la noradrenalina tienen acciones independientes, no deberían ser consideradas como aisladas la una de la otra, ya que los dos sistemas están, de hecho, íntimamente conectados en el sistema nervioso central (Gorman y Sullivan, 2000). Del locus coeruleus surgen proyecciones noradrenérgicas que están relacionadas con proyecciones serotoninérgicas cuyos cuerpos neuronales están en el rafe mediano y dorsal, y activan las mismas cascadas de señalización intracelulares (Duman et al., 1999). Por otro lado, ambos sistemas proyectan generalmente a las mismas zonas cerebrales en paralelo, y comparten sistemas efectores en sus dianas postsinápticas. No se ha descubierto aún un mecanismo de acción sencillo para todos los antidepresivos, y no parece que exista debido a la complejidad y heterogeneidad natural de la enfermedad (Richelson, 1997).

Hoy día hay tres vías farmacológicas que se usan con objeto de restaurar el balance monoaminérgico: inhibición de la recaptación de monoaminas, bloqueo de autorreceptores, e inhibición de enzimas que degradan monoaminas, particularmente la monoamino oxidasa (Richelson, 1997). El efecto final de cada uno de estos mecanismos de acción es incrementar la concentración de las monoaminas serotonina y noradrenalina disponibles a nivel sináptico para que actúen sobre sus receptores postsinápticos. Debido a que se conoce mucho mejor la modulación presináptica de la actividad de estas monoaminas que sus sistemas efectores, la mayoría de los tratamientos antidepresivos actúa preferentemente a ese nivel presináptico de ambos sistemas de neurotransmisión.

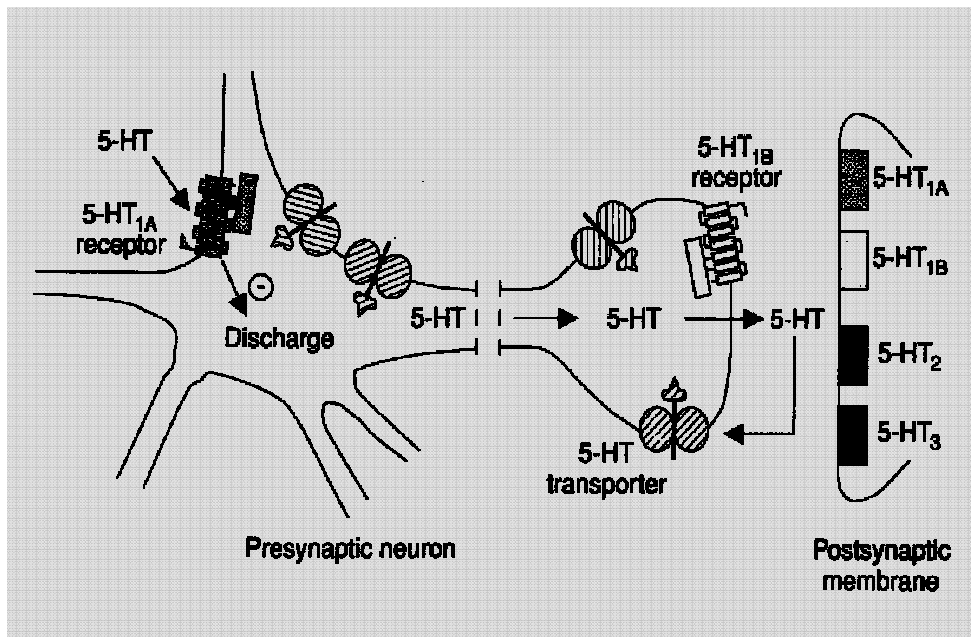


Figura 3. Esquema ilustrativo de la neurotransmisión serotoninérgica. Los autorreceptores somatodendríticos y del terminal sináptico así como el transportador de 5-HT controlan la actividad de la neurona presináptica. En la neurona postsináptica se indican los distintos subtipos de receptores serotoninérgicos. Todos estos sitios son lugares potenciales de actuación y de modulación de los antidepresivos.

3.2.1. Inhibición de la recaptación: bloqueo del transportador de 5-HT

Este modo de acción de los antidepresivos implica la inhibición o el bloqueo de los transportadores responsables de la recaptación de las monoaminas, lo que se suele conocer como inhibidores de la recaptación. Cuando llega un potencial de acción a la terminal nerviosa se produce una liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico, donde se une a sus receptores pre y postsinápticos. En estado normal, el exceso de neurotransmisor (la cantidad de neurotransmisor disponible que no se une al receptor postsináptico) se transporta activamente de regreso a la terminal nerviosa, donde se almacena en vesículas para la liberación del siguiente impulso nervioso. Se asume que una inhibición del transportador puede mejorar significativamente la neurotransmisión (Richelson, 1997).

Esta acción que incrementa la efectividad postsináptica del neurotransmisor es el mecanismo de acción de la mayor parte de antidepresivos actualmente disponibles. Sin

embargo, este modelo simple de mejora de la neurotransmisión podría tener más limitaciones de las que puede parecer en un principio. La administración crónica de estos fármacos puede resultar en un mecanismo compensatorio que, a la larga, module su eficacia. El bloqueo de la recaptación del neurotransmisor puede llevar a cambios compensatorios homeostáticos en la sensibilidad (lo que se conoce como desensibilización) y/o a cambios en la densidad de sus receptores postsinápticos (lo que se conoce como regulación a la baja del receptor o *downregulation*), a consecuencia de un incremento de la concentración sináptica del neurotransmisor. Por lo tanto, la inhibición crónica de la recaptación de serotonina puede llevar a la regulación a la baja de los receptores serotoninérgicos postsinápticos. Aunque no se comprende en su totalidad, se ha postulado que la regulación a la baja de dichos receptores postsinápticos podría contribuir a la pérdida de los efectos terapéuticos observada tras el tratamiento crónico con algunos antidepresivos (Byrne y Rothschild, 1998).

3.2.2. Bloqueo de autorreceptores

Además de los efectos postsinápticos que acabamos de mencionar, los neurotransmisores también se unen a los receptores presinápticos que inhiben su propia liberación, limitando los niveles sinápticos de neurotransmisor. En el caso de la serotonina, los receptores somatodendríticos 5-HT_{1A} presinápticos (denominados autorreceptores) inhiben su liberación por reducir la tasa de descarga o actividad eléctrica neuronal (Sprouse y Aghajanian, 1987). Sin embargo, una exposición crónica a esos niveles incrementados de serotonina, eventualmente produce la desensibilización del autorreceptor 5-HT_{1A}, resultando, por tanto, en una mejora de la liberación de serotonina a nivel de los terminales serotoninérgicos en las áreas de proyección (Blier y Montigny, 1990). El retardo en la acción terapéutica que se ve con los ISRSs se cree que está asociado, en parte, con esa activación compensatoria de los autorreceptores 5-HT_{1A} en los núcleos del rafe y el tiempo que se tarda para que ocurra esa regulación a la baja y/o desensibilización de esos autorreceptores. También los receptores presinápticos 5-HT_{1B/D} que están presentes en las terminales nerviosas contribuyen a la autorregulación de la actividad serotoninérgica. El tratamiento crónico con algunos

antidepresivos se ha visto que también causaría la regulación a la baja de estos receptores (Blier y Montigny, 1994).

El receptor α_2 -adrenérgico es el autorreceptor que modula la liberación de noradrenalina desde las terminales nerviosas noradrenérgicas (Richelson, 1997). De forma similar a lo descrito para los autorreceptores 5-HT_{1A} y la serotonina, la estimulación de estos receptores α_2 -adrenérgicos inhibe la liberación de noradrenalina. El tratamiento crónico con fármacos produce una atenuación gradual de este mecanismo inhibitorio de retroalimentación, posiblemente como resultado de la desensibilización de dichos autorreceptores (Lacroix et al., 1991). De hecho otro antidepresivo, la reboxetina, que actúa como inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina también produce una desensibilización funcional de estos autorreceptores adrenérgicos (Inverizzi, 2001); sin embargo, no todos los antidepresivos causan desensibilización funcional de los autorreceptores adrenérgicos somatodendríticos, así pues es difícil asignar una importancia concreta a este fenómeno en la eficacia de los antidepresivos. Otros adrenoceptores pueden ser alterados en respuesta a la terapia crónica antidepresiva: por ejemplo, se ha observado una regulación a la baja de los β -adrenoceptores y una regulación a la alta de los α -adrenoceptores (Baker y Greenshaw, 1989). En este contexto y con independencia de los cambios a largo plazo en los adrenoceptores centrales, hay estudios clínicos que sugieren que cambios en la disponibilidad de los niveles de catecolaminas centrales podrían influenciar significativamente la eficacia de los antidepresivos (Delgado et al., 1993).

Existen estudios del grupo de Artigas en los que la coadministración de pindolol, un antagonista parcial β -adrenérgico/5-HT_{1A}, acelera el inicio de la acción de varios antidepresivos (Artigas et al., 1996). Desde entonces, se ha usado en numerosos experimentos para analizar el mecanismo exacto de este efecto, y así poder mejorar la respuesta clínica en pacientes resistentes a diversos tratamientos. El pindolol se usó inicialmente por su habilidad para bloquear las respuestas inhibitorias mediadas por el receptor 5-HT_{1A} y por mejorar los efectos neuroquímicos de los ISRSs. Sin embargo, estudios posteriores indican que las propiedades y los efectos inducidos por este compuesto son complejos y que es necesario el continuar investigando con más detalle

la utilidad y eficacia de su coadministración a pacientes deprimidos en tratamiento antidepresivo (Artigas et al., 2006).

3.2.3. Bloqueo de receptores postsinápticos

Un mecanismo de acción alternativo de algunos antidepresivos es el bloqueo de receptores postsinápticos. La nefazodona es antagonista de los receptores postsinápticos 5-HT_{2A} potente y relativamente selectivo; además tiene una actividad moderada como inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina (aunque la inhibición de la recaptación de noradrenalina no parece contribuir a su eficacia clínica).

Se ha demostrado que el bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} mejoraría la funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A} (Cowen et al., 1987). Además, al igual que lo observado con los inhibidores de la recaptación, el tratamiento crónico con nefazodona regula a la baja los receptores 5-HT_{2A} y los β_1 -adrenoreceptores, una acción que incrementaría la activación de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos.

3.2.4. Inhibición de la monoamino oxidasa

La serotonina y la noradrenalina son metabolizadas por la monoamino-oxidasa A (MAO-A) mitocondrial. Los fármacos que inhiben el metabolismo de la MAO (IMAOs) producen una elevación en las concentraciones extracelulares (sinápticas) de monoaminas tales como la serotonina, la noradrenalina y la dopamina, lo que resultaría en la acción antidepresiva.

Después del incremento inicial en las monoaminas extracelulares ocurren cambios adaptativos, similares a aquellos asociados a los ISRSs, como son la desensibilización y/o la regulación a la baja de varios receptores monoaminérgicos (Blier y Montigny, 1994; Baker y Greenshaw, 1989).

3.2.5. Efectos de la inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina

A dosis clínicamente relevantes, los ISRSs incrementan las concentraciones extracelulares de serotonina en los núcleos del rafe. Hemos comentado que la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos por la propia serotonina pone en marcha la retroalimentación negativa limitando así el incremento de la serotonina en la sinapsis, lo que resultará en una disminución de la liberación de serotonina por las terminaciones nerviosas. Este fenómeno es el causante del retardo en la eficacia clínica de estos antidepresivos, pues limita significativamente los incrementos de serotonina inducidos por el antidepresivo: grandes dosis de ISRSs causarían pequeños incrementos de serotonina extracelular en varias áreas cerebrales (Romero y Artigas, 1997; Hervás y Artigas, 1998). Estudios preclínicos han demostrado que la administración sistemática de paroxetina y fluoxetina (3-10 mg/kg) provoca un incremento limitado de la serotonina central. El bloqueo de los autorreceptores 5-HT_{1A} con antagonistas selectivos ha demostrado mejorar significativamente los efectos negativos de estos ISRSs previniendo la retroalimentación negativa de la inhibición de serotonina (Romero y Artigas, 1997). Así pues, podría ser posible mejorar la eficacia de los ISRSs y reducir el retardo en la mejora clínica de los pacientes con ayuda de la coadministración de agentes como el pindolol o nuevos antagonistas selectivos que bloqueen los autorreceptores 5-HT_{1A}: estudios clínicos parecen demostrar una reducción en el tiempo necesario para el inicio de la acción antidepresiva y una rápida mejoría en algunos pacientes resistentes a tratamientos (Artigas y Celada, 2001). De todos modos, hemos comentado que las propiedades y los efectos inducidos por compuestos como el pindolol son complejos y que es necesario el continuar investigando con más detalle la utilidad y eficacia de su coadministración a pacientes deprimidos en tratamiento antidepresivo (Artigas et al., 2006).

La venlafaxina es un inhibidor dual de la recaptación de monoaminas que bloquea, por tanto, la recaptación de serotonina y noradrenalina, y que parece inducir una respuesta más rápida que la de los ISRSs (Montgomery, 1995). Con respecto al bloqueo de la recaptación de serotonina, la venlafaxina se comporta como un ISRS, e inhibe potentemente la descarga del rafe dorsal a través de la activación de los receptores 5-

HT_{1A} a no ser que la venlafaxina se administre en combinación con WAY 100635 (Dawson, 1999), antagonista del receptor 5-HT_{1A}; en ese caso, ocurre un incremento dosis-dependiente perfectamente claro en la concentración sináptica de serotonina a nivel terminal de las vías serotoninérgicas. Datos clínicos sugieren que la respuesta al tratamiento con venlafaxina exhibe una relación positiva dosis-respuesta (Kelsey, 1996) a diferencia de lo que parece observarse con las dosis crecientes de ISRSs. Como consecuencia, se puede decir que la venlafaxina ofrece gran flexibilidad en el tratamiento de la depresión. De forma similar, hay estudios que sugieren que el tratamiento de la depresión mayor con una combinación de desipramina y fluoxetina resulta en una desaparición de todos los síntomas en cuatro semanas en una gran proporción de pacientes, un efecto mucho mayor que con la sola administración de desipramina. Todos estos datos sugieren un gran beneficio terapéutico en el tratamiento con antidepresivos cuando se inhiben tanto el sistema serotoninérgico como el noradrenérgico (Nelson, 1991).

4. Bulbectomía olfatoria bilateral en la rata como un modelo animal de depresión crónica

Aunque está ampliamente reconocido que los modelos animales de trastornos afectivos no son completamente congruentes con la condición humana, está aceptado que hay una serie de criterios mínimos que un modelo animal debe cumplir para estar validado como modelo de depresión animal. En resumen, estos modelos animales deben asemejarse a la condición humana en varios aspectos (McKinney y Bunney, 1969) incluyendo:

1. Similitud fenomenológica entre la conducta exhibida por el modelo animal y los síntomas específicos de la condición humana (validez aparente)
2. Atenuación de los síntomas mediante tratamientos efectivos en humanos (validez predictiva)

3. Aparición de los síntomas en el animal tras sucesos comparables que desarrollen la enfermedad en humanos (validez etiológica)
4. Implicación de procesos neuroquímicos similares (validez constructiva)

Nos centraremos en este estudio en un modelo crónico de depresión, ya que en el tratamiento clínico de la depresión se tardan varias semanas en observarse los efectos terapéuticos de los antidepresivos; por el contrario, en los modelos animales agudos de depresión la actividad antidepresiva se detecta inmediatamente después de la administración aguda y única del antidepresivo. El modelo elegido no sólo debe tener validez aparente probada, sino que debe mantenerse en ese estado “anormal” durante un prolongado período de tiempo, durante el cual va a administrarse el fármaco antidepresivo para poder comprobar así la validez predictiva del modelo así como para poder estudiar su posible validez constructiva.

La experimentación y el estudio del mecanismo de acción antidepresiva en un buen modelo de depresión animal no sólo son de gran utilidad de cara a las pruebas tradicionales de antidepresivos conocidos, sino que puede ser una herramienta fundamental para el descubrimiento de nuevos antidepresivos.

El modelo en el que centramos nuestro estudio es el modelo de la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata *Sprague-Dawley*, que se acerca bastante al cumplimiento de todos los criterios necesarios para ser considerado un buen modelo animal de depresión. Este modelo se caracteriza metodológicamente por la ablación de los lóbulos olfatorios de la rata, causando una serie de cambios de diversa índole (conductuales, neuroquímicos, inmunológicos, estructurales...) que describiremos más adelante.

4.1. Anatomía del sistema olfatorio en la rata

Los bulbos olfatorios son extensiones bilaterales del telencéfalo rostral y constituyen un 4 % de la masa total del cerebro en un individuo adulto (Cain, 1974). La ablación de los bulbos supone un impacto grave en las funciones cerebrales debido a

la gran cantidad de conexiones eferentes con áreas meso y subcorticales, y que no son debidas solamente a la anosmia producida. Además se producen cambios muy importantes consecuencia de la degeneración anterógrada y retrógrada neuronal en áreas relacionadas con los bulbos (Schoenfeld y Hamilton, 1977). A nivel celular, estos cambios se traducen en alteraciones en el número y la función sináptica, en los brotes neuronales, en las espinas dendríticas y una denervación general (Van Riezen y Leonard, 1990). Se ha postulado por Duman que cambios neurodegenerativos cualitativamente similares ocurren en pacientes con depresión mayor (Duman et al., 2000 y 2001).

La rata posee dos órganos quimiorreceptores en la cavidad nasal, siendo el primero el epitelio olfatorio que envía axones al bulbo olfatorio principal y al órgano vomeronasal, que es el segundo órgano quimiorreceptor, que a su vez envía proyecciones al bulbo olfatorio accesorio. Hay dos regiones anatómicamente bien diferenciadas en el bulbo olfatorio principal, región de células de la capa exterior e interior respectivamente. La capa o región más externa se compone de células que son principalmente dopaminérgicas y GABAérgicas. La capa más interna se compone principalmente de células que incluyen neuronas serotoninérgicas, colinérgicas, noradrenérgicas, y neuronas que contienen encefalinas y sustancia "P" (Halasz y Shepherd, 1983). Las células mitrales del bulbo olfatorio principal proyectan a núcleos más centrales, como la corteza piriforme posterior, la amígdala (regiones anteriores y posterolaterales de los núcleos corticales), y la corteza entorrinal (Haberly y Prize, 1977). Estas proyectan a regiones rostrales como la corteza piriforme anterior (Haberly y Prize, 1977; Brunjes, 1992). Por su parte, proyecciones de los núcleos olfatorios accesorios incluyen el tracto olfatorio dorsal, la amígdala (regiones mediales y posteriomediales de los núcleos corticales) y el *bed nucleus stria terminalis* (BNST) (Leonard y Tuite, 1981).

Las fibras del bulbo olfatorio principal proyectan al tracto olfatorio lateral a través del bulbo olfatorio accesorio, por tanto una lesión en los bulbos olfatorios accesorios afectarán irremediablemente al bulbo olfatorio principal.

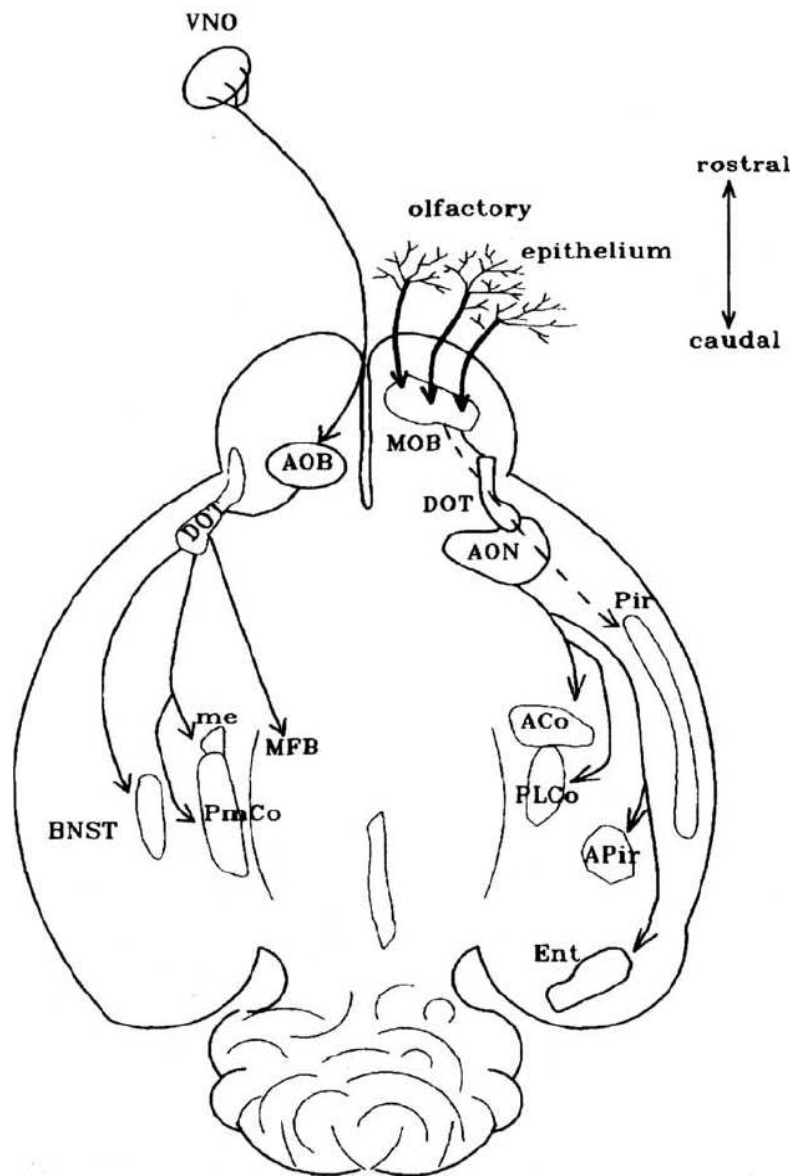


Figura 4. Diagrama de las conexiones anatómicas entre los bulbos olfatorios y otras regiones cerebrales. VNO, órgano vomeronasal; MOB, bulbo olfatorio principal; AOB, bulbo olfatorio accesorio; DOT, tracto olfatorio dorsal; AON, núcleo anterior olfatorio; Pir, corteza piriforme; ACo, corteza amígdala; PLCo, núcleo posterolateral cortical de la amígdala; APir, corteza piriforme anterior; Ent, corteza entorrinal; me, núcleo medial de la amígdala; PmCo, corteza periamigdalina; BNST, *bed nucleus stria terminalis*; MFB, mesencéfalo medial. Tomado de Song y Leonard (2005).

Se ha propuesto que los núcleos superficiales de la amígdala son un sitio muy relevante para la integración sensorial olfatoria-no olfatoria. Dentro de la misma amígdala, las áreas que reciben inervación tanto del bulbo olfatorio principal como accesorio están estrechamente conectadas (McDonald, 1992). Las regiones a su vez

inervadas por la amígdala son de especial importancia. El BNST está considerado como una extensión de los núcleos mediales y centrales de la amígdala debido a su estructura similar (Amaral et al., 1992). Otras dianas de los núcleos mediales a través del BNST son el hipotálamo medial, el anterior y el ventromedial, así como el área preóptica media. Los núcleos centrales, también vía BNST conectan con el núcleo accumbens, el caudado putamen y el hipotálamo (Alheid et al., 1998). Junto a estas proyecciones, el componente dorsal del BNST proyecta a los núcleos del septo lateral y a las áreas olfatorias. El componente ventral también conecta a las áreas hipotalámicas y preópticas.

Otra área que recibe conexiones de los bulbos olfatorios es el mesencéfalo medial (MFB), que está estrechamente relacionada con el BNST, y es la mayor fuente de terminales noradrenérgicas y serotoninérgicas del bulbo olfatorio (Van Riezen y Leonard, 1990). Axones que se originan en los núcleos anteriores olfatorios, en el tubérculo olfatorio y en la corteza piriforme, terminan en la porción ventral del MFB (Powell et al., 1965). Muchos de estos axones entran en el MFB vía amígdala y continúan en el mesencéfalo dorsal. EL MFB dorsal recibe conexiones del hipocampo, el septo, los núcleos de Broca, la corteza frontal y el núcleo accumbens (Millhouse, 1969).

Así pues, se produce una denervación, al menos parcial, en todas estas regiones tras la lesión producida por la bulbectomía. Resultan dañadas aferencias colinérgicas y GABAérgicas que proyectan desde el área de Broca, proyecciones serotoninérgicas desde el rafe (Cairncross et al., 1979), lo que concuerdan con la pérdida de neuronas del rafe que se detecta tras la bulbectomía (Nesterova et al., 1997), así como aferencias noradrenérgicas que proceden del locus coeruleus (Shipley et al., 1985).

Evidentemente, muchas áreas inervadas desde el bulbo resultan dañadas tras la bulbectomía como pueden ser la corteza, el hipocampo, la amígdala, y los ya citados núcleos locus coeruleus y rafe dorsal.

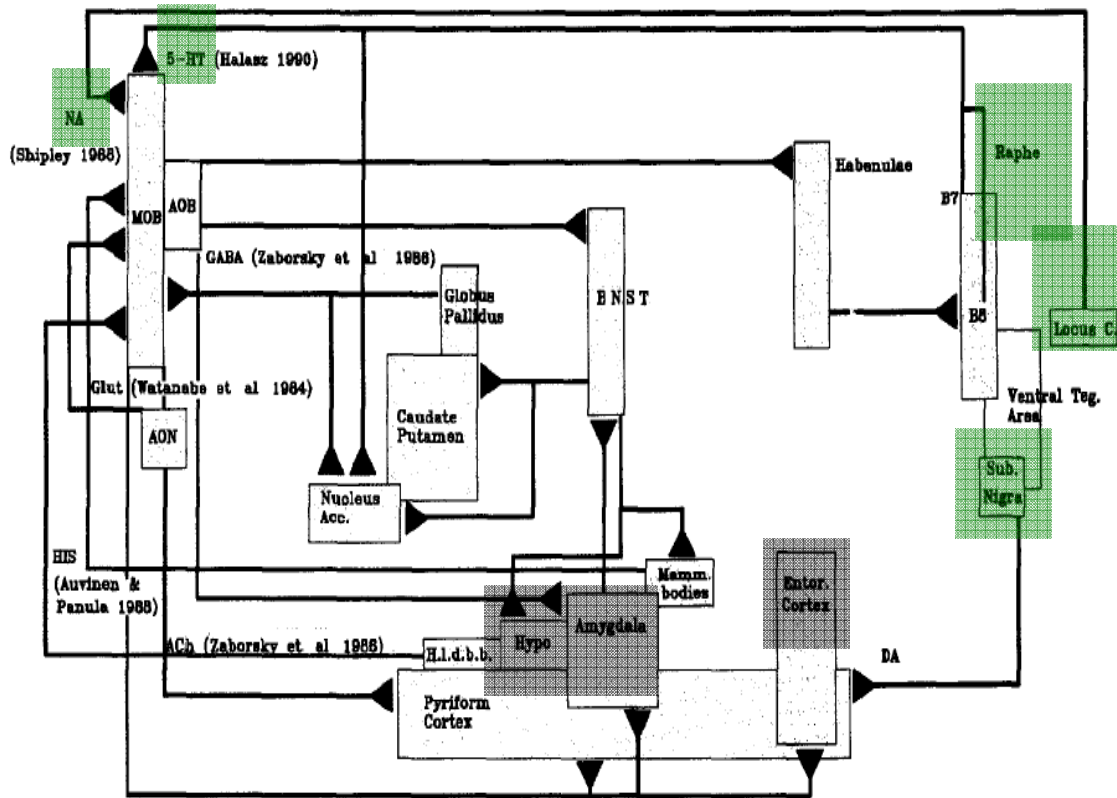


Figura 5. Esquema ilustrativo de las aferencias y eferencias de los bulbos olfatorios. ACh, acetilcolina; AON, núcleo olfatorio anterior; DA, dopamina; Entor, córtex, corteza entorrinal; Glut, glutamato; H.I.d.b.b., límbo horizontal de la banda diagonal de Broca; HIS, histamina; Hypo, hipotálamo; Locus c. locus coeruleus; Mamm. Cuerpos mamilares; NA, noradrenalina; Nucleus acc., núcleos accumbens; Sub. Nigra, substancia nigra; Ventral teg. area, área tegmental ventral

4.2. Cambios en los sistemas de neurotransmisión en la rata bulbectomizada

4.2.1. Sistema serotoninérgico

Está ampliamente aceptado que un defecto en la función serotoninérgica juega un papel fundamental en la psicopatología de la depresión. El hallazgo de que tanto la serotonina como su metabolito principal están reducidos en el cerebro de la rata bulbectomizada es de gran relevancia y muy similar a lo descrito en los primeros estudios en el LCR de humanos deprimidos. (Jancaš y Leonard, 1984; Lumia et al., 1992). Connor et al. (1999) han demostrado que la liberación del metabolito principal

de la serotonina, el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) del núcleo accumbens esta reducida tras la bulbectomía. Las disfunciones en el sistema serotoninérgico son más aparentes en la corteza amigdaloides, la corteza frontal y el cerebro medio (Redmond et al., 1997). Además, estas alteraciones son revertidas tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Song y Leonard, 1995).

Hay evidencias histológicas de una hiperinervación de las fibras serotoninérgicas de la corteza frontal tras la bulbectomía (Zhou et al., 1998), una reducción en las concentraciones de serotonina así como un incremento compensatorio en la actividad triptófano-hidroxilasa, en la expresión del 5-HTT y en el número de receptores 5HT_{2A} (Huether et al., 1997; Grecksch et al., 1997). Se ha encontrado en las ratas bulbectomizadas una reducción en la recaptación de serotonina tritiada en plaquetas, revertida tras el tratamiento crónico con desipramina o sertralina. También se ha detectado un incremento en la densidad de los receptores 5-HT_{2A} en las membranas de plaquetas, aunque presentaban una respuesta reducida a los efectos estimulantes de la serotonina exógena (Butler et al., 1988). Todos estos cambios se normalizan tras el tratamiento crónico con antidepresivos. Además, estos cambios en el sistema serotoninérgico de la rata bulbectomizada son, en gran manera, similares a los descritos en pacientes con depresión mayor.

Hay estudios conductuales que también demuestran la disfunción del sistema serotoninérgico en la rata bulbectomizada, como el incremento en la actividad locomotora en respuesta a la fenfluramina, agente liberador de serotonina (Van der Stelt, 2005). Estos resultados sugieren que tanto el mecanismo de liberación de serotonina, como la funcionalidad del receptor postsináptico 5-HT_{1A} estarían incrementados tras la bulbectomía olfatoria. Aunque hay un incremento en la respuesta a la ipsapirona, un agonista del 5-HT_{1A}, otros agonistas, como el 8-OH-DPAT, no producen dicho efecto (Kelly et al., 1997). Es interesante observar que algunos de estos mismos cambios se han descrito en pacientes con depresión mayor.

Con respecto al receptor 5-HT_{1B}, no se han desarrollado experimentos para determinar su localización y funcionalidad en las ratas bulbectomizadas.

4.2.2. Sistema noradrenérgico

Hay diversos estudios que demuestran una disminución de los niveles de noradrenalina cerebral (Van Riezen y Leonard, 1990; Jancsar y Leonard, 1984; Song y Leonard, 1995) en este modelo animal y que el tratamiento crónico con amitriptilina revierte esta disminución (King y Cairncross, 1974); en estudios más recientes también se ha observado el mismo efecto con desipramina y el ISRS sertralina (Song y Leonard, 1995). Por otro lado se ha descrito un incremento en la densidad de los β -adrenoceptores en linfocitos y en la corteza amigdaloide de las ratas bulbectomizadas (Van Riezen y Leonard, 1990). La densidad de α 2-adrenoceptores en regiones corticales también está incrementada en las ratas bulbectomizadas (Hong et al., 1987). Estos cambios presumiblemente reflejarían un incremento compensatorio en el número de receptores como consecuencia de una reducción de la noradrenalina cerebral. A pesar del incremento de los α 2-adrenoceptores en cerebro, la respuesta funcional de estos receptores está reducida como se refleja por la reducción del efecto hipotérmico inducido por clonidina; la respuesta de la hormona de crecimiento a la clonidina también está reducida en la rata bulbectomizada (Song y Leonard, 2005). Los cambios observados en la función y en el número de los α 2-adrenoceptores son similares a los observados en enfermos con depresión mayor y en las muestras cerebrales postmortem de deprimidos suicidas (Meyerson et al., 1982).

4.2.3. Otros neurotransmisores clásicos: acetilcolina, glutamato y GABA

Tras la bulbectomía olfatoria bilateral hay una mayor actividad de la acetilcolinesterasa (Broekkamp et al., 1986), lo que sugiere que el sistema colinérgico está hiperactivo en las ratas bulbectomizadas. Otros autores han demostrado que la rata bulbectomizada tiene una menor densidad de receptores muscarínicos (Hozumi et al., 2003) aunque este cambio en la densidad de receptor muscarínico no concuerda con el incremento en la densidad descrito en los cerebros de suicidas (Meyerson et al., 1982). La reducción de este receptor muscarínico en la rata bulbectomizada puede ser responsable del déficit de memoria observado en estos animales (Hozumi et al., 2003).

Con lo que respecta al sistema glutamatérgico, Van Riezen y Leonard ya postularon que había un desajuste entre los sistemas de neurotransmisión excitatorios e inhibitorios en la rata bulbectomizada (Van Riezen y Leonard, 1990), teoría soportada por el hallazgo de que la concentración de glicina está incrementada (Harvey et al., 1975), mientras que la del glutamato y aspartato están disminuidas (Collins, 1984). En este desequilibrio, el sistema glutamatérgico es crucial y se ha propuesto que el sitio de NMDA en el receptor ionotrópico del glutamato es un sitio de acción relevante para los antidepresivos, y que jugaría un papel importante en la depresión (Paul et al., 1994). Hay estudios que apuntan hacia una hipoactividad del sistema glutamatérgico tras la bulbectomía. Un descenso en la densidad de los sitios NMDA se ha detectado en las ratas bulbectomizadas, siendo la corteza prefrontal y piriforme, los núcleos talámicos y los núcleos amigdaloides laterales las regiones cerebrales más afectadas (Dennis et al., 1994). Por el contrario, Nakanishi et al. (1990) han descrito una respuesta incrementada de los receptores de glutamato NMDA en los núcleos amigdaloides medios. De cualquier manera, la mayor parte de los cambios conductuales asociados al sistema glutamatérgico son revertidos tras el tratamiento crónico con antidepresivos. Una de las funciones fisiológicas más importantes de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos es su implicación en la memoria a corto plazo. Hay evidencias conductuales en las ratas bulbectomizadas, y en los pacientes deprimidos, que la memoria a corto plazo está alterada. Los cambios observados en el sistema glutamatérgico en la rata bulbectomizada pueden contribuir a explicar estos déficits en los procesos de memoria-aprendizaje que se ven tras la bulbectomía y explicar su posible asociación a los trastornos depresivos y a otras enfermedades neurodegenerativas.

Dentro de los sistemas de neurotransmisión inhibitorios, el GABAérgico presenta importantes alteraciones inducidas por la bulbectomía olfatoria. A nivel de SNC, La densidad de los receptores GABA_A está incrementada sustancialmente, mientras que los receptores GABA_B están reducidos, en la corteza frontal de las ratas bulbectomizadas (Dennis et al., 1993) y se ha descrito un incremento en el *turnover* de GABA en la corteza amigdaloides de la rata bulbectomizada (Janicsar y Leonard, 1984). También se han descrito cambios (incrementos) en los sitios de unión para benzodiazepinas (*receptores para benzodiazepinas*) (Dennis et al., 1993), un hallazgo interesante en

vista de los pronunciados cambios en la inmunidad celular, proceso en el que estos receptores están altamente implicados. Después del tratamiento crónico con antidepresivos los cambios en los receptores de benzodiazepinas retornan a la normalidad. La densidad de estos receptores para benzodiazepinas es particularmente sensible a los efectos moduladores de los glucocorticoides (Weizman et al., 1995), así pues los cambios observados en estos receptores podrían ser consecuencia de la hipercortisolemia inducida por estrés, como la que ocurre en la rata bulbectomizada (Kelly et al., 1997). Sin embargo, se debe recalcar que no se han detectado cambios en la densidad de estos receptores en plaquetas de pacientes deprimidos (Weizman et al., 1995).

También se ha demostrado modificaciones en los niveles de esteroides neuroactivos como la alopregnenolona (APREG) que pueden actuar como modulador alostérico del receptor GABA_A (Paul y Pudrý, 1992). En la rata bulbectomizada la cantidad de APREG total en el cerebro se ve incrementada, con cambios más marcados en las regiones corticales y límbicas, alteración que se revierte tras el tratamiento crónico con antidepresivos, como desipramina, venlafaxina o un ISRS (Uzunova et al, 2004). Todos estos experimentos evidenciarían que el sistema GABAérgico está hiperactivo en la rata bulbectomizada; el tratamiento crónico con antidepresivos corrige tanto la hiperactividad de este sistema como las alteraciones conductuales asociadas.

4.2.4. Sistema endocannabinoide-receptor CB₁

Con respecto al sistema endocannabinoide, no existen aún estudios que hayan evaluado su posible alteración a nivel del SNC ni en tejidos periféricos en el modelo de la rata bulbectomizada, ya sea en la expresión de los ligandos endógenos o en el número/función de los receptores CB₁ y CB₂. Sin embargo, estudios recientes con otros modelos animales apuntan a la relevancia funcional del sistema endocannabinoide en conductas relacionadas con el estrés y la depresión. Diversos paradigmas de estrés crónico impredecible en la rata (Bortolato et al. 2007) y el ratón (Hill et al., 2006a) producen un incremento del ARNm para el receptor CB₁ en la corteza prefrontal. En un

estudio muy reciente, Hill et al. (2008) han demostrado que el estrés crónico impredecible en las ratas produce un incremento en la densidad del receptor CB₁ en la corteza prefrontal y un descenso en el hipocampo, el hipotálamo y en el estriado ventral junto con una reducción significativa de los niveles del ligando endógeno *N*-araquidoniletanolamida (anandamida) en todas esas áreas cerebrales analizadas.

4.3. Cambios inmunológicos tras la bulbectomía

En la última década, el modelo de bulbectomía olfatoria bilateral se ha usado para explorar la interrelación entre depresión y disfunciones del sistema inmune bajo el prisma de la teoría macrofágica de la depresión. Esta teoría postula que una excesiva producción de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos activados se relacionaría directamente con algunos tipos de depresión (Smith, 1991) y se basa en las evidencias clínicas sobre una activación del sistema inflamatorio en pacientes con depresión mayor (Maes, 1999; Anisman y Merali, 2003). Además, ciertas citoquinas usadas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer o hepatitis producen síntomas depresivos en pacientes no deprimidos (Smith, 1991). Los cambios resultantes de la activación macrofágica incluyen una actividad incrementada del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (eje HPA), cambios en los niveles de leucocitos y linfocitos, una síntesis incrementada de citoquinas, prostaglandinas, anticuerpos, etc... (Maes, 1999).

Hay experimentos que demuestran como las citoquinas proinflamatorias pueden iniciar síntomas y signos propios de la depresión: incremento en la secreción de corticosterona (Dunn, 2000), letargia, anorexia, alteraciones del sueño (Plata-Salaman, 1999; Krueger et al., 1998), anhedonia, ansiedad y conductas de tipo estrés, déficits en la memoria y cambios en la neurotransmisión central monoaminérgica (Connor et al., 1999; Anisman y Merali, 2003). Algunos de estos cambios inducidos por las citoquinas proinflamatorias en pacientes deprimidos pueden ser atenuados por los tratamientos con antidepresivos (De La Garza y Asnis, 2003).

4.4. Cambios en las vías implicadas en neurogénesis y plasticidad neuronal

Aunque mucho de lo que concierne a las vías relacionadas con neurogénesis y plasticidad neuronal (BDNF/TrkB, AKT, ERK/pERK, CREB/pCREB, β -catenina) será objeto de revisión un apartado posterior, revisaremos aquí los datos que pueden ser de interés de cara al modelo de bulbectomía olfatoria.

Con relación al receptor TrkB y a su ligando endógeno, la molécula BDNF, encontramos datos variados en la literatura científica. En ratones bulbectomizados se han descrito incrementos en la expresión de BDNF asociados a una disminución en el *turnover* de 5-HT en áreas relacionadas con la depresión como el hipocampo y la corteza frontal (Hellweg et al., 2007). Sin embargo, Van Hoomissen et al. (2003) no han encontrado cambios en los niveles de expresión del ARNm para el BDNF en la formación hipocampal, el área tegmental ventral y la sustancia nigra de las ratas bulbectomizadas.

Con respecto a las proteínas ERK/pERK, indicadoras de la actividad de la vía de las MAP quinasas, en la literatura existen muy pocos estudios previos sobre la relación de ERK-bulbectomía en la rata, aunque sí encontramos un potenciamiento de estas enzimas tras el tratamiento crónico con antidepresivos en la rata normal o *naive* (Hetman et al., 1999; Popoli et al., 2000; Tiraboschi et al., 2004) y también un descenso en los niveles de ERK en varias áreas cerebrales del ratón bulbectomizado (Moriguchi et al., 2006; Han et al., 2009).

Con relación a la expresión de AKT, no ha estudios en la rata bulbectomizada. En deprimidos suicidas se ha detectado una baja actividad de esta enzima en corteza prefrontal (Hsiung et al., 2003). Es importante reseñar que esta proteína AKT participa en la cascada de señalización intracelular culminante en el transporte de la β -catenina al núcleo, vía de señalización implicada en neurogénesis. En este sentido, no hay datos en la literatura totalmente aclaratorios sobre el efecto de los antidepresivos en los niveles de expresión de AKT, pero si se ha demostrado en nuestro laboratorio que el

tratamiento crónico con el antidepresivo venlafaxina induce un aumento en la expresión de la β -catenina en las ratas control o *naive* (Mostany et al., 2008).

Existe bibliografía más amplia con respecto al producto final de estas cascadas, el CREB. El grupo de Duman ha sugerido que esta molécula juega un papel crítico en la patología de la depresión (Duman et al., 1997). De hecho, existen datos sobre el descenso de los niveles generales de CREB en varias regiones cerebrales de pacientes deprimidos (Dowlatshahi et al., 1998; Yamada et al., 2003) así como en el cerebro de la rata (Wang et al., 2007) y el ratón (Han et al., 2009) bulbectomizados.

4.5. Cambios conductuales en la rata bulbectomizada

4.5.1. Actividad locomotora y exploratoria

El índice más aceptado y característico de la conducta de la rata bulbectomizada es la hiperactividad y el aumento de la actividad exploratoria (alzamientos) de los animales en un área cerrada y bajo un entorno aversivo como puede ser el aparato o recinto denominado campo abierto (“*open-field test*”). Parece que la hiperactividad no está relacionada con la pérdida de olfacción, ya que la anosmia inducida no afecta a la conducta en el campo abierto (Van Riezen y Leonard, 1990). Es importante resaltar la importancia de la fuerte luminosidad en el campo abierto como factor de aversividad, como demostraron Stockert et al. (1988) al realizar el campo abierto en condiciones de semioscuridad sin ver ningún tipo de cambio en la actividad de los animales bulbectomizados.

Una monitorización continua de la actividad locomotora espontánea (actimetría de 24 horas) demostró también una mayor actividad nocturna en las ratas bulbectomizadas a partir de los diez días después de la operación (Giardina y Radek, 1991); por el contrario, durante la fase de luz hay investigadores que afirman que la actividad de las ratas operadas es la misma que en ratas *sham-operated* o controles (Kelly et al., 1997).

4.5.2 *Aprendizaje y memoria*

El laberinto acuático de Morris se ha usado comúnmente para medir la orientación espacial en roedores (Morris, 1981). En la rata bulbectomizada, Redmond et al. (1997) y Kelly et al. (1997) observaron una deficiencia del animal bulbectomizado para detectar la plataforma escondida en dicho test. También se ha usado el laberinto radial de ocho brazos para demostrar un déficit en el aprendizaje espacial en la rata bulbectomizada (Olton et al., 1977). En este mismo test se observó el déficit en la habilidad de estas ratas para encontrar recompensas de comida situada en uno de los brazos (Hall y Macrides, 1983). El tratamiento crónico con antidepresivos atenúa estos déficits. Los tests del laberinto acuático de Morris y el laberinto radial de ocho brazos son tests relacionados con la funcionalidad del hipocampo (Morris, 1981; Olton et al., 1977) que no dependen de ninguna habilidad olfatoria. Los resultados en estos estudios sugieren que la bulbectomía produce un déficit en la memoria y en el aprendizaje espacial que surge de una disfunción al menos de tipo hipocampal, y que el tratamiento crónico con antidepresivos atenúa o revierte dicha disfunción. Las ratas bulbectomizadas presentan también un déficit de aprendizaje en las pruebas de evitación pasiva (Van Riezen et al., 1976) y activa (King y Cairncross, 1974). Así pues, parece que la lesión en los bulbos olfatorios tiene un efecto amplio en la habilidad de aprendizaje de la rata, presumiblemente como consecuencia, de nuevo, de un defecto en la función hipocampal.

4.5.3 *Otros cambios conductuales*

La bulbectomía olfatoria va asociada a déficits en la manifestación de la preferencia de plaza inducida por cocaína, reducción de la ingesta diaria de soluciones de sacarosa y sucrosa, disminución de la libido sexual y de la frecuencia de apareamiento, así como a conductas alteradas en los tests de ingesta condicionada de comida y de aversión de sabor (Kelly et al., 1997). Todos estos cambios han sido propuestos como parámetros conductuales que reflejarían la anhedonia presente en el

síndrome de la bulbectomía olfatoria y paradigmas experimentales de la misma o similar sintomatología presente en el enfermo deprimido.

Por el contrario, la adquisición y autoadministración de anfetamina están aumentadas en los animales bulbectomizados, lo que indicaría que la bulbectomía incrementa los efectos reforzadores de la anfetamina (Holmes et al., 2002). Hay evidencias de que el sistema dopaminérgico está alterado en la rata bulbectomizada. Además, el tubérculo olfatorio es un área que está implicada en los efectos de refuerzo de las drogas de abuso (Kornetsky et al., 1991). En particular, las densidades de receptores D₁ y D₂, y las respuestas dopaminérgicas mediadas a través de la adenilato ciclasa están incrementadas en los tubérculos olfatorios de estas ratas (Holmes et al., 2002). Estudios clínicos han revelado una asociación directa entre depresión y el abuso de drogas. Esto se puede deber a que las drogas de abuso alivian los síntomas de anhedonia que vienen asociados con la depresión. Estos hallazgos son de particular relevancia para la depresión humana ya que es frecuente la observación clínica de la coexistencia de trastornos afectivos y consumo/abuso de sustancias. Otros cambios conductuales observados son la conducta muricida y anormalidades en el ritmo circadiano (Van Riezen y Leonard, 1990).

4.6. Cambios conductuales en la ratas bulbectomizadas tras la administración crónica de antidepresivos

Existen multitud de estudios en los últimos treinta años que demuestran como muchos de los cambios conductuales y bioquímicos observados en la rata bulbectomizada se revierten tras el tratamiento crónico, que no agudo, con fármacos antidepresivos (Cairncross et al., 1977; Jesberger y Richardson, 1986; Van Riezen y Leonard, 1990; Kelly et al., 1997). El perfil conductual de las ratas bulbectomizadas sugiere que estos animales muestran una vulnerabilidad y una respuesta incrementada al estrés ambiental (Van Riezen y Leonard, 1990). Leonard y Tuite postularon que los déficits conductuales pueden resultar de una inapropiada reactividad a un ambiente novedoso, o a un fallo para habituarse a ese nuevo ambiente (Leonard y Tuite, 1981).

Otra posibilidad surge de la falta de habilidad olfatoria que hace que la rata bulbectomizada tarde más tiempo en habituarse a esos nuevos ambientes. Para investigar la contribución de la pérdida de habilidad olfatoria en el comportamiento de la rata bulbectomizada, Mar comparó los efectos de la anosmia causada por la bulbectomía con la anosmia inducida de forma periférica (Mar et al., 2000). En las ratas que fueron expuestas al laberinto elevado, se compararon los efectos de fluoxetina, amitriptilina, desipramina y buspirona entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control. Se encontró que estos antidepresivos incrementaron la tasa de habituación de las ratas bulbectomizadas independientemente de su condición anósmica. Este resultado demuestra que el fallo de las ratas bulbectomizadas para habituarse a un nuevo ambiente juega un importante papel en muchos de los déficits de comportamiento que se han estudiado, y que los antidepresivos normalizan ese déficit de habituación.

Hay suficientes evidencias de la variedad de respuestas conductuales que aparecen en estos animales tras la lesión en los bulbos olfatorios. Estos cambios son cuantificables y replicables, y revertidos tras el tratamiento crónico con varios tipos de antidepresivos. La elección del test conductual depende del interés del investigador. Para la detección de nuevos antidepresivos, el test del campo abierto o el test de evitación pasiva son los más utilizados. Desde hace más de treinta años, más de sesenta sustancias o fármacos psicotrópicos se han venido probando y han sido estudiados usando el test del campo abierto. La mayoría de los antidepresivos de uso clínico han demostrado ser activos cuando se han administrado crónicamente en las ratas bulbectomizadas, y tan sólo para el ISRS fluoxetina hay estudios que han dado resultados negativos (Kelly et al., 1997) o muy dependientes de las condiciones ambientales aversivas del test utilizado (Mar et al., 2000; Mar et al., 2002). Todos los cambios conductuales, de neurotransmisores, inmunológicos y endocrinos que ocurren en la rata tras la lesión bilateral de los lóbulos olfatorios, son semejantes, o pueden correlacionarse con aquellos cambios ocurridos en los pacientes con depresión mayor. Esto sugiere que el modelo de la rata bulbectomizada tiene validez aparente, predictiva, constructiva y quizás etiológica como modelo de depresión y que la investigación en este modelo puede ayudar a un entendimiento más profundo del mecanismo de acción de los antidepresivos y de la neurobiología de la depresión.

5. Hipótesis neurogénica de la depresión

El entendimiento de cómo funciona el cerebro y los fenómenos de adaptación y plasticidad que en él ocurren ha cambiado en los últimos años. Una gran cantidad de trabajos han demostrado que fenómenos de plasticidad celular y de comportamiento subyacen a niveles alterados de neurotransmisores, cascadas de segundos mensajeros, y perfiles de expresión génica. Estos fenómenos de plasticidad afectan a modelos de aprendizaje, memoria, ansiedad, depresión, etc... Sin embargo, empieza a haber evidencias de que cambios en la morfología celular y cambios a nivel más profundo todavía en la estructura del cerebro, pueden contribuir a la plasticidad y a la remodelación neuronal. A nivel celular estos cambios pueden ocurrir en la forma de regulación a la alta o a la baja en la formación de sinapsis y de la densidad de espinas o la extensión de las dendritas. Otro ejemplo de gran importancia es la regulación a la alta o a la baja de la neurogénesis en cerebro adulto. Estudios recientes demuestran que en el cerebro adulto nacen nuevas células y que la tasa de neurogénesis y la supervivencia de nuevas neuronas están reguladas por un gran número de tratamientos farmacológicos.

El papel potencial de la neurogénesis también se discute como mecanismo molecular que subyace a la regulación de los antidepresivos sobre la aparición de nuevas células y su supervivencia. Estos estudios sugieren la posibilidad de que la neurogénesis juegue un importante papel en el trastorno de la depresión mayor, aunque es una hipótesis que aún debe demostrarse con estudios mucho más detallados en pacientes deprimidos.

5.1. Alteraciones estructurales en los trastornos emocionales

La posibilidad de que la remodelación celular pueda contribuir a la patofisiología de los trastornos del ánimo ha ganado mucha fuerza a partir de los estudios clínicos de neuroimagen o imagen cerebral. Muchos de estos trabajos se han centrado en el hipocampo, una estructura límbica cerebral que juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria, así como en el control del eje hipotalámico-pituitario-adrenal

(HPA). Hay varios estudios que demuestran que el volumen del hipocampo está disminuido en pacientes que sufren de depresión, o trastorno de estrés postraumático (PTSD) (Bremner et al. 2000; Sheline et al., 1996, 1999; Steffens et al. 2000). Sheline et al. (1999) han demostrado que la reducción en el volumen del hipocampo se relaciona con la enfermedad, sugiriendo que el estrés asociado con depresión puede ser la causa de los cambios estructurales y no al contrario. Sin embargo, es posible que puedan ocurrir pequeños cambios estructurales que contribuyan a la aparición de la depresión y que la magnitud de la reducción hipocampal continúe en paralelo con el desarrollo de la enfermedad. Sería importante determinar si la reducción en el volumen del hipocampo es reversible con el tratamiento de antidepresivos (Steffens et al. 2000).

5.2. Regulación de la neurogénesis en el adulto

Existen trabajos que demuestran que el estrés puede producir efectos profundos en la morfología de neuronas hipocampales (McEwen 1999; Gould et al., 1999b). Estos incluyen un descenso en la arborización dendrítica de las neuronas piramidales del CA3 del hipocampo, y una regulación a la baja de la neurogénesis de células granulares en el giro dentado del cerebro adulto. La neurogénesis en cerebros adultos se ha descrito en numerosos animales, incluyendo al ser humano y está restringida a dos regiones, los bulbos olfatorios y el hipocampo (Gage 1998; Gould et al., 1999b; Gross 2000). En el hipocampo, las células progenitoras están localizadas en la zona subgranular, donde se dividen y dan lugar a nuevas neuronas. Un reciente estudio indica que hay unas nueve mil células nuevas por día en el hipocampo de roedor adulto (Cameron y McKay 2001). Aproximadamente el 50 % de estas células se diferencian y expresan marcadores moleculares característicos de neuronas, lo que representan el 6 % del total del número de células granulares. También se estima que el número de nuevas neuronas granulares representan alrededor del 60 % de las aferencias desde la corteza entorrinal y 30 % de las células piramidales del CA3 que reciben proyecciones eferentes de las células granulares (Cameron y McKay 2001). Estos hallazgos indican que el número de nuevas neuronas sería suficiente para contribuir de una forma significativa a la función del hipocampo. Se cree que el número de neuronas nuevas en cerebro de primates está

sobre un 10-20 % del total de nuevas células originadas, cantidad suficiente para influenciar la función del hipocampo en primates.

La posibilidad de que la neurogénesis juegue un papel en la plasticidad neuronal es apoyada por el hecho de que la neurogénesis en cerebro adulto puede estar regulada por una serie de tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. Estímulos que incrementan la neurogénesis incluyen el ejercicio, los ambientes variados, el aprendizaje dependiente de hipocampo, y los estrógenos (Tanapat et al., 1999; Van Praag et al., 2000; Gould et al., 1999a). Las alteraciones en la neurogénesis pueden ocurrir vía regulación de la tasa de proliferación celular o regulación del número de neuronas nacientes que sobreviven. Aproximadamente el 50 % de las nuevas neuronas en roedor adulto del hipocampo sobreviven, mientras que el resto degeneran en un espacio de unas cuatro semanas. Shors y Gould (2001) demostraron que la inhibición de la neurogénesis por administración de un inhibidor del ciclo celular bloqueaba el aprendizaje dependiente del hipocampo. Así pues, hay numerosas evidencias de que nuevas neuronas contribuyen a un buen funcionamiento en hipocampo adulto.

5.3. El estrés disminuye la neurogénesis adulta

En contraste con los efectos positivos del ejercicio y ambientes variados, el estrés regula significativamente a la baja la neurogénesis en hipocampo adulto (Gould et al., 1999b). La administración de glucocorticoides adrenales también disminuye la neurogénesis, indicando que la activación del eje HPA y la liberación de glucocorticoides están implicadas en la regulación a la baja de neurogénesis hipocampal como respuesta al estrés. Esta regulación a la baja de la neurogénesis por exposición al estrés abre la posibilidad de que un descenso en el número de células granulares podría contribuir a una reducción en el volumen del hipocampo observado en pacientes deprimidos. Esta neurogénesis disminuida podría contribuir a la aparición de determinados síntomas de trastornos afectivos, incluyendo anomalías cognitivas y pérdida del control inhibitorio del eje HPA (Gould et al., 1991).

5.4. El tratamiento con antidepresivos incrementa la neurogénesis en adultos

En estos últimos años se han hecho muchos progresos para caracterizar adaptaciones post-receptoriales que ocurren en respuesta a tratamientos con antidepresivos. Esto ha llevado al descubrimiento de que la administración prolongada de estos fármacos regula a la alta la cascada de señalización celular AMPc-CREB y la expresión de BDNF en el hipocampo (Nibuya et al., 1995, 1996; Thome et al., 2000). Tanto CREB como BDNF son conocidos por jugar un importante papel tanto en la plasticidad neuronal como en la supervivencia neuronal (Finkbeiner 2000; Duman et al., 2000).

Basándose en estos hallazgos, se han realizado estudios para determinar si los antidepresivos influían en la remodelación celular, particularmente la neurogénesis. Los resultados de estos trabajos indican que el tratamiento con antidepresivos incrementa la neurogénesis en el hipocampo adulto (Malberg et al., 2000; Duman et al., 2000; Jacobs et al., 2000). Esta regulación a la alta de la neurogénesis se observa con diferentes clases de antidepresivos, incluyendo inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina, IMAOs, y la terapia electroconvulsiva. Con el agente estabilizador litio también se ha demostrado un incremento de la neurogénesis en el hipocampo (Chen et al., 2000). La regulación a la alta de la neurogénesis es dependiente de la administración a largo plazo de los antidepresivos (de dos a cuatro semanas) y concordante con el tiempo que los antidepresivos suelen tardar en ejercer su efecto clínico. Se han probado otros fármacos psicotrópicos no antidepresivos, como haloperidol y morfina, y ninguno de ellos ha producido un efecto beneficioso para la neurogénesis, de hecho, la morfina la disminuye (Eisch et al., 2000). Estos resultados sugieren que es necesario un fármaco antidepresivo para obtener el efecto beneficioso de la neurogénesis. Además, tras el tratamiento con antidepresivos, se ha observado que las células nuevas permanecían viables tras cuatro semanas, y que aproximadamente un 75 % de estas células expresaban marcadores de neuronas (Malberg et al., 2000).

Así pues, los resultados de varios estudios indican y demuestran que la regulación a la alta de la neurogénesis por los antidepresivos se opondría a las acciones del estrés y

que una neurogénesis incrementada podría contribuir a las acciones del tratamiento con antidepresivos (Duman et al., 2001).

5.5. Factores implicados en la regulación de neurogénesis adulta

5.5.1. Factores neurotróficos

Existen varios trabajos que han demostrado que la neurogénesis está regulada por varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) (Cameron et al., 1998). También hay evidencias de que factores neurotróficos, como el BDNF, modularían la neurogénesis. La incubación de células progenitoras con BDNF incrementa la diferenciación de dichas células a neuronas (Palmer et al., 1997). Hay también estudios *in vivo* donde se ha demostrado que el BDNF administrado intraventricularmente incrementa la neurogénesis en la zona subventricular (Zigova et al., 1998).

5.5.2. Regulación por serotonina

El papel de la 5-HT en la regulación del desarrollo del sistema nervioso central es bien conocido desde el trabajo pionero de Haydon (Haydon et al., 1984). Muchos otros trabajos han profundizado en la regulación ejercida por este neurotransmisor y sus receptores, fundamentalmente el subtipo 5-HT_{1A}, en las etapas pre y postnatal (Borella et al., 1997, Del Olmo et al., 1998).

Con estos antecedentes, no es sorprendente que se haya propuesto un papel para la 5-HT en la regulación de la neurogénesis adulta. En este sentido, se ha demostrado que la lesión del sistema serotoninérgico conlleva un descenso de la neurogénesis (Brezun y Daszula, 2000) y que el aumento de liberación de la amina la incrementa, efecto que es antagonizado por WAY 100635, sugiriendo la mediación del receptor 5-HT_{1A} (Jacobs et al., 2000). Más recientemente, Banasr et al., (2004) han confirmado el papel de este

subtipo de receptor, y, en menor medida, del 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} en la regulación de la proliferación celular hipocampal. Por último, es importante comentar los recientes resultados que sugieren que la administración de un agonista 5-HT₄ induce respuesta neuroproliferativa en hipocampo (datos de nuestro grupo), una respuesta que podría estar ligada a su potencialidad antidepressiva (Lucas et al., 2007).

5.5.3. Cascada de señalización celular -CREB

Se ha descrito un incremento de la diferenciación neuronal en células progenitoras cultivadas tras la activación de la cascada del AMPc (Palmer et al. 1997). El papel potencial de la cascada del AMPc-CREB en la neurogénesis tiene mucha más relevancia después de que varios estudios han demostrado que los antidepressivos regulan a la alta esta vía de señalización (Duman et al., 1997, 2000). Uno de esos hallazgos fue el incremento de fosforilación de CREB tras el tratamiento con antidepressivos (Thome et al., 2000). Otro punto a tener en cuenta es que bajo condiciones basales había una expresión prominente de pCREB en células de la zona subgranular, o adyacentes a la misma, que es la zona donde se localizan las células progenitoras. En otro estudio, un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo IV, una enzima que rompe el AMPc, resultó ser un activador de la vía AMPc. Previamente, se había visto que otro inhibidor de esta fosfodiesterasa, el rolipram, incrementaba la expresión de BDNF en hipocampo (Nibuya et al., 1996). En estudios preliminares se encontró que la administración crónica de rolipram incrementaba neurogénesis en hipocampo (Kim et al., 2000). El incremento de la neurogénesis ocurrió tras dos semanas de tratamiento, el mismo período que tardan en ejercer este efecto los antidepressivos. El rolipram también aumenta los niveles de pCREB en el hipocampo, similar al efecto del tratamiento con antidepressivos. Estos hallazgos sugieren que la activación de AMPc-CREB regularía genes específicos que influyen la neurogénesis.

OBJETIVOS

Como objetivo general, en el presente proyecto abordaremos el estudio de los cambios adaptativos en los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico y endocannabinoide, en la expresión de diversos marcadores de neuroplasticidad y en la neurogénesis hipocampal en el modelo animal de depresión de bulbectomía olfatoria bilateral en la rata así como el efecto del tratamiento crónico con el antidepresivo.

Los objetivos concretos del presente trabajo son:

1. Evaluar las alteraciones conductuales inducidas por la bulbectomía olfatoria y el efecto que la administración crónica de fluoxetina ejerce sobre dichas manifestaciones conductuales.
2. Analizar, mediante técnicas radiométricas, los posibles cambios adaptativos en la densidad y la funcionalidad del transportador de serotonina (5-HTT) y de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} tras la bulbectomía olfatoria y el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina.
3. Analizar, mediante técnicas radiométricas, los posibles cambios adaptativos en la densidad y la funcionalidad del receptor cannabinoide CB₁ tras la bulbectomía olfatoria y el tratamiento crónico con fluoxetina.
4. Estudiar los posibles cambios en la expresión de los siguientes marcadores moleculares de neuroplasticidad tras la bulbectomía olfatoria y el tratamiento crónico con fluoxetina: factor BDNF y su receptor TrkB mediante técnicas de hibridación *in situ* y diversas proteínas intracelulares como ERK/pERK, CREB/pCREB, AKT y β -catenina utilizando técnicas de inmunodetección por Western-blot.

Objetivos

5. Valorar la existencia de modificaciones en la neurogénesis hipocampal a consecuencia de la bulbectomía olfatoria y su posible modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina mediante técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia.
6. Establecer las posibles correlaciones entre los cambios conductuales, neuroquímicos, moleculares y celulares inducidos por la bulbectomía olfatoria y el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho *Sprague-Dawley* (suministradas por el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal “SEEA” de la Universidad de Cantabria) con un peso comprendido entre 250-280 gramos al inicio de los experimentos. Hasta su utilización en los experimentos y sacrificio, se les mantuvo con agua y una dieta estándar *ab libitum* (pienso A04 para dieta de mantenimiento de ratas y ratones, SAFE, Francia). Los animales fueron estabulados bajo determinadas condiciones de luz (ciclos de luz-oscuridad de 12 horas) y a una temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad relativa (60-70%) adecuadas.

El cuidado y la manipulación experimental de los animales se realizó de acuerdo a la normativa vigente tanto nacional (Real Decreto 1201/2005) como europea (Declaración de Helsinki y Directiva de la CEE 86/609/EEC) y siguiendo las líneas del Comité de Investigación y Ética de la IASP –Asociación Internacional para el Estudio del Dolor- (Zimmermann, 1983). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria.

2. Grupos experimentales

Se definieron 4 grupos experimentales, de acuerdo a los objetivos planteados en la presente tesis: animales control o *sham-operated* (CO), animales control o *sham-operated* y tratados con fluoxetina (COF), animales bulbectomizados (OB) y animales bulbectomizados y tratados con fluoxetina (OBF). Se plantearon las siguientes series experimentales de acuerdo a las técnicas utilizadas:

- 2.1. Autorradiografía anatómica y funcional del receptor 5-HT_{1A}
- 2.2. Autorradiografía anatómica y funcional del receptor 5-HT_{1B}
- 2.3. Autorradiografía anatómica y funcional del receptor 5-HT_{2A}
- 2.4. Autorradiografía anatómica y funcional del receptor CB₁
- 2.5. Autorradiografía del transportador de serotonina (5-HTT)

- 2.6. Estudios de *binding* para el receptor CB₁: fijación de [³H]-CP55,940 y fijación de [³⁵S]GTPγS en membranas de corteza prefrontal
- 2.7. Hibridación *in situ* del receptor TrkB y del factor neurotrópico BDNF.
- 2.8. Estudios de western-blot de diversos marcadores moleculares implicados en neuroplasticidad y supervivencia neuronal
- 2.9. Estudios de inmunohistoquímica para neurogénesis: inmunofluorescencia de BrdU e inmunohistoquímica de β-catenina por DAB

En cada una de las series experimentales el número de animales inicialmente utilizado para cada grupo experimental fue de: CO = 5-7; CO FLX= 6-8; OB= 7-8; y OB FLX= 8-10. La *n* definitiva de cada grupo viene reflejada en la sección de resultados obtenidos con cada técnica experimental.

Adicionalmente, para valorar la persistencia del síndrome de bulbectomía a lo largo del tiempo se realizaron otras series experimentales con los grupos CO y OB. Se llevó a cabo la evaluación conductual en el test de campo abierto en distintos tiempos postcirugía (30, 45 y 90 días) y posteriormente, los animales fueron sacrificados para la obtención de los tejidos que luego serían utilizados en los estudios de western para valorar la expresión de marcadores moleculares de plasticidad/supervivencia neuronal.

3. Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral

El procedimiento quirúrgico para realizar la bulbectomía olfatoria bilateral que hemos utilizado ha sido ampliamente descrito en la literatura (Cairncross et al, 1977). El agente anestésico utilizado fue el hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p., Panreac, Barcelona, España). Los animales fueron colocados en un cuadro estereotáxico (Kopf, David Kopf Instruments, Tujunga, California). Una vez anestesiado el animal, se hizo una incisión en el cuero cabelludo sobre el hueso frontal y se procedió a la osteotomía realizando 2 perforaciones de 2 milímetros de diámetro (a 2 milímetros de la línea media y a unos 7-8 milímetros anteriores a bregma) utilizando un taladro quirúrgico. Con cuidado de no dañar el polo frontal del cerebro, se seccionaron y aspiraron los bulbos olfatorios a

través de una aguja o cánula roma. Una vez aspirados, se aplicó polvos antibióticos y se procedió a la sutura del cuero cabelludo con seda trenzada 3.0 (suturas Aragón, Barcelona, España). Los animales control (CO) fueron tratados de forma similar pero sin proceder a la aspiración de los bulbos (*sham-operated*).

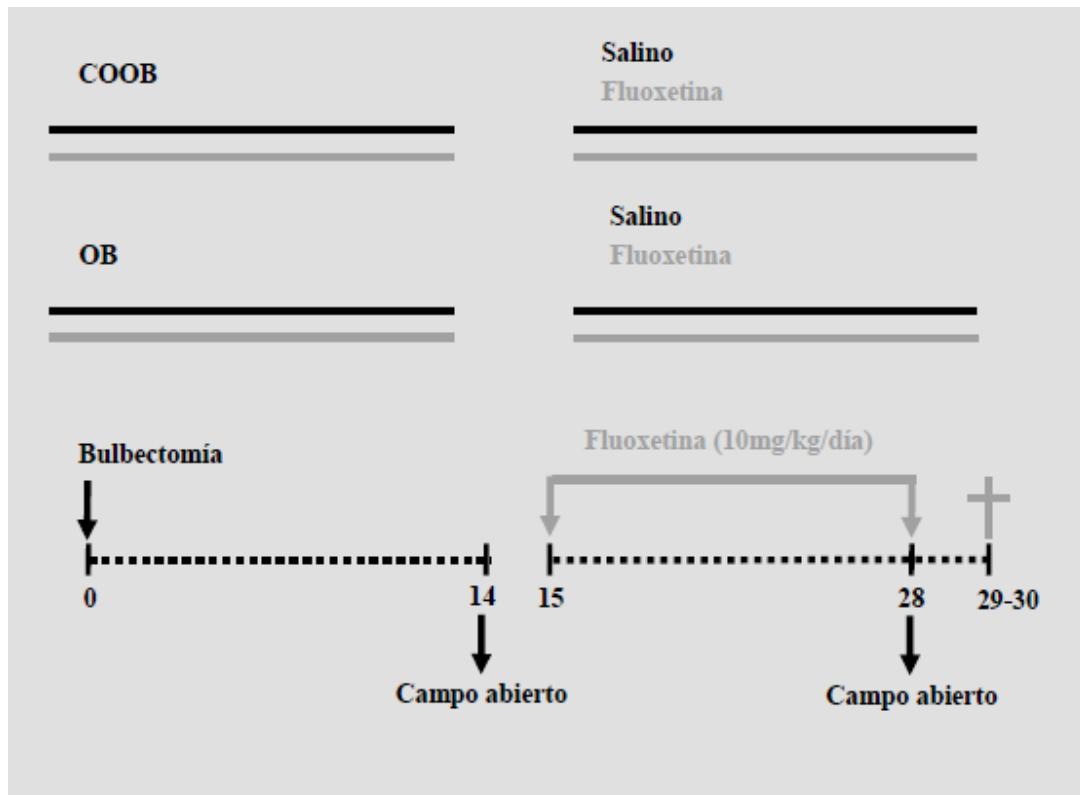
Los animales bulbectomizados y controles fueron estabulados de forma que cada animal bulbectomizado compartió jaula al menos con un animal control, para reducir la posible agresividad a veces presente en el síndrome de bulbectomía olfatoria. Además, todos los animales fueron periódicamente manipulados y tocados durante su estancia en el estabulario para reducir dicha agresividad. A final de los estudios conductuales, los animales fueron sacrificados para la obtención de los tejidos a utilizar en el resto de las técnicas. Aquellos animales que presentaron restos de bulbo olfatorio o lesiones del polo frontal (< 5 % de los animales bulbectomizados) fueron eliminados del estudio.

4. Tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina

Se administró fluoxetina HCl (suministrada por FAES FARMA S.A., Leioa, Bilbao), antidepresivo perteneciente a la clase química de las fenetilaminas, a una dosis de 10 mg/kg/día. El fármaco o su vehículo fueron administrados subcutáneamente (s.c.) durante 14 días mediante minibombas osmóticas Alzet 2002 (Alza Corp., Palo Alto, CA) que liberan 0,5 µl/h siguiendo un protocolo ampliamente utilizado en nuestro laboratorio (Castro et al., 2003 y 2008). Como solvente de la fluoxetina se empleó la siguiente mezcla: 10% etanol, 50% propilenglicol y 40% salino. Tras realizar una serie de estudios preliminares se comprobó la ausencia de efectos conductuales y neuroquímicos del vehículo solvente de la fluoxetina en las ratas bulbectomizadas (OB), de forma similar a lo ya descrito en nuestro laboratorio en ratas o animales control (Castro et al., 2003). Por este motivo, en las distintas series experimentales empleadas en este estudio no se implantó la minibomba con el vehículo de fluoxetina ni a los animales control (*sham-operated*) ni a las ratas bulbectomizadas.

5. Protocolo o cronograma experimental

En el esquema se muestra el protocolo experimental seguido sistemáticamente para todos los tipos de estudios del presente trabajo. Como puede verse, la evaluación conductual del síndrome de bulbectomía olfatoria se realizó 2 semanas después la cirugía (bulbectomía y *sham-operation*). Al día siguiente, se procedió a iniciar el tratamiento con el antidepresivo fluoxetina y los animales fueron evaluados conductualmente, de nuevo, al final del tratamiento (día 28 postcirugía). Una vez concluidos los estudios conductuales se procedió a su sacrificio, una vez retirada la minibomba y transcurrido un período de “wash-out” de 24 horas (Castro et al., 2003), con la finalidad de obtener y procesar las muestras cerebrales empleadas en las distintas técnicas neuroquímicas, moleculares e histológicas.



6. Estudios conductuales: test del campo abierto

El test del campo abierto (*open-field test*) consiste en evaluar la conducta del animal en un recinto cuadrado de 100x100 cm y de 50 cm de alto, con paredes de pintura reflectante, y cuya base se divide en 25 cuadrículas, todo ello iluminado con una luz de 60W situada centralmente a 90 centímetros de altitud (Gray y Lalljee, 1974)

En cada sesión, el animal se colocó en el centro del recinto, y se contabilizaron los siguientes parámetros durante 5 minutos a intervalos de 1 minuto: las deambulaciones (número de cuadrículas centrales o periféricas cruzadas), los alzamientos (alzamientos sobre las patas traseras en actitud exploratoria), los acicalamientos (uso de patas o lengua para limpiarse) y el número de defecaciones (bolos fecales). Después de cada test, el aparato del campo abierto fue limpiado con agua para evitar cualquier olor residual.

El test se realizó siempre, en todas las series experimentales, a las 2 semanas después de la cirugía para confirmar el síndrome de bulbectomía olfatoria, así como tras las otras dos semanas de administración del antidepresivo fluoxetina. Adicionalmente, en otras series experimentales se realizó el test a los 30, 45 y 90 días después de la bulbectomía para estudiar el curso temporal de las alteraciones conductuales.

Todos los datos de los estudios conductuales se expresan como la media \pm E.E.M. Como test estadístico para el análisis de los resultados se usó el test de la *t* de Student, para aquellos casos en los que únicamente se analizó el parámetro cirugía (bulbectomía/*sham-operation*), mientras que se utilizó un análisis ANOVA de dos vías seguidos de un test *post hoc* de Newman-Keuls en los casos en los que se analizó el parámetro tratamiento (fluoxetina/no fluoxetina) además del parámetro cirugía. Se escogió una probabilidad de *p* menor o igual a 0.5 como nivel de significancia estadística (GraphPad Prism 5.01 de GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7. Estudios de autorradiografía de receptores en SNC

7.1. Preparación de tejidos para los estudios de autorradiografía anatómica y funcional

Los animales bulbectomizados y controles fueron sacrificados después de realizar el test del campo abierto, una vez finalizado el tratamiento crónico con fluoxetina y tras un período de “wash-out” de 24 horas. Se extrajeron los cerebros y se almacenaron congelados a -80°C hasta el momento de la obtención de las secciones cerebrales utilizadas en los estudios autorradiográficos anatómicos (densidad y localización de receptores mediante estudios de fijación de radioligandos) y en los estudios autorradiográficos funcionales (estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γ S por agonistas selectivos de receptores). Se obtuvieron secciones coronales en un criostato (20 μm) (Microm HM 550, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) que fueron montadas en portas pretratados con gelatina. Los portas con las secciones obtenidas fueron guardados a una temperatura de -80°C hasta su utilización. La gelatinización de los portas se realizó mediante inmersión, durante tres segundos, en una solución que contenía 5 g/l de gelatina y 1,98 g/l de $\text{KCr}(\text{SO}_4)$, seguida de una fase de secado durante 24 horas en una estufa a 50°C . Las secciones cerebrales fueron seleccionadas de acuerdo con el atlas de George Paxinos y Charles Watson (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academia Press 1982), siendo las más relevantes para el presente estudio aquellas correspondientes a los niveles 6, 12, 21, 26, 30, 35, 37.

7.2. Autorradiografía anatómica

7.2.1. Autorradiografía del transportador de serotonina (5-HTT): fijación de [^3H]-citalopram

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [^3H]-citalopram (Amersham, Buckinghamshire, UK) fueron las descritas en protocolos previos (D'Amato et al., 1987). Los tejidos fueron llevados a temperatura ambiente

durante 30 minutos antes de comenzar el experimento. Se realizó una preincubación a 25°C durante 15 minutos en el tampón de ensayo conteniendo Tris-HCl 50 mM (Panreac, Barcelona, España), NaCl 120 mM (Panreac, Barcelona, España) y KCl 5 mM (Panreac, Barcelona, España) a pH= 7,4 con el objeto de facilitar la disociación de ligandos endógenos.

La incubación se realizó a 25°C durante 2 horas en presencia de [³H]-citalopram a una concentración de 2 nM, en el mismo tampón que el de la preincubación. Tras un aclarado rápido en el mismo tampón a 4°C, se realizaron 4 lavados consecutivos de 2 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó fluoxetina a 20 µM, añadida al medio de incubación.

7.2.2. Autorradiografía del receptor 5HT_{1A}: fijación de [³H]-8-OH-DPAT

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³H]-8-OH-DPAT (Perkin Elmer, Boston, USA) fueron las descritas en protocolos previos (Pazos y Palacios, 1985b). Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C a la temperatura ambiente 30 minutos antes de comenzar el experimento. Se realizó una preincubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en el tampón de ensayo conteniendo Tris-HCl 170 mM (Panreac, Barcelona, España), CaCl₂ 4 mM (Panreac, Barcelona, España) y ácido ascórbico 0,01% (Panreac, Barcelona, España) a pH= 7,7 para facilitar la disociación de ligandos endógenos.

La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora en presencia de [³H]-8-OH-DPAT a una concentración de 2 nM, en el mismo tampón de preincubación al que se le añadió pargilina 10 µM (Sigma, Missouri, USA). Tras un aclarado rápido en el tampón de lavado (Tris-HCl 170 mM, pH=7,7) a 4°C, se realizaron 2 lavados consecutivos de 5 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío.

Para la definición del no-específico se utilizó 5-HT-creatín sulfato a 10 μM (Sigma, Missouri, USA), añadida al medio de incubación.

7.2.3. Autorradiografía del receptor 5HT_{1B} : fijación de [^3H]-GR125,743

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [^3H]-GR125,743 (Amersham, Buckinghamshire, UK) fueron las descritas en protocolos previos (Doménech et al., 1997). Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C , 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en el tampón de ensayo conteniendo Tris-HCl 170 mM, CaCl_2 4 mM y ácido ascórbico 0,01% a $\text{pH}= 7,7$ para facilitar la disociación de ligandos endógenos.

La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora en presencia de [^3H]-GR125,743 a una concentración de 2 nM, en el mismo tampón de prelavado al que se le añadió pargilina 10 μM . Tras un aclarado rápido en el tampón de lavado (Tris-HCl 170 mM, $\text{pH}=7,7$) a 4°C , se realizaron 2 lavados consecutivos de 5 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C . Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó 5-HT-creatín sulfato a 10 μM , añadida al medio de incubación.

7.2.4. Autorradiografía del receptor 5HT_{2A} : fijación de [^3H]-ketanserina

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [^3H]-ketanserina (Perkin Elmer, Boston, USA) fueron las descritas en protocolos previos (Pazos et al., 1985a). Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C , 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a temperatura ambiente durante 15 minutos en el tampón de ensayo conteniendo Tris-HCl 170 mM, CaCl_2 4 mM y ácido ascórbico 0,01%, a $\text{pH}= 7,7$ para facilitar la disociación de ligandos endógenos.

La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas en presencia de [³H]-ketanserina a una concentración de 2 nM, en el mismo tampón de prelavado al que se le añadió pargilina 10 μM. Tras un aclarado rápido en el mismo tampón de lavado (Tris-HCl 170 mM, pH=7,7) a 4°C, se realizaron 2 lavados consecutivos de 5 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó mianserina a 10 μM (Sigma, Missouri, USA), añadida al medio de incubación.

7.2.5. Autorradiografía del receptor CB₁: fijación de [³H]-CP55,940

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³H]-CP55,940 (Perkin Elmer, Boston, USA) fueron las descritas en protocolos previos (Glass et al., 1997) con ligeras modificaciones (Mato y Pazos 2004). Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C, 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en el tampón del ensayo conteniendo Tris-HCl 50 mM, seroalbúmina bovina BSA 5% (Sigma, Missouri, USA) a pH= 7,4 para facilitar la disociación de ligandos endógenos.

La incubación se realizó a 37°C durante 2 horas en presencia de [³H]-CP55,940 a una concentración de 3 nM, en el mismo tampón que el de la preincubación. Tras un aclarado rápido en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, BSA 1%, pH= 7,4) a 4°C, se realizaron 2 lavados consecutivos de 2 horas en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó WIN 55212-2 a 10 μM (Research Biochemicals Inc., Natick, MA, USA), añadida al medio de incubación. Los coplins de preincubación e incubación eran de cristal y fueron pretratados con Sigmacote (Sigma, Missouri, USA), dejándolos secar la noche anterior del experimento en una estufa a 40°C. Este pretratamiento pretende evitar la adhesión de los compuestos cannabinoides al material del ensayo de incubación.

7.3. Autorradiografía funcional: fijación de [³⁵S]GTPγS

7.3.1. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{1A}: estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista 5HT_{1A} (±)-8-OH-DPAT

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³⁵S]-GTPγS (Amersham, Buckinghamshire, UK) fueron las descritas en protocolos previos (Sim et al. 1997; Castro et al., 2003 y 2008) con ligeras modificaciones. Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C, 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a 25°C durante 20 minutos en el tampón del ensayo conteniendo Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 3 mM a pH =7,7 seguida de una segunda preincubación a 25°C durante otros 20 minutos en el mismo tampón al que se añadió GDP 2 mM, adenosín deaminasa 10 mU/ml y DTT 1 mM.

La incubación se realizó en el mismo tampón a 25°C durante 2 horas en ausencia (fijación basal) o en presencia (fijación estimulada) del agonista selectivo 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT a 10 μM (Tocris, Bristol, UK) y de [³⁵S]GTPγS a una concentración de 0,05 nM. La selectividad de la respuesta inducida por el agonista fue confirmada coincubando secciones consecutivas en presencia del antagonista WAY 100635 a 10 μM (Tocris, Bristol, UK). Tras un aclarado rápido en el tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM a 4°C), se realizaron 2 lavados consecutivos de 15 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó GTPγS a 10 μM (Sigma, Missouri, USA) sin marcar radiactivamente.

7.3.2. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{1B}: estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista 5HT_{1B/D} GTI

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³⁵S]GTPγS fueron las descritas en protocolos previos (Sim et al. 1997) con ligeras

modificaciones. Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C , 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a 25°C durante 20 minutos en el tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM y MgCl_2 3 mM, $\text{pH} = 7,7$), seguida de una segunda preincubación a 25°C durante otros 20 minutos, en el mismo tampón al que añadimos GDP 2 mM, adenosín deaminasa 10 mU/ml y DTT 1 mM.

La incubación se realizó a 25°C durante 2 horas en ausencia o presencia del agonista selectivo 5-HT_{1B/D} GTI a 10 μM (Sigma, Missouri, USA) y de [³⁵S]GTP γ S a una concentración de 0,05 nM, en el mismo tampón que el de la segunda preincubación. La selectividad de la respuesta inducida por el agonista fue confirmada coincubando secciones consecutivas en presencia del antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1B} SB-224289 a 10 μM (Tocris, Bristol, UK). Tras un aclarado rápido en tampón de lavado (Tris-HCl 50mM a 4°C), se realizaron 2 lavados consecutivos de 15 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C . Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó GTP γ S a 10 μM sin marcar radiactivamente.

7.3.3. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{2A}: estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S por el agonista 5HT_{2A} TCB-2

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³⁵S]GTP γ S fueron las descritas en protocolos previos (Sim et al. 1997) pero con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio, en concreto disminuir la concentración de GDP de 2 a 1 mM para intentar cuantificar estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S por agonistas parciales o poco potentes, por lo tanto con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la técnica. Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C , 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a 25°C durante 20 minutos en el tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM y MgCl_2 3 mM, $\text{pH} = 7,7$), y una segunda preincubación

a 25°C durante otros 20 minutos, en el mismo tampón al que añadimos GDP 1 mM, adenosín deaminasa 10 mU/ml y DTT 1 mM.

La incubación se realizó a 25°C durante 2 horas en ausencia o presencia del agonista selectivo 5-HT_{2A} TCB-2 100 µM (Tocris, Bristol, UK) y [³⁵S]GTPγS a una concentración de 0,05 nM, en el mismo tampón que el de la segunda preincubación. La selectividad de la respuesta inducida por el agonista TCB-2 fue confirmada coincubando secciones consecutivas en presencia del antagonista selectivo de receptores 5-HT_{2A} MDL 11,939 a 10 µM (Tocris, Bristol, UK). Tras un aclarado rápido en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM a 4°C), se realizaron 2 lavados consecutivos de 15 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C. Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó GTPγS a 10 µM sin marcar radiactivamente.

7.3.4. Autorradiografía funcional del receptor CB₁: estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista CB₁ WIN 55212-2

Las condiciones específicas utilizadas para los ensayos autorradiográficos con [³⁵S]GTPγS fueron las descritas en protocolos previos (Sim et al. 1997) con ligeras modificaciones. Se sacaron los tejidos de su almacenaje a -80°C, 30 minutos antes de comenzar el experimento para que se atemperaran. Se realizó una preincubación a 25°C durante 20 minutos en el tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 3 mM, pH =7,7), y una segunda preincubación a 25°C durante otros 20 minutos, en el mismo tampón al que añadimos GDP 2 mM, adenosín deaminasa 10 mU/ml, DTT 1 mM y BSA al 0,5%.

La incubación se realizó a 25°C durante 2 horas en presencia del agonista cannabinoide WIN 55212-2 a 10 µM y de [³⁵S]GTPγS a una concentración de 0,05 nM, en el mismo tampón que el de la segunda preincubación. La selectividad de la respuesta inducida por el agonista WIN 55212-2 fue confirmada coincubando secciones consecutivas en presencia del antagonista selectivo de receptores CB₁ SR141716A a 10

μM (Sanofi Reserche, Montpellier, Francia a $10 \mu\text{M}$ (Tocris, Bristol, UK). Tras un aclarado rápido en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM y BSA $0,1\%$ a 4°C), se realizaron 2 lavados consecutivos de 15 minutos en el mismo tampón a 4°C y posterior aclarado en agua destilada a 4°C . Finalmente se procedió al secado mediante una corriente de aire frío. Para la definición del no-específico se utilizó GTP γS a $10 \mu\text{M}$ sin marcar radiactivamente.

7.4. Generación de los autorradiogramas

Para la obtención de los autorradiogramas las secciones incubadas, una vez secas, fueron colocadas en íntima aposición a un film radiosensible a la radiación β (KODAK Biomax MR Film, Scientific Imaging Film, Nueva York, EEUU) en el interior de un chasis fotográfico (X-Omatic Regular, Kodak, EEUU) a 4°C (Kuhar, 1985; Palacios et al. 1981). La exposición de las secciones incubadas se realizó conjuntamente con patrones radioactivos bien de tritio (^3H -microscales, Amersham Pharmacia-Biotech, España) o de carbono (^{14}C -microscales, Amersham Pharmacia-Biotech, España) para las autorradiografías anatómicas y funcionales respectivamente y con las que se construyeron las curvas de calibración de densidades de gris (O.D.) versus radioactividad (nCi/mg o gr de tejido equivalente).

Finalmente, los films fueron revelados de forma convencional (revelado y fijador de Kodak, Madrid, España) obteniendo las imágenes autorradiográficas después de transcurridos los siguientes tiempos de exposición:

- a) autorradiografías anatómicas de receptores y transportador: entre 2,5-3,5 meses.
- b) autorradiografías funcionales con concentraciones de GDP a 2 mM (5-HT $_{1A}$, 5-HT $_{1B}$ y CB $_1$): 48 horas.
- c) autorradiografías funcionales con concentraciones de GDP a 1 mM (5-HT $_{2A}$): 24-36 horas.

7.5. Análisis de los datos de los autorradiogramas

Las densidades autorradiográficas se determinaron por densitometría (densidad de gris vs. radiactividad) usando el programa Scion 4.03 Image Software (Scion Corporation, Maryland, USA). Se obtuvieron valores de densidad óptica relativa de las secciones (medidas bilaterales) y los valores fueron convertidos a nCi/mg de tejido (en los estudios de fijación al receptor de [³H]-ligandos) y nCi/g de tejido (en los estudios de estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS). Las densidades autorradiográficas de los receptores y del transportador se expresan como fmol/mg de tejido equivalente (fmol/mg de tejido) y los datos de la fijación de [³⁵S]GTPγS se presentan como porcentaje de la fijación basal de [³⁵S]GTPγS tomado como el 100%. Los resultados autorradiográficos vienen representados como la media ± E.E.M. de *n* animales por grupo experimental.

Para el análisis estadístico de los resultados autorradiográficos se usó un ANOVA de dos vías, realizando un test Student-Newman-Keuls como test *post hoc* para comprobar las diferencias entre los grupos bulbectomizados y control así como las diferencias entre grupos tratados con fluoxetina o no tratados, y la relación entre ambos. Se escogió una probabilidad de *p* menor o igual a 0.5 como nivel de significación estadística (GraphPad Prism 5.01 de GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

8. Estudios de fijación de radioligandos en homogenizados de membranas

Los resultados obtenidos, en los estudios autorradiográficos, sobre la funcionalidad del receptor CB₁ en el cerebro del animal bulbectomizado y el efecto de la fluoxetina crónica plantearon la realización de ensayos complementarios en homogenizados de membranas de corteza prefrontal (que a continuación se describen) con el fin de determinar la densidad máxima (B_{max}) y afinidad del receptor CB₁ así

como la eficacia (Emax) y potencia (EC₅₀) del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 para estimular la fijación específica de [³⁵S]GTPγS.

8.1. Preparación de homogeneizados de membranas de corteza prefrontal

Una vez realizadas la pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados 24 h después de la extracción de las minibombas osmóticas. Se extrajeron los cerebros, se disecó bilateralmente la corteza prefrontal y las muestras fueron posteriormente almacenadas a -80°C hasta la preparación de los homogeneizados de membranas sinaptosomales.

Las muestras de corteza prefrontal fueron homogeneizadas (1:100 peso/vol) en un tampón frío (Tris HCl 50 mM , pH = 7,4, sucrosa 0,32 M, EGTA 1 mM, y leupeptina 25 ug/ml). Los homogeneizados tisulares se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga refrigerada tipo Sorvall RC-5B, rotor SE-12, DuPont, Newtown, CT, USA). El sobrenadante se centrifugó a 13.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El pellet se resuspendió en tampón (Tris-HCl 50 mM pH = 7,4, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1mM y DTT 1 mM) y fue recentrifugado a 13.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El pellet final obtenido se almacenó a -80 °C hasta su uso para los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS y de fijación de [³H]-CP55,940. Se realizó La determinación de la cantidad de proteínas de las muestras empleadas en el ensayo (mg/ml) se realizó según el método propuesto por Lowry et al. (1951).

8.2. Fijación de [³H]-CP55,940 en membranas de corteza prefrontal

Los experimentos de fijación se realizaron de acuerdo a la literatura previa (Hungund et al. 2004) incubando alícuotas de membranas de corteza prefrontal (10-20 μg de proteína) en un volumen total de 250 μl con: tampón frío (Tris HCl 50 mM a pH = 7,4, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1mM y DTT 1 mM), [³H]-CP55,940

(0,0125-3,2 nM), y BSA 1 % durante 1 hora a 37°C y usando tubos tratados con Sigmacote. La fijación no específica se definió con WIN 55,212-2 (10 µM).

La incubación se terminó añadiendo 2 ml de tampón de filtración (BSA 0,1 % en Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4 a 4 °C) a los tubos de incubación, posterior filtración a través de filtros Whatman GF/C pretratados con polietilenimina (0,1%) y finalmente 3 lavados con tampón (Brandel 24-position cell harvester; Brandel, Gaithersburg, Maryland, USA). La radioactividad contenida en los filtros se midió por espectroscopia en líquido de centelleo Ecoscint A (National Diagnosis, Atlanta, USA) mediante un contador de centelleo líquido Beckman LS 6000IC (Beckman Instruments Inc, CA, USA) durante un minuto.

8.3. Estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS en membranas de corteza prefrontal por el agonista CB₁ WIN 55,212-2

Los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS se realizaron como está descrito en la literatura previa (González-Maeso et al. 2000) con ligeras modificaciones. Se incubó una alícuota de homogeneizados de membrana (50 µg de proteína) durante 2 horas a 30°C en el tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, adenosín deaminasa 3 mU/m, pH = 7,4 y BSA 0,1%) conteniendo GDP a 50 µM y [³⁵S]GTPγS a 0,1 nM utilizando tubos tratados con Sigmacote. Se ensayó un amplio rango de concentraciones del agonista para el receptor CB₁ WIN 55,212-2 (10⁻⁹ a 10⁻³ M) para estudiar (potencia y eficacia) la estimulación fijación del [³⁵S]GTPγS. La actividad basal fue determinada en ausencia de WIN 55,212-2, la fijación estimulada en presencia del agonista, y la fijación no específica en presencia de GTPγS a 10 µM. La especificidad farmacológica de la respuesta inducida por el agonista fue comprobada usando el antagonista selectivo CB₁ SR141716A a 10 µM en presencia del agonista en los tubos correspondientes. Al final de la incubación, el filtrado y lavado de la mezcla se realizó de igual manera que la descrita anteriormente, en un tampón de filtrado (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4 a 4°C, BSA 0.1%) y usando filtros GF/C no pretratados. La radioactividad contenida en los filtros se midió por

espectroscopia en líquido de centelleo Ecoscint A (National Diagnosis, Atlanta, USA) mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS 6000IC (Beckman Instruments Inc, CA, USA) durante un minuto.

8.4. Análisis de datos

Los experimentos de fijación de [³H]-CP55,940 y de [³⁵S]GTPγS en membranas de corteza prefrontal se llevaron a cabo usando triplicados y los resultados se expresan como la media ± E.E.M. de los *n* valores obtenidos de cada grupo experimental. La B_{max} (fijación máxima, fmol/mg proteína) y K_D (afinidad por el receptor, nM) para los estudios de fijación de [³H]-CP55,940, y E_{max} (máximo efecto estimulador expresado como porcentaje de la fijación basal) y pEC₅₀ (potencia expresada como -logEC₅₀) para los experimentos de fijación a [³⁵S]GTPγS en membranas de corteza prefrontal fueron determinados por un análisis de regresión no lineal. Los análisis para los datos de las fijaciones de [³H]-CP55,940 y [³⁵S]GTPγS se realizaron usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Como test estadístico para el análisis de estos datos se usó un ANOVA de dos vías, realizando un test Newman-Keuls como test *post hoc*, para comprobar las diferencias entre los grupos bulbectomizados y no bulbectomizados así como las diferencias entre grupos tratados con fluoxetina o no tratados, y la relación entre ambos. Se escogió una probabilidad de *p* menor o igual a 0,5 como nivel de significación estadística (GraphPad Prism 5.01, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

9. Estudios de hibridación *in situ* del receptor TrkB y del BDNF

9.1. Pretratamiento de los tejidos para la hibridación *in situ*

Una vez realizadas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la extracción de las minibombas osmóticas mediante decapitación. Se

extrajeran los cerebros y fueron congelados rápidamente a -80°C hasta ser procesados. Se realizaron secciones cerebrales coronales en un criostato ($20\ \mu\text{m}$) correspondientes a los niveles de la corteza prefrontal e hipocampo anterior (atlas de George Paxinos y Charles Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academia Press 1982) que fueron colocadas en portas especiales para la técnica de hibridación *in situ*.

Los tejidos se sometieron a los siguientes tratamientos antes de realizar los experimentos de hibridación: 5 minutos en paraformaldehído 4% a 4°C , 2 dipping en PBS 1% (tampón fosfato salino 10x: NaCl 1,3 M, Na_2HPO_4 70 mM y NaH_2PO_4 30 mM; dilución a 1x en H_2O -DEPC autoclavada (1 litro H_2O + 1 ml DEPC (dietilpirocarbonato)), 10 min en TEA/AA (TEA: 19,5 g de trietanolamina y 9 g de NaCl en 1 litro de H_2O -DEPC y 2,50 ml de acético anhidro, pH= 8), 1 min en EtOH 70%, 1 min en EtOH 80%, 2 min en EtOH 95%, 1 min en EtOH 100%, 10 min en cloroformo, 1 min en EtOH 100%, 1 min en EtOH 95%, secado con aire frío y almacenamiento a -20°C .

9.2. Marcado de la sonda

La solución stock de la sonda se preparó añadiendo a la sonda comercial (liofilizada) la cantidad de H_2O -DEPC necesaria para tener una concentración final de 200 pmoles/ μl (según la cantidad de sonda que viene indicada en el bote). Se guardó a una temperatura de -20°C . Para trabajar, hicimos una dilución 1:100 de la sonda, resultando una concentración final de 2 pmoles/ μl , que fue guardada a -20°C . Para 20 portaobjetos se preparó la siguiente mezcla de incubación: 1,5 μl sonda, 6 μl H_2O -DEPC autoclavada, la incubación se realizó a 65°C durante 5 min tras lo que se detuvo en hielo. Se añadió el resto de los componentes para la reacción de marcado: 2,5 μl buffer de la enzima 5x, 2 μl $\alpha^{35}\text{S}$ dATP (desoxiadenosina 5'-[α -thio]trifosfato, [^{35}S] (New Research Products, Dupont), 0,5 μl transferasa terminal (TdT) (Promega) (30 U/ μl ; añadimos en nuestra reacción 15 U). El volumen final fue de 12,5 μl . Se mantuvo la reacción en baño a 37°C durante 1 h. Se detuvo la reacción añadiendo 87,5 μl de H_2O -DEPC autoclavada para alcanzar un volumen final de 100 μl .

9.3. Purificación de la sonda

Para ello se utilizaron columnas MicroSpin G-50 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y posterior centrifugación durante 1 min a 3300 rpm. Se añadió en cada una de las columnas 50 μ l de la reacción de marcado. Se centrifugó de nuevo durante 2 min a 3300 rpm. Para determinar las cpm/ μ l de sonda, muestras de 1 μ l fueron cuantificadas en un contador de centelleo, asegurándonos de que la actividad específica de la sonda fuera superior a 10^9 cpm/ μ g. Finalmente, la sonda marcada se guardó en el congelador (-20°C) hasta el momento de su utilización.

9.4. Ensayo de hibridación

Tras proceder a la atemperación de los portas, se preparó la mezcla de hibridación, teniendo en cuenta que para cada porta positivo (marcaje específico) se necesitó: 200 μ l de buffer de hibridación (ver buffer de hibridación), 4 μ l de DTT a 1M, 250000 cpm de sonda, DTT 1,54 g en 10 ml en H₂O-DEPC autoclavaza (se guardó en alícuotas a -20°C). En el caso de portas negativos (marcaje no específico) necesitamos: 200 μ l de buffer de hibridación, 4 μ l de DTT 1M, 250.000 cpm de sonda + 200 veces la cantidad de sonda que añadimos para hacer el positivo, pero sin marcar. Se añadieron 200 μ l de la mezcla de hibridación en cada porta, extendiéndola bien por toda la superficie. Se colocaron los portaobjetos en una caja de hibridación con constante grado de humedad, que metimos en el horno de hibridación durante toda la noche a 42°C.

Protocolo para el buffer de hibridación de oligonucleótidos

Se prepararon 10 ml SSC 20x (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M (Panreac, Barcelona, España), pH = 7,0 filtrado, tratado con DEPC y autoclavado), 2,5 ml de fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España) pH = 7,0, 5 g de dextran sulfato (Panreac, Barcelona, España), 0,5 ml de pirofosfato sódico (Panreac, Barcelona, España) 0,1 M, 5 ml de solución Denhardt's 50x (5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de BSA, 5 g de Ficoll (Panreac, Barcelona, España) 400 en 500 ml de H₂O-DEPC), 1 ml de 10 mg/ml de DNA de esperma de salmón (Sigma, Missouri, USA), 1 ml de 5 mg/ml de ácido poliadenílico (poliA) (Sigma, Missouri, España), 50 μ l de 120 mg/ml de heparina (Panreac, Barcelona, España), 25 ml de formamida desionizada

9.5. Lavado de los portas

Al día siguiente, se procedió a los lavados, usando 2 litros de buffer de lavado a 50°C: 200 ml SSC 20x, 8 ml DTT 1M, y H₂O. Se sumergieron los portas en un tampón de lavado a temperatura ambiente. Se colocaron los portaobjetos en cestillas de vidrio, que se introdujeron en el buffer de lavado a 50°C, con agitación moderada, durante 30 min. Transcurrido este tiempo se pasó la cestilla a otra cubeta con buffer de lavado durante otros 30 min en las mismas condiciones que antes. Tras esto se pasó la cestilla por los siguientes lavados a temperatura ambiente, 5 min cada uno: SSC 1x, SSC 0,1x, H₂O-DEPC, Etanol al 80%, Etanol al 96% 1 min. Secado de los portas, y exposición a films sensibles durante 4-5 días a temperatura ambiente.

9.6. Cuantificación densitométrica y análisis estadístico

Las densidades de gris de las imágenes se determinaron por densitometría usando el programa Scion 4.03 Image Software (Scion Corporation, Maryland, USA). Se obtuvieron valores de densidad óptica relativa de las secciones, no convertidas a valores reales de concentración debido a que la hibridación *in situ* es una técnica que solos permite una valoración semicuantitativa.

Todos los datos se representan como la media + E.E.M. de n animales por grupo experimental. Los datos se analizaron usando un test ANOVA de dos vías para observar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales y para observar la posible relación entre las variables cirugía (bulbectomizado/no bulbectomizado) y tratamiento (fluoxetina/no fluoxetina) seguido de un test *post hoc* Newman-keuls y usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). La significación estadística elegida fue $p < 0.05$.

10. Estudios de expresión de proteínas en hipocampo (Western-Blot)

10.1. Preparación de tejidos

Una vez realizadas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados 24 horas después de la extracción de las minibombas osmóticas mediante decapitación. Se extrajeron los cerebros y se diseccionaron los hipocampos, rápidamente congelados a -80°C . El día del ensayo, todas las muestras se descongelaron y homogeneizaron (1:15, 500-600 μl aprox.) usando un Potter (Kinematica, Suiza) (15 veces, 800 rpm) y después se realizó un lisado durante 30 minutos en hielo y en un tampón de lisado (Hepes-HCl 10 mM (Panreac, Barcelona, España), $\text{pH} = 7,9$; MgCl_2 1.5 mM, KCl 10 mM (Panreac, Barcelona, España), Igepal 1% (Sigma, Missouri, USA); deoxicolato de sodio 0.1% (Sigma, Missouri, USA), SDS 0.2% (Sigma, Missouri, USA) y Tween-20 0.1% (Sigma, Missouri, USA)) conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: PMSF 1 mM (Sigma, Missouri, USA); aprotinina 10 $\mu\text{l/ml}$ (Sigma, Missouri, USA); leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$ (Amersham, Buckinghamshire, UK); pepstatina A 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Missouri, USA); antipain 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Missouri, USA); quimostatina 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Missouri, USA); vanadato de sodio 1 mM (Sigma, Missouri, USA); fosfato de sodio 1 mM (Sigma, Missouri, USA); cantaridina 1 mM (Sigma, Missouri, USA); y E-6410 μM (Sigma, Missouri, USA). Se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C y se recogieron las proteínas solubilizadas en el sobrenadante. Se realizó la determinación de proteínas de los homogeneizados según el método propuesto por Lowry et al. (1951).

10.2. Preparación de geles de acrilamida

Preparación del gel de separación

<u>Componentes</u>	<u>8,5%</u>	<u>10%</u>
Agua destilada	4,255 ml	4,650 ml
30% acrilamida-bis.	2,430 ml	3.600 ml
Tampón de separación 4X	2,310 ml	2,850 ml

10% persulfato de amonio(APS)	136 μ l	168 μ l
Temed	6 μ l	7,5 μ l

Tampón de separación 4X (90,85 g Tris HCl, 20 ml SDS 10 %, pH = 8,8, en un volumen de 500 ml.)

10.3. Electroforesis y transferencia

Se vertió el gel entre los 2 cristales del sistema, sobre el que echamos agua destilada hasta que polimerizó. Se eliminó el agua restante y se vertió el *stacking gel*.

Composición del stacking gel: ((Agua destilada 1,5 ml, 30 % acrilamida-bis. 450 μ l (Biorad, California, USA), tampón *stacking gel* 4X 670 μ l (30,3 g Tris HCl, 20 ml SDS 10 %, pH = 6,8 para un volumen de 500 ml.), APS (USB, Buckinghamshire, UK) 10 % 42 μ l, rojo fenol 5 μ l (Sigma, Missouri, USA) y Temed 7,5 μ l (Sigma, Missouri, USA)) hasta el borde del peine.

Se colocó el gel en el módulo de ensamblaje, que se introdujo en el tanque, rellenando la cámara superior con tampón de migración 1X hasta el borde (tampón de migración 10X ((30 g de Tris, 144 g de glicina, 100 ml SDS (USB, Buckinghamshire, UK) 10 % y 900 ml de agua destilada para un volumen total de 1 ml)). Se rellenó la cubeta con tampón de migración 1X hasta la mitad. Se retiró el peine, lavando los pocillos para eliminar cualquier resto de acrilamida. Se incluyeron 35 μ g de proteína en SDS-PAGE (10% en todas salvo en TrkB 8,5%). Se puso en marcha la electroforesis (100 V 15min seguido de 160 V 50min). Acabada la migración, se extrajo el gel, que se sumergió en tampón de transferencia (200 ml de tampón de trisglicina 10 X, 400 ml de metanol (Scharlau, Barcelona, España) y 1400 ml de agua destilada para un volumen de 2 litros). Tampón de trisglicina 10X ((30 g de Tris, 144 g de glicina (Sigma, Missouri, España) y 1 litro de agua destilada)) durante 30 minutos en agitación, junto con 2 papeles de filtro y 1 membrana (PVDF o nitrocelulosa en el caso de pCREB). Se montó el sistema de transferencia, rellenando la cubeta con tampón de transferencia frío, en hielo. Se colocó a 100 V durante 90 minutos.

10.4. Bloqueo con anticuerpos

Finalizada la transferencia, se bloqueó la unión a los sitios de fijación inespecíficos de anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente en 5 % de leche en polvo desnatada, y en caso de proteínas fosforiladas, se bloqueó con 3 % de leche en polvo más 200 μ l de vanadato de sodio y 100 μ l de fosfato de sodio por cada 100 ml de leche como inhibidores. Posteriormente, se procedió a la incubación con los siguientes anticuerpos primarios durante toda la noche: anti- β -catenina de ratón (1:1000), anti-AKT₁ de ratón (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germany), anti-ERK_{1/2} de conejo (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-pERK_{1/2} de ratón (1:10 000; Sigma), anti-CREB de conejo (1:1000; Upstate, Charlottesville, VA), anti-pCREB de conejo (1:1000; Upstate), anti-GAPDH de ratón (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc) anti-TrKb (1:500; Abcam). Pasada la noche, y tras tres lavados en TBS-T (TBS (158 ml NaCl 5M, 105 ml Tris 1 mM y 5 litros de agua destilada/0.05% Tween 20) las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios se detectaron con el kit avanzado ECL (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany).

10.5. Cuantificación densitométrica y análisis estadístico

Las cuantificaciones de las bandas se llevaron mediante densitometría semicuantitativa con el programa informático Scion Image 4.03 (Scion Corporation, Maryland, USA). Los valores densitométricos obtenidos con estos anticuerpos se normalizaron con los valores obtenidos con los anticuerpos anti-GAPDH para corregir cualquier posible desviación en la carga de las proteínas.

Los datos se analizaron usando un test *t* de Student en aquellos casos en los que sólo se analizaron las diferencias entre grupos bulbectomizados y no bulbectomizados, mientras que se utilizó un test ANOVA de dos vías para observar las diferencias en el caso de los cuatro grupos experimentales y para observar la posible relación entre las variables cirugía (bulbectomizado/no bulbectomizado) y tratamiento (fluoxetina/no

fluoxetina) seguido de un test *post-hoc* Newman-keuls usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). La significación estadística elegida fue $p < 0.05$.

11. Inmunohistoquímica de β -catenina por DAB en hipocampo de rata

11.1. Preparación de los tejidos

Tras la anestesia (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, i.p.; 2% pentobarbital en una dilución de 10% etanol, 70% H₂O y 20% propilenglicol) y una vez sacrificados, los animales se perfundieron vía transcardiaca con 200 ml de suero salino (0,9 %) seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS; 90% H₂O, 10% PBS 10x) para fijar los tejidos. Después de la perfusión, se extrajeron los cerebros que fueron post-fijados durante la noche a 4 °C y posteriormente transferidos a una solución de sacarosa al 30% en PBS 1x a 4 °C. Una vez fijado el tejido, se obtuvieron los cortes sagitales (45 μ m) a nivel del hipocampo (fig. 26 a 40 del Paxinos y Watson 1986) mediante un microtomo criostático (20 cortes por bote como máximo) y se mantuvieron los cortes en 2 ml de solución crioprotectora (25% etilenglicol, 25% glicerol, PBS 10x, 40% H₂O) a -20°C durante al menos 24 horas.

11.2. Inmunohistoquímica de β -catenina

Las muestras se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubó más tarde con la solución desenmascarante de antígenos Vector H-3300 durante 20 minutos en una freidora a 97°C. Después, se lavaron las muestras tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron con H₂O₂ al 1% en PBS 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente para eliminar la peroxidasa endógena. Una vez incubadas, se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron las muestras con PBS-TS (normal serum 5% +triton 0,2%) durante 30 minutos. Después, se incubaron las muestras con el anticuerpo

primario a 4°C durante toda la noche: mouse anti- β -catenina 1:500 (Santacruz) en PBS-T. Se lavaron las muestras cinco veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Después se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado donkey anti mouse (Vector) 1:200 en PBS-TS durante 2 horas a temperatura ambiente dilución 1:250. Después de 5 lavados con PBS durante 5 a temperatura ambiente, se incubó con el reactivo Vectastain durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguidos de tres lavados más con Tris-HCl durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubó después con el kit DAB de Vector durante a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente, se extendieron las muestras y fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados.

La inmunohistoquímica de β -Catenina se llevó a cabo en secciones adyacentes a las usadas en el estudio de expresión de BrdU.

11.3. Cuantificación y análisis estadístico

El recuento de grupos de células que proliferaron se realizó a lo largo de toda la capa subgranular del hipocampo en una de cada 6 secciones de 45 μ m y en uno de los 2 hemisferios cerebrales. Los datos se analizaron usando un test ANOVA de dos vías para observar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales y para observar la posible relación entre las variables cirugía (bulbectomizado/no bulbectomizado) y tratamiento (fluoxetina/no fluoxetina) seguido de un test *post hoc* Newman-Keuls usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). La significación estadística elegida fue $p < 0.05$.

12. Estudios de neurogénesis: inmunofluorescencia de BrdU en hipocampo de rata

12.1. Preparación de tejidos

Para estudiar el número de células del hipocampo que proliferaban y sobrevivían, se administró Bromodeoxiuridina (BrdU; Sigma, Missouri, USA) cuatro veces (cada 2 horas) 75 mg/kg. intraperitoneal (i.p.) en solución salina al 0,9% de NaCl el último día de tratamiento con fluoxetina. Para la obtención y preparación de los tejidos se siguió el mismo procedimiento que se ha descrito para la inmunohistoquímica de β -catenina.

12.2. Inmunofluorescencia de la BrdU

La inmunofluorescencia del BrdU se realizó siguiendo el protocolo de Malberg et al. (2000) con ligeras modificaciones. Las muestras fueron lavadas tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se incubaron con HCl 2N durante 30 minutos a 37°C y posterior lavado tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizó otra incubación con ácido bórico 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriores 3 lavados con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una incubación con PBS-TS (suero de cabra 5% + tritón 0,2%) durante 30 minutos seguida de incubación con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche: rat anti-BrdU (Serotec) 1:600 en PBS-T. Transcurrida la noche, se lavaron las muestras con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo secundario Texas Red donkey anti rat (Jackson) 1:200 en PBS-TS (normal serum 5% + tritón 0.2%) durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las muestras cinco veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubó con DAPI 1:1000 en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esta última incubación, se lavaron las muestras con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, se extendieron y montaron los cortes con medio de montaje para fluorescencia “Prolong” sobre portaobjetos gelatinizados.

12.3. Cuantificación y análisis estadístico

Se procesó y montó una de cada seis secciones del hipocampo para proceder a la cuantificación. Para esta cuantificación de células BrdU⁺ se siguió un protocolo de estereología modificado, a partir de Eisch et al. (2000) y de Malberg et al. (2000) debido a que las células BrdU⁺ son relativamente raras en la zona subgranular del giro dentado. Las células BrdU⁺ fueron contadas por un experimentador “ciego” en un microscopio (Carl Zeiss Axioskop 2 Plus) a un aumento de 400×, excluyendo aquellas coincidentes al plano superior o más de dos células fuera de la zona subgranular (principio del disector óptico). Fueron usadas unas 10-12 secciones por cada cerebro, y se contaron una media de 660 ± 183 (media \pm S.D.) células por animal. El número total de células BrdU⁺ por sección se determinó multiplicando por seis para obtener el número total de células marcadas por hipocampo.

Los datos se analizaron mediante test ANOVA de dos vías para observar las diferencias entre los cuatro grupos experimentales y para observar la posible relación entre las variables cirugía (bulbectomizado/no bulbectomizado) y tratamiento (fluoxetina/no fluoxetina) seguido de un test *post hoc* Newman-keuls usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). La significación estadística elegida fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Alteraciones conductuales inducidas por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata

1.1. Evaluación conductual a los 15 días de la bulbectomía olfatoria

Todos los parámetros conductuales analizados se evaluaron siempre transcurridas dos semanas desde la cirugía (bulbectomía y *sham-operation*). De acuerdo a la literatura, se considera que a la dos semanas postbulbectomía se han desarrollado y se manifiestan plenamente las alteraciones conductuales, y neuroquímicas propias del síndrome de bulbectomía olfatoria en la rata. Esta confirmación conductual la hemos realizado en todos los animales de todas las series experimentales abajo reseñadas y, siempre antes de comenzar el tratamiento crónico con fluoxetina. Los datos que a continuación mostramos proceden de la evaluación conductual, a los 15 días postcirugía, de animales control (*sham-operated*, CO) y bulbectomizados (OB) de una de esas series experimentales y son representativos de todas ellas.

Se observaron y cuantificaron diversos parámetros conductuales en el test del campo abierto, a intervalos de un minuto, durante cada sesión de 5 minutos: las deambulaciones (número de cuadrículas cruzadas con las cuatro patas, bien centrales, periféricas o ambas), los alzamientos (alzamientos sobre las patas traseras en actitud exploratoria), los acicalamientos (uso de patas o lengua para limpiarse) y el número de defecaciones (el número de bolos fecales).

1.1.1. Deambulaciones

Se registraron las deambulaciones periféricas, centrales y totales por minuto así como el total de deambulaciones durante la sesión del test del campo abierto (5 minutos) para cada uno de los animales de los dos grupos experimentales de estudio (CO, control; OB, bulbectomizados).

Cuando comparamos el número de las deambulaciones totales por minuto entre los dos grupos experimentales del estudio (control y bulbectomizados), podemos observar (fig. 1) que en todos los minutos de la sesión del campo abierto (5 minutos) se aprecian diferencias significativas en el número de deambulaciones totales entre ambos grupos, si bien no parece haber diferencias entre los dos grupos con respecto al curso temporal en que se produce el número de deambulaciones totales (minuto 1: $p= 0.0156$; minuto 2: $p= 0.0017$; minuto 3: $p= 0.0404$; minuto 4: $p= 0.0027$; minuto 5: $p= 0.0172$).

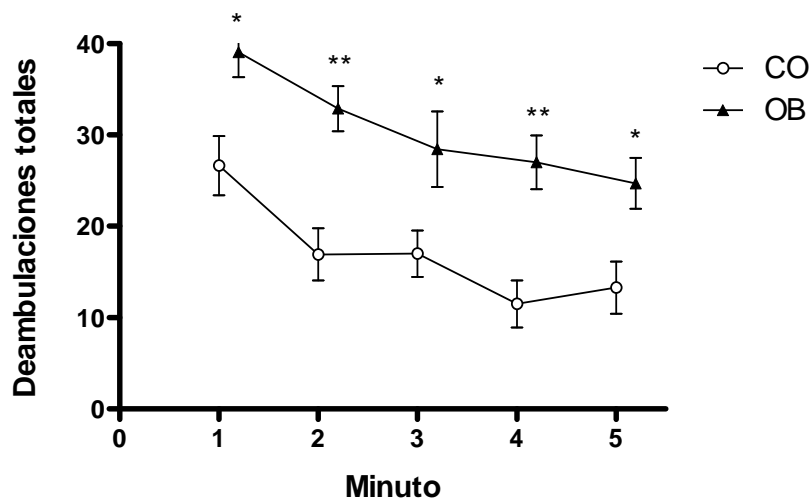


Figura 1. Gráfica correspondiente al número de deambulaciones totales por minuto efectuadas por los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) durante una sesión de 5 minutos en el test del campo abierto realizado a los 15 días postcirugía. Los datos representan las medias \pm E.E.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$ vs. animales control (test t Student) (CO= 8, OB= 8).

Del mismo modo, cuando representamos el número total de deambulaciones (periféricas y centrales) durante toda la sesión del campo abierto (5 minutos), podemos observar (fig. 2), que el número de deambulaciones totales es significativamente mayor en los animales bulbectomizados en comparación con los animales control ($p= 0.0023$).

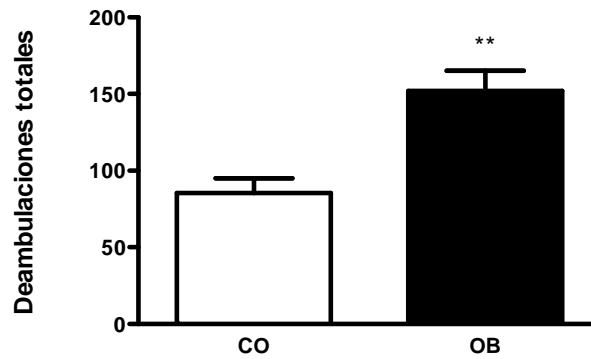


Figura 2. Gráfica correspondiente al número de deambulaciones totales efectuadas por los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) a los 15 días postcirugía durante el total de los 5 minutos del test de campo abierto. Los datos representan las medias \pm E.E.M. ** $p < 0.01$ vs. animales control (test t Student) (CO= 8, OB= 8).

Cuando distinguimos entre deambulaciones periféricas y centrales, y cuantificamos únicamente el número de deambulaciones centrales, parámetro que está inversamente relacionado con el nivel de ansiedad de los animales, observamos que los animales bulbectomizados presentan una tendencia a atravesar menos las cuadrículas centrales, pero sin llegar a ser significativo ($p = 0.17$) (fig. 3), probablemente debido a la gran variabilidad interserie e interindividual observada para este parámetro.

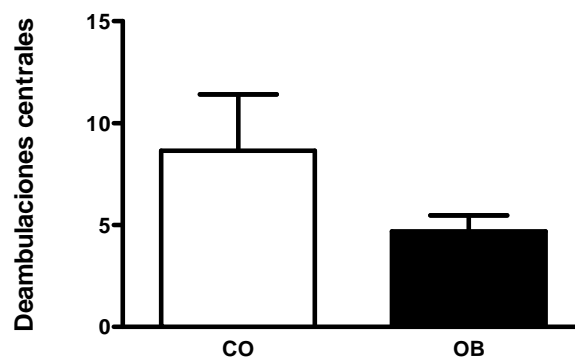


Figura 3. Gráfica correspondiente al número de deambulaciones centrales efectuadas por los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) a los 15 días postcirugía durante el total de los 5 minutos del test de campo abierto. Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO=14, OB=16).

Estos resultados anteriores demuestran y confirman la principal alteración conductual inducida por la bulbectomía olfatoria bilateral, que es la presencia de hiperactividad en el test de campo abierto como lo indica el claro y significativo incremento en el número de deambulaciones totales. Por su parte, la tendencia a la disminución en el número de deambulaciones centrales tras la bulbectomía reflejaría la existencia de ese componente de ansiedad que también parece asociarse secundariamente a este modelo animal de depresión.

1.1.2. Alzamientos

Cuando representamos el número total de alzamientos en el campo abierto podemos observar (fig. 4) que el número de alzamientos es significativamente mayor en los animales bulbectomizados que en los animales control ($p= 0.0263$). Este aumento de los alzamientos, que refleja un aumento de la actividad exploratoria de los animales bulbectomizados, es otro parámetro característico de la hiperactividad/ansiedad presente en este modelo animal de depresión.

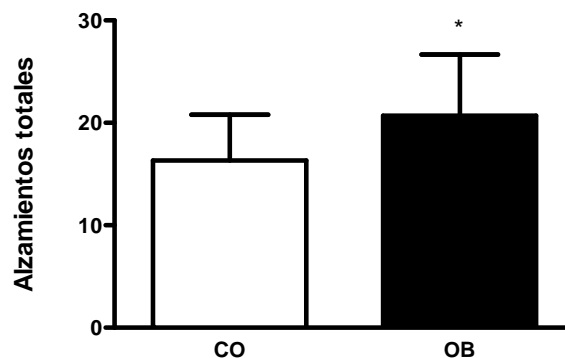


Figura 4. Gráfica correspondiente al total de alzamientos efectuados por los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) a los 15 días postcirugía durante el total de los 5 minutos del test de campo abierto. Los datos representan las medias \pm E.E.M. * $p < 0.05$ vs. animales control (test *t* Student) (CO=8, OB=8).

1.1.3. Acicalamientos

Podemos observar (fig. 5) cómo el número de acicalamientos en los animales bulbectomizados es menor que en los animales control, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ($p= 0.1298$). Aunque en alguna serie experimental la diferencia fue significativa, el hallazgo más frecuente es el que aquí se muestra, debido a la gran variabilidad interserie e interindividual de este parámetro. El hecho de que los animales bulbectomizados presenten esa menor tendencia al número de acicalamientos es otra muestra del componente de ansiedad que presentaría este modelo animal de depresión.

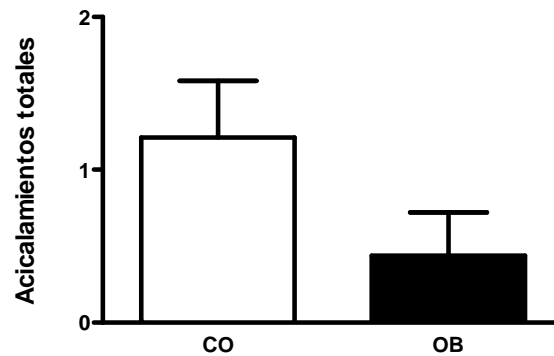


Figura 5. Gráfica correspondiente al total de acicalamientos efectuados por los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) a los 15 días postcirugía durante el total de los 5 minutos del test de campo abierto. Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO=8, OB=8).

1.1.4. Defecaciones

En cuanto al número de defecaciones (fig. 6) hemos observado cómo el registro de bolos fecales en los animales bulbectomizados (parámetro que reflejaría la activación vegetativa inducida por la ansiedad) fue mayor que en los animales control, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ($p= 0.1473$). En alguna serie experimental la diferencia fue significativa, pero el hallazgo más frecuente es el que aquí se muestra (gran variabilidad interserie e interindividual).

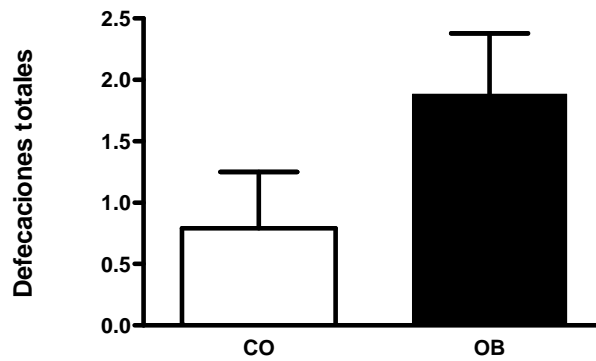


Figura 6. Gráfica correspondiente al total de defecaciones (número de bolos fecales) de los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) a los 15 días postcirugía durante el total de los 5 minutos del test de campo abierto. Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO=8, OB=8).

1.2. Patrón temporal del síndrome de bulbectomía olfatoria: evaluación conductual a los 15, 30, 45 y 90 días postcirugía

Con la finalidad de determinar si el síndrome de bulbectomía persistía a lo largo del tiempo se realizó una evaluación conductual del número de deambulaciones totales en las ratas bulbectomizadas y control en puntos temporales después de la cirugía. Se evaluó la conducta en el campo abierto (representándose aquí el número de deambulaciones totales) hasta 3 meses después de la cirugía. Por lo tanto, la evaluación conductual se hizo a los 15 días tras la operación de bulbectomía y posteriormente a los 30, 45 y 90 días.

Como podemos observar en la figura correspondiente (fig. 7), en todos los puntos temporales analizados se aprecian diferencias significativas en el número de deambulaciones totales entre ambos grupos, confirmando que el síndrome de bulbectomía olfatoria bilateral persiste, al menos para este parámetro de hiperactividad, durante todo este largo período de tiempo.

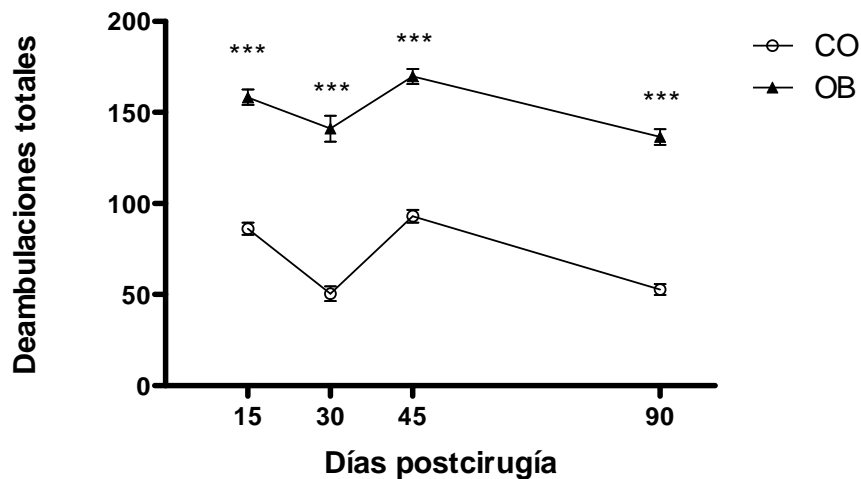


Figura 7. Gráfica correspondiente al número de deambulaciones totales efectuados por los animales control (CO) y bulbectomizados (OB) en el test del campo abierto realizado en distintos puntos temporales a lo largo de un período de tres meses postcirugía. Los datos representan las medias \pm E.E.M. *** $p < 0.001$ vs. animales control (test *t* Student). (día15-CO=8, OB=12; día30-CO=5, OB=4; día45-CO=8, OB=13; día90-CO=8, OB=9).

2. Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina sobre las alteraciones conductuales inducidas por la bulbectomía olfatoria bilateral en rata

Una vez confirmado el síndrome de bulbectomía olfatoria mediante la realización del test del campo abierto (15 días postcirugía), los animales se trataron crónicamente con el antidepresivo fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días), inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, y transcurrido este tiempo se evaluaron los efectos que la misma produjo sobre los parámetros conductuales registrados en el test del campo abierto para los diferentes grupos de experimentación (CO=control sin tratamiento, COF=control con fluoxetina, OB= bulbectomizado sin tratamiento, OBF= bulbectomizado con fluoxetina).

De nuevo, los datos que a continuación mostramos proceden de la evaluación conductual después de cuatro semanas postcirugía (14 días postratamiento) de animales control y bulbectomizados, con y sin tratamiento con fluoxetina de una de esas series experimentales, y son representativos de todas ellas.

2.1. Deambulaciones

Como se observa en la figura 8, el número de deambulaciones totales en los animales bulbectomizados fue significativamente mayor que en los animales control ($q=12.16$, $p < 0.001$), aunque el tratamiento crónico con fluoxetina disminuyó el número de deambulaciones totales ($q=14.93$, $p < 0.001$) hasta unos valores equivalentes a los observados en las ratas control ($q=1.463$, $p > 0.05$). Las mayores fuentes de variación según el análisis ANOVA de dos vías son las variables tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,25)=65.63$, $p < 0.001$], cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,25)=45.01$, $p < 0.001$] y la interacción entre ambas variables [ANOVA interacción: $F(3,25)=52.11$, $p < 0.001$]. Estos datos demuestran que la fluoxetina administrada crónicamente revierte la hiperactividad característica del síndrome de bulbectomía olfatoria bilateral en la rata. Este es un efecto propio del animal bulbectomizado puesto que, como podemos apreciar (fig. 8), después de la administración crónica de fluoxetina en los animales control no se observa cambio conductual alguno en el test del campo abierto.

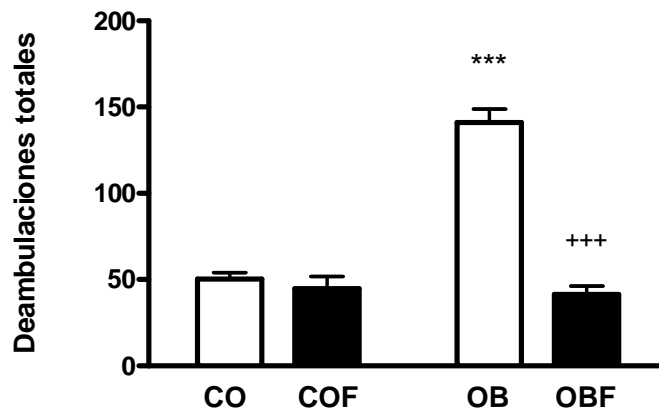


Figura 8. Gráfica correspondiente al número de deambulaciones totales efectuadas por los animales control y bulbectomizados en el test del campo abierto a las 4 semanas postcirugía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). Los datos representan las medias \pm E.E.M. *** $p < 0.001$ vs. animales control, +++ $p < 0.001$ vs. animales bulbectomizados sin tratamiento (test ANOVA de dos vías seguido por un análisis *post hoc* Newman-Keuls). (CO= 5, COF=8, OB=4, OBF=9).

2.2. Alzamientos

Como se observa en la figura 9, el número de alzamientos realizados por los animales bulbectomizados es significativamente mayor que el de los animales control ($q=3.466$, $p < 0.05$), aunque el tratamiento crónico con fluoxetina disminuyó el número de alzamientos ($q=6.055$, $p < 0.001$) hasta unos valores equivalentes a los observados en ratas control ($q=2.907$, $p > 0.05$). La mayor fuente de variación según el análisis ANOVA de dos vías es la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,44)=15.45$, $p < 0.001$]. Estos resultados demuestran que el tratamiento crónico con fluoxetina revierte el aumento en la actividad exploratoria característica del síndrome de bulbectomía olfatoria, mientras que no hay efectos significativos en los animales control.

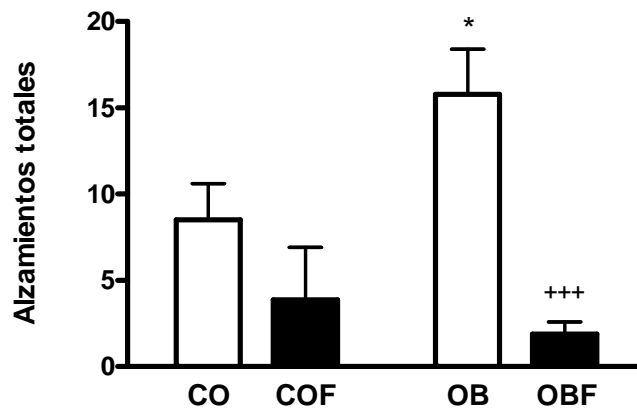


Figura 9. Gráfica correspondiente al número de alzamientos efectuados por los animales control y bulbectomizados en el test del campo abierto a las 4 semanas postcirugía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). Los datos representan las medias \pm E.E.M. * $p < 0.05$ vs. animales control, +++ $p < 0.001$ vs. animales bulbectomizados sin tratamiento (test ANOVA de dos vías seguido por un análisis *post hoc* Newman-Keuls). (CO= 14, COF= 8; OB= 13, OBF= 10).

2.3. Acicalamientos

Como se observa en la figura 10, no hay diferencias en el número de acicalamientos entre los cuatro grupos de experimentación tras el tratamiento crónico con fluoxetina. Sin embargo, cuando realizamos un análisis estadístico de comparación

de dos grupos experimentales (*t* de Student no pareada), podemos observar como el tratamiento crónico con fluoxetina incrementa de forma significativa el número de acicalamientos en los animales control ($p = 0.0322$ vs. control no tratados), pero no en los animales bulbectomizados.

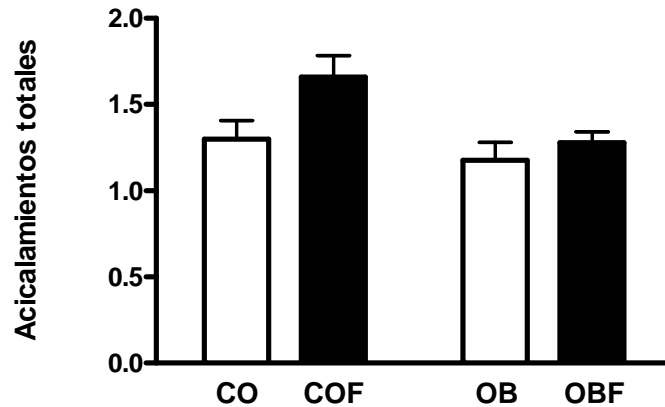


Figura 10. Gráfica correspondiente al número de acicalamientos efectuados por los animales control y bulbectomizados en el test del campo abierto a las 4 semanas postcirugía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO= 14, COF= 8; OB= 13, OBF= 10).

2.4. Defecaciones

Como se observa en la figura 11, no hay ninguna diferencia significativa entre animales control y bulbectomizados con respecto al número de defecaciones, pero sí existe una tendencia al aumento en el número de las defecaciones en ambos grupos de animales tras el tratamiento crónico con fluoxetina. De hecho, si realizamos un análisis estadístico de comparación entre dos grupos experimentales (test *t* Student no pareada), el tratamiento crónico con fluoxetina incrementa de forma significativa el número de bolos fecales tanto en los animales control ($p = 0.0218$ vs. animales control no tratados) como en los animales bulbectomizados ($p = 0.0405$ vs. animales bulbectomizados no tratados).

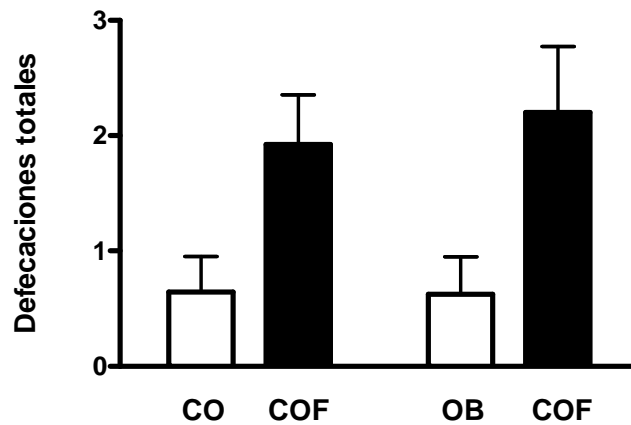


Figura 11. Gráfica correspondiente al número de defecaciones efectuadas (número de bolos fecales) de los animales control y bulbectomizados en el test del campo abierto a las 4 semanas postcirugía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO= 14, COF= 8; OB= 13 , OBF= 10).

3. Estudios autorradiográficos anatómicos y funcionales

Con el fin de analizar la expresión y funcionalidad de varios subtipos de receptores serotoninérgicos y de los receptores cannabinoides CB₁ así como la expresión del transportador de serotonina (5-HTT) en el cerebro de la rata bulbectomizada y su modulación después del tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días), se procedió a realizar diferentes ensayos de fijación de ligandos específicos marcados radioactivamente a secciones cerebrales.

Describimos, a continuación, los hallazgos sobre la densidad autorradiográfica (estudios anatómicos) de cada subtipo de receptor serotoninérgico y de la densidad del 5-HTT valorada mediante la técnica de fijación de radioligandos selectivos en secciones cerebrales. Posteriormente se describen aquellos resultados sobre la funcionalidad de los distintos subtipos de receptores serotoninérgicos y del receptor CB₁ (autorradiografía funcional) que se ha valorado mediante la técnica de estimulación de la fijación de [³⁵S]GTP γ S inducida por agonistas selectivos y que permite determinar la eficacia de acoplamiento del receptor a las proteína G.

3.1. Autorradiografía anatómica y funcional del sistema serotoninérgico

3.1.1. Autorradiografía anatómica del 5-HTT: fijación de [³H]-citalopram

Exponemos aquellos resultados en la expresión o densidad autorradiográfica del transportador de serotonina (5-HTT) en distintas áreas o núcleos cerebrales que resultaron estadísticamente significativos o que hayamos consideramos dignos de mencionar o comentar, obtenidos en los estudios de la fijación específica de [³H]-citalopram (2 nM) a secciones cerebrales en el cerebro de animales control/bulbectomizados con y sin tratamiento crónico con fluoxetina (tabla 1; fig. 12).

En animales control, las densidades más altas del 5-HTT fueron detectadas en los núcleos del rafe dorsal y rafe mediano (> 200 fmol/mg. tejido); densidades altas (100-200 fmol/mg. tejido) en los núcleos hipotalámicos dorsomediales, el tálamo, la sustancia negra y la sustancia gris periacueductal; densidades moderadas (70-100 fmol/mg. tejido) en la corteza entorrinal, el núcleo del septo latero-ventral y los núcleos basolaterales de la amígdala; y, las densidades más bajas (< 70 fmol/mg. tejido) en la corteza frontoparietal, la corteza cingular, el caudado-putamen, el núcleo del septo latero-dorsal, el hipocampo y el núcleo del rafe magnus.

En general, la bulbectomía olfatoria bilateral indujo cambios adaptativos significativos en la densidad del 5-HTT cerebral en núcleos o regiones cerebrales muy concretas: la amígdala basolateral (aumento), la sustancia gris periacueductal (disminución) y el núcleo mediano del rafe (disminución). Sin embargo, en todas las áreas analizadas el tratamiento crónico con fluoxetina produjo una acusada y significativa regulación a la baja de la densidad del 5-HTT, tanto en el cerebro del animal bulbectomizado como en el del animal control. De hecho, el análisis ANOVA de dos vías reveló que la mayor fuente de variación correspondió a la variable tratamiento [F(3,17) para todas las áreas]: corteza frontoparietal externa [F=18.83, $p<0.001$], corteza frontoparietal interna [F=36.97, $p<0.001$], corteza cingular [F=27.17, $p<0.001$], corteza entorrinal [F=44.45, $p<0.001$], caudado-putamen [F=37.63, $p<0.001$], septo laterodorsal [F=15.89, $p<0.01$], septo latero-ventral [F=101.3, $p<0.001$], CA2-CA3 del

hipocampo [$F=40.99$, $p<0.001$], giro dentado del hipocampo [$F=19.59$, $p<0.001$], tálamo laterodorsal [$F=9.18$, $p<0.001$], hipotálamo dorsomedial [$F=97.08$, $p<0.001$], amígdala [$F=44.89$, $p<0.001$], sustancia negra [$F=39.80$, $p<0.001$], sustancia gris periacueductal [$F=52.76$, $p<0.001$], núcleo dorsal del rafe [$F=59.67$, $p<0.001$] y núcleo del rafe magnus [$F=45.60$, $p<0.001$]. En el caso del núcleo del rafe mediano, el análisis ANOVA de dos vías reveló que las mayores fuentes de variación correspondieron a las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,17) = 6.127$, $p<0.05$], tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17) = 61.78$, $p<0.001$] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,17) = 5.537$, $p<0.05$].

El posterior análisis estadístico (test *post-hoc* de Student-Newman-Keuls) reveló la existencia de un aumento significativo (+29%) en la densidad del 5-HTT en los núcleos basolaterales de la amígdala de los animales bulbectomizados con respecto a los animales control ($q=3.359$, $p<0.05$). En el tronco cerebral, en la sustancia gris periacueductal se observó un descenso significativo (del -34%) en la densidad del 5-HTT en las ratas bulbectomizadas en comparación con los animales control ($q=4.039$, $p<0.01$); y, por último, también se encontró un descenso significativo (-42%) en la densidad del 5-HTT en el núcleo del rafe mediano con respecto a los animales control no tratados ($q=5.456$, $p<0.001$). En el resto de las áreas analizadas no se encontraron cambios significativos aunque observamos una cierta tendencia a la reducción en la densidad del 5-HTT en áreas corticales (entre el -5 y -15%) en comparación con los niveles de expresión en los animales control. Lo mismo ocurre en otras regiones telencefálicas y núcleos del tronco cerebral donde observamos lo mismo una tendencia al aumento (i.e. +18,8% en el hipotálamo dorsomedial) como a la reducción (-17,8% en giro dentado del hipocampo; -11% en rafe magnus) pero sin alcanzar significación estadística.

El tratamiento crónico con fluoxetina indujo reducciones significativas, entre un -25% y -75%, en la densidad del 5-HTT en todas las áreas cerebrales corticales y límbicas, tanto en el grupo de los animales control como de los bulbectomizados en comparación con sus grupos respectivos de animales no tratados: corteza frontoparietal externa ($q=6.384$, $p<0.01$ animal control tratado vs. animal control no tratado; $q=3.884$,

$p < 0.05$ animal bulbectomizado tratado vs. animal bulbectomizado no tratado), corteza frontoparietal interna ($q=8.118$, $p < 0.001$; $q=6.133$ $p < 0.001$), corteza cingular ($q=7.747$, $p < 0.001$; $q=4.509$ $p < 0.01$), corteza entorrinal ($q=9.603$, $p < 0.001$; $q=6.938$ $p < 0.001$), caudado putamen ($q=9.209$, $p < 0.001$; $q=5.984$, $p < 0.001$), septo latero-dorsal ($q=3.952$, $p < 0.05$; $q=6.049$, $p < 0.01$), septo lateroventral ($q=12.42$, $p < 0.001$; $q=12.05$, $p < 0.001$), CA2-CA3 del hipocampo ($q=8.191$, $p < 0.001$; $q=7.554$, $p < 0.001$), giro dentado del hipocampo ($q=6.499$, $p < 0.001$; $q=4.370$, $p < 0.05$), tálamo laterodorsal ($q=12.34$, $p < 0.001$; $q=11.08$, $p < 0.001$) hipotálamo dorsomedial ($q=11.64$, $p < 0.001$; $q=13.08$, $p < 0.001$) y amígdala basolateral ($q=6.477$, $p < 0.001$; $q=10.21$, $p < 0.001$).

También en el tronco cerebral, hemos detectado una reducción en la densidad del 5-HTT tras el tratamiento crónico con fluoxetina tanto en los animales control como en los bulbectomizados aunque de mayor intensidad (80-90%) que la observada en áreas cerebrales corticales y límbicas, salvo en el núcleo del rafe magnus (55-66%): sustancia negra ($q=8.824$, $p < 0.001$ animal control tratado vs. animal control no tratado y $q=7.114$, $p < 0.001$ animal bulbectomizado tratado vs. animal bulbectomizado no tratado), sustancia gris periacueductal ($q=11.08$, $p < 0.001$; $q=6.714$, $p < 0.001$), núcleo dorsal del rafe ($q=9.367$, $p < 0.001$; $q=8.929$, $p < 0.001$), núcleo mediano del rafe ($q=11.08$, $p < 0.001$; $q=11.68$, $p < 0.001$), y núcleo del rafe magnus ($q=9.692$, $p < 0.001$; $q=6.733$, $p < 0.001$).

Resultados

Tabla 1. Densidades autorradiográficas del 5-HTT (fmol/mg de tejido) medidas como la fijación específica de [³H]-citalopram 2 nM en secciones de cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	OB	% cambio vs CO	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO
Corteza Cerebral								
Corteza FP externa	52,30 ± 4,75	34,97 ± 1,87**	-33,1	46,81 ± 2,61	-10,5	36,27 ± 4,70⁺**	-22,5	-30,7
Corteza FP interna	47,50 ± 2,39	33,34 ± 1,78***	-29,8	45,15 ± 2,03	-4,9	34,46 ± 3,21^{+++***}	-23,7	-27,5
Corteza cingular	51,70 ± 3,34	34,80 ± 1,44**	-32,7	47,16 ± 2,74	-8,8	37,32 ± 3,94^{+++***}	-20,9	-27,8
Corteza entorrinal	71,41 ± 6,23	32,38 ± 2,66***	-54,7	60,28 ± 5,25	-15,6	33,92 ± 2,61^{+++***}	-43,7	-52,2
Ganglios basales								
Caudado putamen	55,97 ± 4,03	34,04 ± 1,28***	-38,5	50,10 ± 3,47	-10,5	36,13 ± 2,33^{+++***}	-27,9	-35,4
Núcleos septales								
Núcleo septal latero-dorsal	57,16 ± 4,81	34,77 ± 1,51*	-39,2	66,0 ± 12,36	15,5	33,36 ± 3,39^{++*}	-49,5	-41,6
Núcleo septal latero-ventral	83,01 ± 3,25	36,23 ± 1,33***	-56,4	76,32 ± 7,00	-8,1	34,70 ± 4,06^{+++***}	-54,5	-58,2
Hipocampo								
CA1 CA2	57,48 ± 5,58	31,86 ± 1,49***	-44,6	55,85 ± 4,34	-2,8	32,22 ± 3,59^{+++***}	-42,3	-43,9
Giro Dentado	58,08 ± 8,94	31,28 ± 1,83***	-46,1	47,76 ± 2,60	-17,8	29,74 ± 4,86^{***}	-37,7	-48,8
Tálamo								
Núcleo laterodorsal	135,21 ± 23,20	35,31 ± 1,77***	-73,9	161,52 ± 14,34	19,5	35,12 ± 6,11^{+++***}	-78,3	-74,0
Hipotálamo								
Núcleos dorsomediales	129,84 ± 17,83	34,43 ± 1,78***	-73,5	154,26 ± 11,95	18,8	34,17 ± 5,66^{+++***}	-77,8	-73,7
Amígdala								
Núcleos basolaterales	78,30 ± 7,07	34,57 ± 2,64***	-55,8	100,98 ± 14,13*	29,0	22,73 ± 3,79^{+++***}	-77,5	-71,0
Tronco del encéfalo								
Sustancia negra	166,91 ± 29,59	30,60 ± 1,30***	-81,7	158,15 ± 31,74	-5,2	38,18 ± 4,22^{+++***}	-75,9	-77,1
Sustancia gris periacueductal	171,93 ± 26,87	32,42 ± 3,62***	-81,1	113,64 ± 17,88**	-33,9	36,28 ± 2,62^{+++***}	-68,1	-78,9
Rafe dorsal	279,46 ± 57,14	33,71 ± 4,12***	-87,9	271,87 ± 70,45	-2,7	36,82 ± 1,80^{+++***}	-86,5	-86,8
Rafe mediano	284,76 ± 69,08	30,53 ± 2,67***	-89,3	165,98 ± 24,13***	-41,7	33,53 ± 4,43^{+++***}	-79,8	-88,2
Rafe magnus	68,72 ± 6,01	23,02 ± 3,47***	-66,5	61,14 ± 8,70	-11,0	29,67 ± 1,27^{+++***}	-51,5	-56,8

Los datos representan las medias ± E.E.M. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus animales control (CO). ⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001 versus bulbectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO= 6-8, COF= 6-8, OB= 6-8, OBF= 6-8).

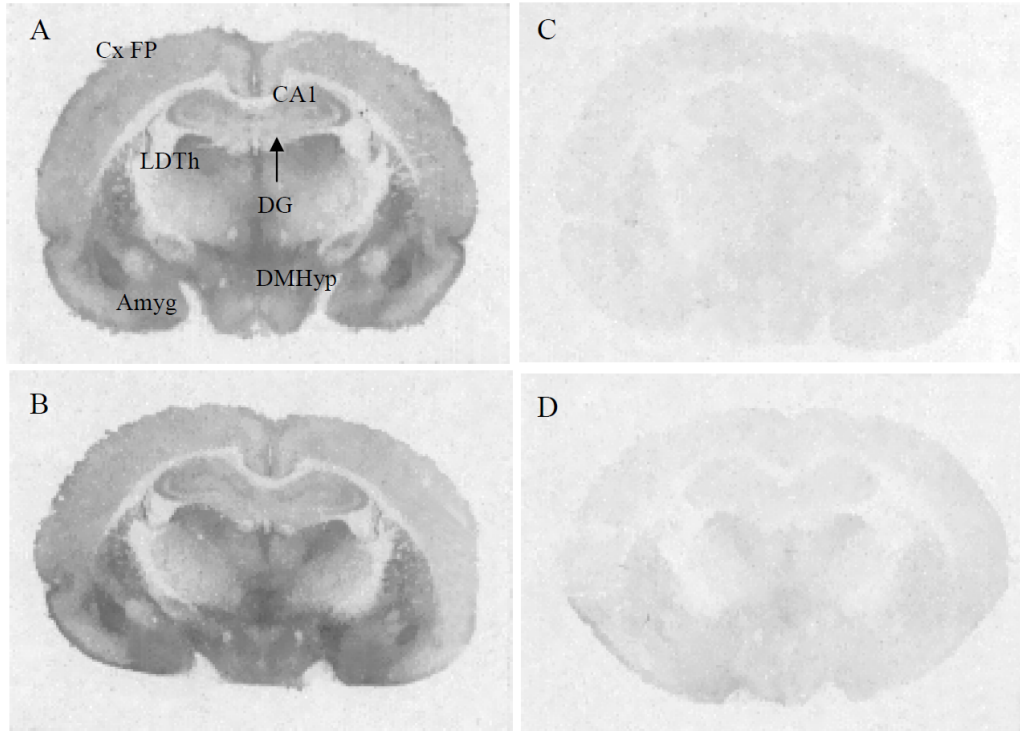


Figura 12. Autorradiograma representativo de la densidad del 5-HTT a nivel del hipocampo anterior medida como la fijación específica de [^3H]-citalopram 2 nM en el cerebro de animales control y bulbectomizados, y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). A), control; B) bulbectomizado; C) control+fluoxetina; D) bulbectomizado+fluoxetina. CxFP, corteza frontoparietal; CA1, lámina CA1 del hipocampo; DG, giro dentado del hipocampo; LDTh, núcleo del tálamo laterodorsal; Amyg, núcleos basolaterales de la amígdala; DMHyp, núcleos dorsomediales del hipotálamo.

3.1.2. Autorradiografía anatómica del receptor 5-HT_{1A}: fijación de [³H]-8-OH-DPAT

Los hallazgos más relevantes de los estudios de fijación específica de [³H]-8-OH-DPAT (2 nM) a secciones cerebrales de animales control y bulbectomizados, y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina se exponen a continuación (tabla 2; fig. 13). En el grupo de los animales control se detectaron valores de densidad del receptor 5-HT_{1A} en un rango alto (> 10 fmol/mg tejido) en la corteza entorrinal, los núcleos septales y en el hipocampo; densidades medias (5-10 fmol/mg tejido) se detectaron en la corteza frontoparietal interna, la corteza cingular, los núcleos hipotalámicos ventromediales, la amígdala y el núcleo del rafe dorsal; las densidades más bajas (< 5 fmol/mg tejido) dentro las áreas analizadas correspondieron a la corteza frontoparietal externa, los núcleos hipotalámicos ventro-mediales, la sustancia gris periacueductal, el rafe mediano, el rafe magnus y los núcleos parabraquiales.

Corteza cerebral

En la corteza entorrinal se observó un aumento significativo en la densidad del receptor 5-HT_{1A} en las ratas bulbectomizadas (+42%) con respecto a las control ($q=3.704$, $p<0.05$) que fue revertido tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=6.078$, $p<0.01$ vs. bulbectomizados sin tratamiento) llegando a los valores de densidad similares a los observados en los animales control no tratados ($q=2.374$, $p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina no tuvo ningún efecto en los animales control. El análisis estadístico con ANOVA de dos vías mostró que las variables interacción y tratamiento fueron las mayores fuentes de variación [ANOVA interacción: $F(3,19)=5.696$, $p<0.05$], [ANOVA tratamiento: $F(3,19)=8.678$, $p<0.05$].

Núcleos septales

El tratamiento crónico con fluoxetina no produjo efecto significativo alguno en la densidad del receptor 5-HT_{1A} en los animales bulbectomizados. En cambio, en los

animales control se observó un descenso en su densidad (-41%; $q=5.383$, $p<0.01$). La fuente mayor de variación fueron las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,19)=5.747$, $p<0.05$] y tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,19)=5.222$, $p<0.05$].

Tronco del encéfalo

En el núcleo del rafe magnus se encontró una mayor densidad del receptor 5-HT_{1A} en los animales bulbectomizados que en los animales control (+43%; $q=3.968$, $p<0.05$) que fue revertida tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=5.493$, $p<0.01$ vs. bulbectomizados no tratados) hasta alcanzar los valores observados en los animales control ($p>0.05$). El análisis del ANOVA de dos vías mostró que las mayores fuentes de variación fueron debidos a la interacción entre las variables cirugía y tratamiento [ANOVA interacción: $F(3,19)=8.849$, $p<0.01$] y a la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,19)=5.690$, $p<0.05$]. También en el núcleo parabraquial dorsal se observó un aumento en la densidad de receptor 5-HT_{1A} en las ratas bulbectomizadas (+40%), que fue totalmente revertida tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=5.943$, $p<0.01$). El análisis de ANOVA de dos vías mostró que las fuentes de mayor variación fueron la interacción entre variables [ANOVA interacción: $F(3,19)=8.701$, $p<0.05$] y el tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,19)=6.497$, $p<0.05$].

Aunque no resultó ser significativo, también se observó un aumento (+28%) en la densidad del receptor 5-HT_{1A} en el núcleo parabraquial ventral de las ratas bulbectomizadas pero no significativo ($q=2.519$, $p>0.05$). Sin embargo, si resultó significativa la disminución tras el tratamiento crónico con fluoxetina en las ratas bulbectomizadas (-33% del valor de densidad en ratas bulbectonizadas no tratadas; $q=4.175$, $p<0.05$). El análisis de ANOVA de dos vías mostró que la fuente de mayor variación fue la interacción entre variables [ANOVA interacción: $F(3,19)=6.593$, $p<0.05$].

Resultados

Tabla 2. Densidades autorradiográficas del receptor 5-HT_{1A} (fmol/mg de tejido) medidas como fijación específica de [³H]-8-OH-DPAT 2 nM en el cerebro de rata control/ bullectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	OB	% cambio vs CO	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO
Corteza Cerebral								
Corteza FP externa	3,02 ± 0,24	3,02 ± 0,11	0,0	2,95 ± 0,32	-2,3	2,71 ± 0,26	-8,1	-10,3
Corteza FP interna	7,63 ± 0,98	7,30 ± 0,38	-4,3	8,00 ± 1,27	4,8	6,96 ± 0,88	-13,0	-8,8
Corteza cingular	9,22 ± 0,55	10,52 ± 1,49	14,1	10,14 ± 1,27	10,0	8,00 ± 0,83	-21,1	-13,2
Corteza entorrinal	14,16 ± 0,72	13,14 ± 1,05	-7,2	20,04 ± 3,93*	41,5	10,28 ± 1,14⁺⁺	-48,7	-27,4
Núcleos septales								
Núcleo septal latero-dorsal	27,49 ± 3,40	16,28 ± 0,89**	-40,8	20,28 ± 1,91	-26,2	20,25 ± 2,33	-0,1	-26,3
Núcleo septal latero-ventral	27,44 ± 2,99	23,59 ± 2,77	-14,0	22,47 ± 2,49	-18,1	23,64 ± 2,48	5,2	-13,8
Hipocampo								
CA1 CA2	15,80 ± 1,09	16,23 ± 0,94	2,7	14,17 ± 0,71	-10,3	13,00 ± 1,54	-8,3	-17,7
Giro Dentado	29,97 ± 1,23	26,97 ± 2,83	-10,0	29,57 ± 1,54	-1,3	27,33 ± 3,33	-7,6	-8,8
Hipotálamo								
Núcleos dorsomediales	3,56 ± 0,56	3,93 ± 0,56	10,4	3,35 ± 0,26	-5,9	3,15 ± 0,35	-6,0	-11,5
Núcleos ventromediales	8,53 ± 1,28	8,80 ± 1,55	3,2	6,08 ± 1,01	-28,7	5,46 ± 0,87	-10,2	-36,0
Amígdala								
Núcleos basolaterales	7,31 ± 0,83	6,72 ± 0,82	-8,1	6,06 ± 0,84	-17,1	6,47 ± 0,55	6,8	-11,5
Tronco del encéfalo								
Sustancia gris periacueductal	3,36 ± 0,19	2,83 ± 0,27	-15,8	3,07 ± 0,48	-8,6	2,35 ± 0,24	-23,5	-30,1
Rafe dorsal	9,48 ± 1,53	9,42 ± 1,43	-0,6	13,39 ± 4,83	41,2	9,36 ± 0,53	-30,1	-1,3
Rafe mediano	4,18 ± 0,57	5,32 ± 1,82	27,3	4,07 ± 0,43	-2,6	4,41 ± 0,56	8,4	5,5
Rafe magnus	1,96 ± 0,18	2,15 ± 0,21	9,7	2,80 ± 0,12**	42,9	2,03 ± 0,14⁺⁺	-27,5	3,6
Núcleo parabraquial dorsal	2,23 ± 0,31	2,30 ± 0,16	3,1	3,13 ± 0,42*	40,4	1,78 ± 0,08⁺⁺	-43,1	-20,2
Núcleo parabraquial ventral	1,96 ± 0,22	2,21 ± 0,25	12,8	2,50 ± 0,35	27,6	1,67 ± 0,09⁺	-33,2	-14,8

Los datos representan las medias ± E.E.M. *p<0.05 y **p<0.01 *versus* animales control (CO). ⁺p<0.05 y ⁺⁺p<0.01 *versus* bullectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8, COF=6-8, OB=6-8, OBF=6-8).

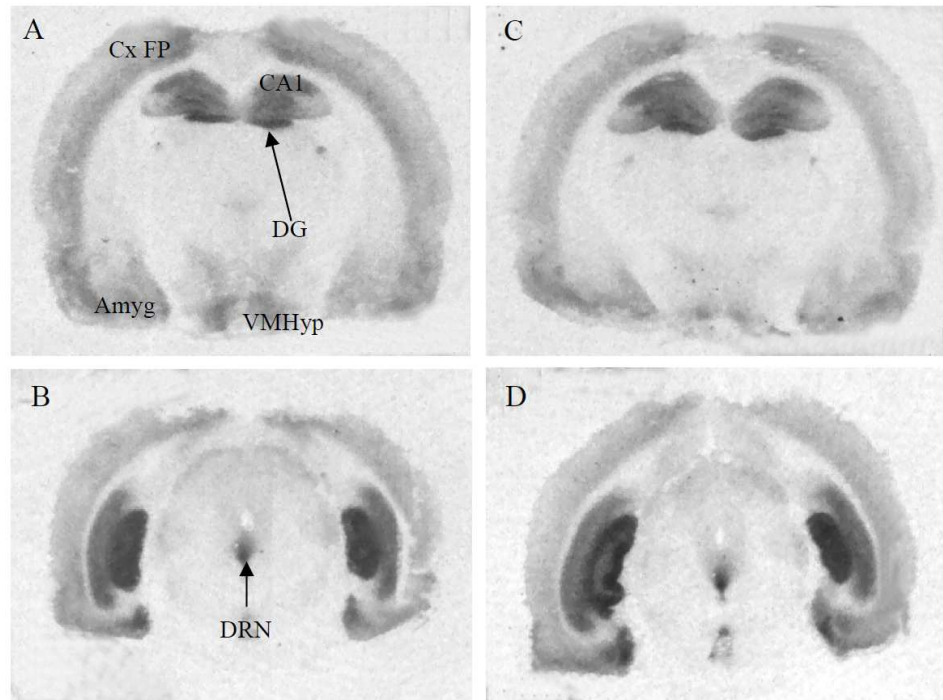


Figura 13. Autorradiograma representativo de la densidad del receptor 5-HT_{1A} a nivel del hipocampo anterior (A y C) y del núcleo dorsal del rafe (B y D) medida como la fijación específica de [³H]-8-OH-DPAT 2 nM en el cerebro de animales control y bulbectomizados. A) y B), animal control; C) y D) bulbectomizado. CxFP, corteza frontoparietal; CA1, área CA1 del hipocampo; DG, giro dentado del hipocampo; Amyg, núcleos basolaterales de la amígdala; VMHyp, núcleos ventromediales del hipotálamo; DRN, núcleo dorsal del rafe.

3.1.3. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{1A}

A continuación se describen los hallazgos más relevantes de los estudios de sobre funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} (fijación específica de [³⁵S]GTPγS inducida por el agonista selectivo 8-OH-DPAT (10 μM) en secciones cerebrales de animales control/bulbectomizados y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina (tabla 3; fig 14).

Áreas donde se detectaron niveles altos de estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS por el agonista (300-200% de la fijación basal) fueron la corteza entorrinal, el giro dentado del hipocampo y el núcleo del rafe mediano; niveles medios o medio-altos (200-150%) en la corteza frontoparietal interna, la corteza cingular, los núcleos septales, las láminas CA1 y CA2 del hipocampo, el núcleo dorsal del rafe y el rafe magnus; los porcentajes de estimulación más moderados a bajos (150-100%) en la corteza frontoparietal externa, el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, la sustancia gris periacueductal y los núcleos parabraquiales.

Corteza cerebral

Se detectó un aumento significativo en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} en la corteza frontoparietal externa en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+36%; $q=6.653$, $p<0.001$) que fue revertido tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=13.16$, $p<0.001$) y que incluso descendió (desensibilización) a niveles inferiores a los mostrados por los animales control ($q=6.505$, $p<0.001$). Por el contrario, el tratamiento crónico con fluoxetina en los animales control produjo un ligero pero significativo aumento en la funcionalidad (hipersensibilidad) del receptor 5-HT_{1A} a este nivel (+17%; $q=3.115$, $p<0.05$). El análisis de ANOVA de dos vías reveló que las fuentes de variación en los resultados se debieron a la interacción entre variables [ANOVA interacción: $F(3,17)=45.75$, $p<0.001$] y al tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=17.42$, $p<0.001$].

En la corteza entorrinal, no se observó diferencia alguna entre los dos grupos de los animales no tratados (CO y OB, $q=3.456$, $p>0.05$), aunque el tratamiento crónico con fluoxetina hizo aumentar la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} en el grupo de ratas bulbectomizadas (+43%; $q=4.963$, $p<0.05$) hasta recuperar valores similares a los animales control, mientras que no se observó efecto alguno de la fluoxetina en las ratas control. El análisis de ANOVA de dos vías reveló que la fuente de variación en los resultados se debió a la interacción entre variables [ANOVA interacción: $F(3,17)=10.82$, $p<0.01$].

Núcleos septales

Detectamos un aumento significativo en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} (hiperfuncionalidad) en el núcleo septal laterodorsal en las ratas bulbectomizadas con respecto a las control (+32%; $q=3.608$, $p<0.05$). Tras el tratamiento crónico con fluoxetina la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} se restableció totalmente hasta unos valores muy similares a los mostrados por los animales control ($p>0.05$). El análisis de ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación se debió únicamente a la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,17)=4.673$, $p<0.05$].

Hipocampo

En las capas CA₁ y CA₂ del hipocampo no se observaron diferencias en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control, si bien el tratamiento con fluoxetina produjo un descenso en la funcionalidad (desensibilización) en las ratas control (-29%; $q=4.555$, $p<0.05$) así como también en las ratas bulbectomizadas (-39%; $q=5.489$, $p<0.01$). La mayor fuente de variación observada en el análisis ANOVA de dos vías fue la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=16.81$, $p<0.01$].

También en el giro dentado se observaron las mismas variaciones que en las capas CA₁ y CA₂, es decir, desensibilización en las ratas control tras el tratamiento crónico con fluoxetina (-38%; $q=4.519$, $p<0.05$) así como en las ratas bulbectomizadas (-43%; $q=4.683$, $p<0.01$). La mayor fuente de variación fue el tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=14.52$, $p<0.01$].

Hipotálamo

A nivel de los núcleos hipotalámicos dorsomediales se observó una desensibilización del receptor 5-HT_{1A} en las ratas control tras el tratamiento crónico con fluoxetina (-32%; $q=4.860$, $p<0.05$). La mayor fuente de variación fueron las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,17)=4.675$, $p<0.05$] y el tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=5.501$, $p<0.05$].

Amígdala

En el complejo basolateral de la amígdala se observó una hipofuncionalidad del receptor 5-HT_{1A} en las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (-17%; $q=4.034$, $p<0.01$). El tratamiento crónico con fluoxetina produjo también una desensibilización del receptor 5-HT_{1A} tanto en ratas control (-27%; $q=6.494$, $p<0.001$) como en ratas bulbectomizadas (-22%; $q=4.304$, $p<0.05$). Las mayores fuentes de variación fueron la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=18.40$, $p<0.001$] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,17)=5.451$, $p<0.05$].

Tronco del encéfalo

En el núcleo del rafe dorsal el tratamiento crónico con fluoxetina produjo desensibilización del receptor 5-HT_{1A} tanto en las ratas control (-21%; $q=3.810$, $p<0.05$) como en las ratas bulbectomizadas (-23%; $q=4.304$, $p<0.05$). Las mayores

fuentes de variación correspondieron a la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=14.55, p<0.01$]

En el núcleo del rafe mediano se observó una hipofuncionalidad del receptor 5-HT_{1A} en las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (-41%; $q=5.100, p<0.01$), que fue revertida ($q=4.172, p<0.01$) totalmente por fluoxetina. En ratas control, el tratamiento crónico con fluoxetina produjo una desensibilización del receptor 5-HT_{1A} (-47%; $q=5.740, p<0.01$). La mayor fuente de variación correspondió a la variable interacción [ANOVA interacción: $F(3,17)=16.77, p<0.01$].

Ratio funcionalidad/densidad: “señalización” vía receptor 5-HT_{1A}

Un análisis más detallado de los resultados sobre la funcionalidad del receptor llevando a cabo una corrección de los valores de funcionalidad (fijación específica de [³⁵S]GTPγS) con relación a los valores de densidad autorradiográfica (R =ratio funcionalidad/densidad) puede aportar información sobre el grado “real” de cambio en la funcionalidad o “señalización neta” vía este receptor tras la bulbectomía y el tratamiento con fluoxetina. Esta ratio para cada grupo experimental (animales control tratados, bulbectomizados no tratados y bulbectomizados tratados) se expresa con relación al valor de referencia (= 1) del grupo de los animales control (“situación fisiológica”) y una vez normalizados los valores de correspondientes de densidad y de funcionalidad. Valores por debajo de 1 reflejarían “hipofuncionalidad real” y por encima de 1 “hiperfuncionalidad real”, una vez corregidos los valores de funcionalidad (fijación específica de [³⁵S]GTPγS) con relación a los valores de densidad autorradiográfica. A continuación se comentan los valores de R para aquellas áreas en las que se habían detectado cambios significativos en la funcionalidad para poder determinar si dichos cambios son “aparentes” (porque se acompañan de cambios en el mismo sentido y magnitud que en la densidad) o “reales” (sin cambios en la densidad). También se describen las áreas en las que se detectó algún cambio en la densidad sin alteración paralela de la funcionalidad.

En la corteza frontoparietal, los valores de R reflejan lo mismo que los resultados de la técnica de fijación específica de [35 S]GTP γ S: hiperfuncionalidad tras la bulbectomía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina en el animal control y una desensibilización en el animal bulbectomizado tratado con fluoxetina. En el caso de la corteza entorrinal, es importante mencionar que habíamos detectado un aumento en el número de receptores tras la bulbectomía, lo que unido a unos valores bajos de funcionalidad (-23%) daría una señalización neta o real disminuida en esta área ($R=0,5$); por su parte, la recuperación en la funcionalidad en el animal bulbectomizado tratado con fluoxetina sería en realidad una “hiperfuncionalidad real” ($R=1,5$) una vez tenida en cuenta la normalización en los valores de densidad del receptor.

En el núcleo del septo latero-dorsal, una $R=1,8$ confirmaría la hiperfuncionalidad del receptor 5-HT $_{1A}$ en el animal bulbectomizado, revertida, como vimos tras el tratamiento con fluoxetina; una $R=1,6$ en el animal control tratado con fluoxetina indicaría también que la funcionalidad se mantiene (o incluso aumenta relativamente) debido a la disminución significativa en la densidad del receptor a este nivel.

En el hipocampo, valores de $R \leq 0,7$ confirmarían la desensibilización inducida por fluoxetina tanto en el grupo control como bulbectomizado. En el hipotálamo dorsomedial, se confirma también la desensibilización por fluoxetina en el animal control ($R=0,6$).

El caso de la amígdala constituye otro ejemplo donde los valores de ratio aportan una información adicional, puesto que como hemos visto en la rata bulbectomizada se observaba una disminución en la fijación específica de [35 S]GTP γ S inducida por el agonista serotoninérgico (hipofuncionalidad) pero si se corrige de acuerdo al número de receptores nos indicaría la existencia de una “normofuncionalidad” (valor =1) en la señalización vía este receptor 5-HT $_{1A}$. La desensibilización del receptor tras el tratamiento crónico con fluoxetina se confirma en ambos grupos de animales con valores de $R=0,8$ y $0,7$ para los grupos control y bulbectomizado, respectivamente.

Con relación al rafe dorsal es importante resaltar que en el grupo de los animales bulbectomizados, aunque no se observaron diferencias significativas para los valores de densidad o funcionalidad, una $R = 0,7$ podría estar reflejando una cierta hipofuncionalidad a pesar de una regulación a la alta, no significativa, en la densidad del receptor. Lo que si está claro es que tras el tratamiento con fluoxetina hay una desensibilización significativa a este nivel para los animales control y los bulbectomizados ($R = 0,8$ y $0,7$ respectivamente). En el rafe mediano del animal bulbectomizado, los valores de R van paralelos a los registrados para la fijación específica de [^{35}S]GTP γ S. En el rafe magnus la disminución en la funcionalidad (-21%) y el aumento en la densidad (+43%) dan un balance final de $R = 0,6$ reflejando una menor señalización neta. Lo mismo podemos aplicar en el caso del núcleo parabraquial dorsal ($R = 0,7$). De cualquier manera, la regulación a la baja en la densidad del receptor tras el tratamiento con fluoxetina, hace que la señalización neta o final aparezca incrementada en ambos núcleos ($R = 1,4$ y $1,2$, para el rafe magnus y núcleo parabraquial dorsal, respectivamente).

Resultados

Tabla 3. Estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (10 μM) en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días). *R* representa la ratio funcionalidad/densidad (“señalización neta”) expresada con relación al valor de referencia 1 del grupo de animales control (CO)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	R	OB	% cambio vs CO	R	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO	R
Corteza Cerebral											
Corteza FP externa	128,8 ± 6,4	150,4 ± 11,7*	16,8	1,2	174,9 ± 6,0***	35,8	1,4	83,7 ± 5,5^{+++***}	-52,1	-35,0	0,7
Corteza FP interna	196,6 ± 2,0	175,5 ± 26,7	-10,7		156,4 ± 14,3	-20,4		123,2 ± 10,2	-21,2	-37,3	
Corteza cingular	195,5 ± 8,0	178,8 ± 17,5	-8,5		193,2 ± 13,6	-1,2		167,1 ± 9,91	-13,5	-14,5	
Corteza entorrinal	207,8 ± 3,0	183,4 ± 17,3	-11,7		159,6 ± 2,9	-23,2	0,5	228,9 ± 33,5⁺	43,4	10,2	1,5
Núcleos septales											
Núcleo septal latero-dorsal	176,5 ± 7,5	164,8 ± 10,6	-6,6	1,6	231,7 ± 32,3*	31,3	1,8	187,1 ± 12,2	-19,2	6,0	
Núcleo septal latero-ventral	149,8 ± 13,5	190,2 ± 28,0	27,0		174,0 ± 8,7	16,2		177,6 ± 15,6	2,1	18,6	
Hipocampo											
CA1 CA2	174,4 ± 16,6	124,7 ± 8,5*	-28,5	0,7	152,5 ± 14,5	-12,6		92,7 ± 12,3^{+++***}	-39,2	-46,8	0,7
Giro Dentado	272,5 ± 22,5	169,2 ± 13,3*	-37,9	0,7	247,2 ± 42,3	-9,3		140,2 ± 12,9^{+++**}	-43,3	-48,6	0,6
Tálamo											
Núcleos posteriores	120,5 ± 15,2	112,3 ± 12,2	-6,8		111,4 ± 13,1	-7,6		114,4 ± 16,4	-2,6	-5,1	
Hipotálamo											
Núcleos dorsomediales	128,3 ± 10,1	87,7 ± 10,8*	-31,6	0,6	104,6 ± 9,0	-18,5		102,9 ± 3,9	-1,6	-19,8	
Núcleos ventromediales	116,2 ± 4,11	110,4 ± 9,2	-5,0		111,1 ± 6,1	-4,4		107,1 ± 3,2	-3,6	-7,8	
Amígdala											
Núcleos basolaterales	131,8 ± 8,6	95,7 ± 8,0***	-27,4	0,8	109,4 ± 4,1**	-17,0	1	85,4 ± 3,6^{+++*}	-21,9	-35,2	0,7
Tronco del encéfalo											
Sustancia gris periacueductal	127,0 ± 8,6	110,6 ± 9,8	-12,9		126,2 ± 10,4	-0,6		102,6 ± 10,9	-18,7	-19,2	
Rafe dorsal	158,2 ± 16,1	125,8 ± 9,5**	-20,5	0,8	146,7 ± 7,7	-7,3	0,7	112,6 ± 9,0⁺	-23,2	-28,8	0,7
Rafe mediano	205,9 ± 30,5	110,2 ± 15,7**	-46,5	0,4	120,9 ± 11,4**	-41,3	0,6	190,5 ± 9,5⁺⁺	57,6	-7,5	0,9
Rafe magnus	173,0 ± 29,3	130,8 ± 16,9	-24,4		136,5 ± 14,2	-21,1	0,6	172,7 ± 22,1	26,5	-0,2	1,4
Núcleo parabraquial dorsal	113,0 ± 15,5	108,4 ± 13,3	-4,1		104,1 ± 10,1	-7,9	0,7	123,8 ± 18,7	18,9	9,6	1,2
Núcleo parabraquial ventral	108,2 ± 14,3	106,8 ± 14,0	-1,3		121,8 ± 8,2	12,6		111,4 ± 13,6	-8,9	2,6	

Los datos representan las medias ± E.E.M. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus animales control (CO). ⁺p<0.005, ⁺⁺p<0.001, ⁺⁺⁺p<0.001 versus bulbectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls(CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

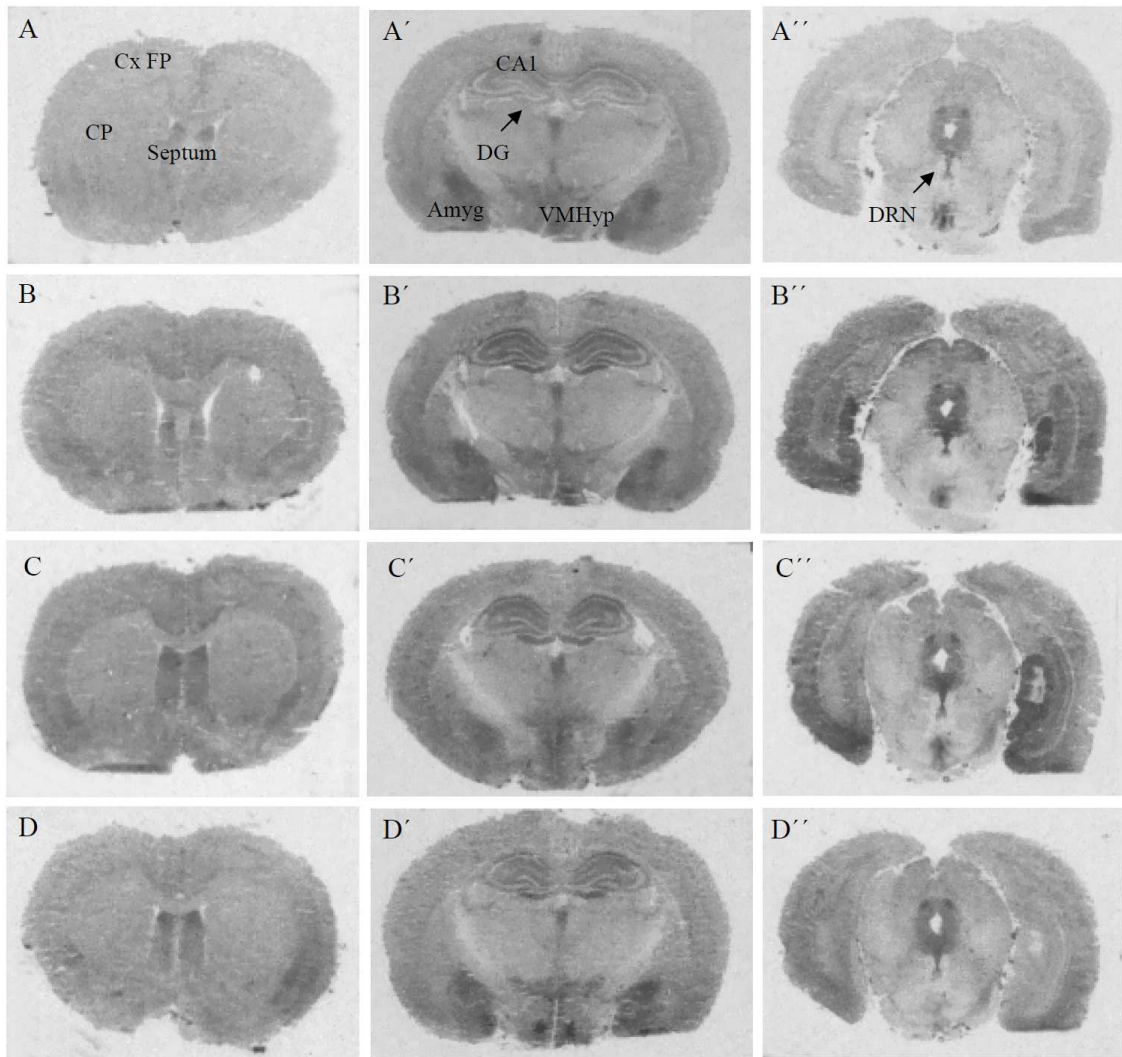


Figura 14. Autorradiograma representativo de la estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γ S por el agonista selectivo del receptor 5HT $_{1A}$ (\pm)-8-OH-DPAT 10 μM en el cerebro de animales control y bulbectomizados, así como el efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días) a nivel del caudado-putamen, hipocampo anterior y núcleo dorsal del rafe. A, A' y A'', son secciones representativas de la fijación basal de [^{35}S]GTP γ S observada en todos los grupos experimentales; B, B' y B'', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S por 8-OH-DPAT en el animal control CO; C, C' y C'', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S por 8-OH-DPAT en el animal bulbectomizado OB; D, D' y D'', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S por 8-OH-DPAT en el animal bulbectomizado y tratado con fluoxetina OBF. CxFP, corteza frontoparietal; CP, caudado-putamen; Septum, núcleos septales; CA1, lámina CA1 del hipocampo; DG, giro dentado del hipocampo; Amyg, núcleos basolaterales de la amígdala; VMHyp, núcleos ventromediales del hipotálamo; DRN, núcleo dorsal del rafe.

3.1.4. Autorradiografía anatómica del receptor 5-HT_{1B}: fijación de [³H]-GR125,743

Los hallazgos más relevantes de los estudios de fijación específica de [³H]-GR125743 (2 nM) a secciones cerebrales de animales control y bulbectomizados, y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina se exponen a continuación (tabla 4; fig 15).

En los animales control los valores de fijación específica de [³H]-GR125,743 fueron extremadamente altos (> 200 fmol/mg tejido) en la sustancia negra y el globo pálido; valores altos de densidad (65-100 fmol/mg tejido) se detectaron en la corteza entorrinal, los núcleos septales, el tálamo, el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal y el núcleo del rafe dorsal; valores medios (30-65 fmol/mg tejido) en las cortezas frontoparietal y cingular, el caudado-putamen, la amígdala, el núcleo del rafe mediano y núcleo del rafe magnus; las densidades más bajas (< 30 fmol/mg tejido) del receptor 5-HT_{1B} se detectaron en el hipocampo.

Núcleos septales

En el núcleo septal latero-dorsal no se observaron diferencias significativas en la densidad de receptor 5-HT_{1B} entre el grupo de ratas bulbectomizadas y el de ratas control. El tratamiento crónico con fluoxetina produjo una ligera regulación a la baja en estas últimas (- 12%; $q=4.048$, $p=0.05$). El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación dependió de la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=7.767$, <0.05].

Hipotálamo

En los núcleos hipotalámicos dorsomediales no se observó ninguna diferencia en la densidad de receptor 5-HT_{1B} entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control, aunque sí se observó una regulación a la baja, de nuevo, en las ratas control tras el

Resultados

tratamiento crónico con fluoxetina (-25%; $q=4.573$, $p<0.05$). La fuente de variación mayor fue la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=9.266$, $p<0.01$].

Resultados

Tabla 4. Densidades autorradiográficas del receptor 5-HT_{1B} (fmol/mg de tejido) medidas como fijación específica de [³H]-GR125,743 2 nM en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	OB	% cambio vs CO	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO
Corteza Cerebral								
Corteza FP externa	32,84 ± 3,59	24,89 ± 2,44	-24,2	34,44 ± 7,00	4,9	31,28 ± 3,46	-9,2	-4,8
Corteza FP interna	29,42 ± 3,79	19,16 ± 1,68	-34,9	32,19 ± 5,92	9,4	27,78 ± 3,30	-13,7	-5,6
Corteza cingular	45,90 ± 3,36	42,19 ± 4,13	-8,1	49,69 ± 5,09	8,3	47,00 ± 3,99	-5,4	2,4
Corteza entorrinal	66,37 ± 5,06	66,25 ± 4,73	-0,2	62,50 ± 4,22	-5,8	56,00 ± 4,66	-10,4	-15,6
Ganglios basales								
Caudado putamen	56,69 ± 3,14	53,19 ± 2,07	-6,2	61,94 ± 3,43	9,3	55,14 ± 1,86	-11,0	-2,7
Globo pálido	239,74 ± 14,90	241,03 ± 14,61	0,5	260,26 ± 15,65	8,6	225,26 ± 20,19	-13,4	-6,0
Nucleos septales								
Núcleo septal latero-dorsal	68,96 ± 3,99	60,56 ± 2,04*	-12,2	69,89 ± 2,17	1,3	63,14 ± 3,82	-9,7	-8,4
Núcleo septal latero-ventral	69,14 ± 5,91	60,69 ± 2,37	-12,2	76,18 ± 2,70	10,2	73,06 ± 3,75	-4,1	5,7
Hipocampo								
CA1 CA2	20,071 ± 3,03	17,29 ± 3,87	-13,9	17,25 ± 6,79	-14,1	22,91 ± 5,89	32,8	14,1
Giro Dentado	27,87 ± 6,69	18,75 ± 4,97	-32,7	30,72 ± 8,53	10,2	25,66 ± 9,29	-16,5	-7,9
Tálamo								
Núcleos posteriores	65,33 ± 4,43	57,21 ± 3,56	-12	60,45 ± 4,88	-7,5	57,45 ± 4,32	-4,9	-12,1
Hipotálamo								
Núcleos dorsomediales	83,31 ± 3,64	62,64 ± 5,12*	-24,8	84,72 ± 6,02	1,7	76,46 ± 4,70	-9,7	-8,2
Núcleos ventromediales	65,86 ± 3,79	56,57 ± 4,70	-14,1	72,29 ± 8,03	9,8	65,56 ± 6,38	-9,3	-0,5
Amígdala								
Núcleos basolaterales	59,54 ± 1,54	52,36 ± 3,31	-12,1	62,86 ± 2,82	5,6	60,28 ± 3,61	-4,1	1,2
Tronco del encéfalo								
Sustancia negra	315,21 ± 28,73	282,70 ± 44,78	-10,3	313,63 ± 22,12	-0,5	314,33 ± 19,39	0,2	-0,3
Sustancia gris periacueductal	77,73 ± 5,44	79,20 ± 3,64	1,9	82,50 ± 4,94	6,1	71,58 ± 3,87	-13,2	-7,9
Rafe dorsal	68,82 ± 4,78	71,67 ± 1,49	4,1	71,56 ± 4,845	4,0	65,78 ± 3,41	-8,1	-4,4
Rafe mediano	39,37 ± 4,12	32,32 ± 3,21	-17,9	39,11 ± 6,67	-0,7	32,41 ± 4,45	-17,1	-17,7
Rafe magnus	37,34 ± 3,23	40,55 ± 4,36	8,6	44,23 ± 4,26	18,5	35,64 ± 3,46	-19,4	-4,6

Los datos representan las medias ± E.E.M. *p<0.05 versus animales control no tratados (CO). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8,COF=6-,OB=6-8, OBF=6-8).

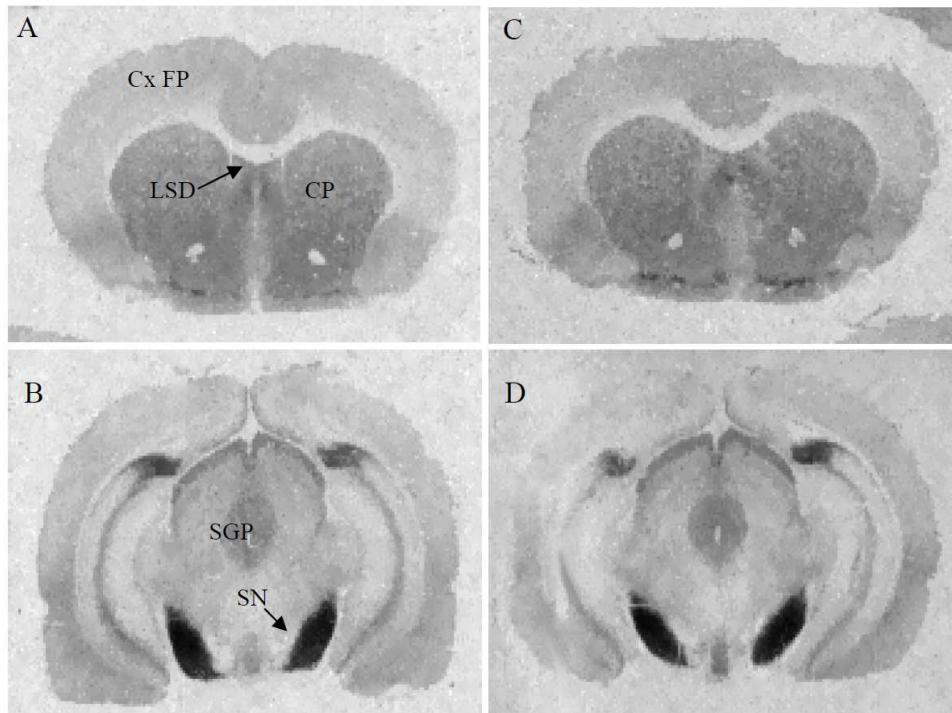


Figura 15. Autorradiograma representativo de la densidad del receptor 5-HT_{1B} a nivel del caudado-putamen (A y C) y de la sustancia negra (B y D) medida como la fijación específica de [³H]-GR125,743 (2 nM) en el cerebro de animales control y bulbectomizados. A) y B), animal control; C) y D) animal bulbectomizado. CxFP, corteza frontoparietal; LSD, núcleo laterodorsal del septo; CP, caudado-putamen; SGP, sustancia gris periacueductal; SN, sustancia negra.

3.1.5. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{1B}

Los cambios más significativos que hemos encontrado en cuanto a la eficacia de acoplamiento a las proteínas G a receptores 5-HT_{1B} se exponen a continuación (tabla 5; fig 16). Los valores vienen referidos como estimulación de la fijación específica [³⁵S]GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor 5-HT_{1B/D} GTI (10 μM). Áreas donde se detectaron niveles altos de estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS por el agonista (175-150% de la fijación basal) en las secciones de los animales control fueron: la corteza entorrinal, el núcleo del septo latero-dorsal, el giro dentado del hipocampo y la sustancia negra; niveles medios o moderados (150-125%) en la cortezas frontoparietal y cingular, el globo pálido, y la sustancia gris periacueductal; los porcentajes de estimulación más bajos (125-100%) fueron medidos en el caudado-putamen, las capas CA₁-CA₂ del hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, así como en los núcleos del rafe dorsal, mediano y magnus.

Núcleos septales

En el núcleo septal ventro-lateral no se observaron diferencias significativas entre los animales bulbectomizados y los animales control, sin embargo el tratamiento crónico con fluoxetina produjo una hipersensibilidad del receptor 5-HT_{1B} en los animales bulbectomizados (+54%; $q=6.380$, $p<0.001$). Las mayores fuentes de variación se debieron a las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=12.49$, $p<0.01$] y a la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,20)=11.68$, $p<0.01$].

Hipocampo

En las capas CA₁ CA₂ del hipocampo no se observaron diferencias significativas entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control ($p>0.05$), aunque el tratamiento crónico con fluoxetina sí produjo efectos diferentes, provocando una

hipersensibilización de receptores 5-HT_{1B} en los animales bulbectomizados (+41%; $q=6.281$, $p<0.05$), mientras que no produjo ningún efecto en los animales control ($p>0.05$). Las mayores fuentes de variación se debieron a las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=19.03$, $p<0.01$] y a la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,20)=7.08$, $p<0.05$].

Hipotálamo

A nivel de los núcleos hipotalámicos ventromediales se observó una hiperfuncionalidad del receptor 5-HT_{1B} en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+49%; $q=5.499$, $p<0.01$), que desapareció tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=4.462$, $p<0.01$) hasta observarse unos valores equivalentes a los de las ratas control ($p>0.05$). Las mayores fuentes de variación correspondieron a las variables tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,20)=6.973$, $p<0.05$] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,20)=12.54$, $p<0.01$].

Tronco del encéfalo

En la sustancia gris periacueductal no se detectaron diferencias significativas entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control. Tras el tratamiento crónico con fluoxetina se observó una desensibilización del receptor 5-HT_{1B} tanto en las ratas control (-29%; $q=5.755$, $p<0.01$) como en las ratas bulbectomizadas (-24%; $q=4.079$, $p<0.05$). El ANOVA de dos vías reveló que la mayor fuente de variación correspondió a la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,20)=19.91$, $p<0.001$].

A nivel del núcleo dorsal del rafe no se observaron diferencias en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1B} entre las ratas control y los animales bulbectomizados, pero tras el tratamiento crónico con fluoxetina se observó una desensibilización de este receptor en el grupo de las ratas bulbectomizadas (-33%, $q=5.835$, $p<0.01$). La mayor fuente de

variación correspondió a la variable interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=13.21$, $p<0.01$].

En el núcleo mediano del rafe tampoco se observaron diferencias entre las ratas control y las ratas bulbectomizadas, aunque el tratamiento crónico con fluoxetina produjo hipersensibilidad del receptor 5-HT_{1B} en el grupo de las ratas control (+27%; $q=4.367$, $p<0.01$) pero desensibilización en las ratas bulbectomizadas (-41%; $q=5.066$, $p<0.01$). Las mayores fuentes de variación correspondieron a las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=19.31$, $p<0.001$] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,20)=15.29$, $p<0.01$].

A nivel del rafe magnus se observó hiperfuncionalidad del receptor 5-HT_{1B} en las ratas bulbectomizadas en relación a las ratas control (+53%; $q=4.879$, $p<0.01$), que desapareció tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=6.896$, $p<0.001$) hasta unos niveles equivalentes a los observados en las ratas control ($q=2.017$, $p>0.05$). El tratamiento con fluoxetina produjo una hipersensibilidad del receptor 5-HT_{1B} en las ratas control (+53%; $q=4.846$, $p<0.01$). La única variable que aportó variación fue la interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=20.54$, $p<0.001$].

Ratio funcionalidad/densidad: “señalización” vía receptor 5-HT_{1B}

En el animal bulbectomizado no hay cambios en la señalización a través del receptor 5-HT_{1B}, salvo una hiperfuncionalidad significativa a nivel del hipotálamo ventromedial ($R= 1,4$) y del núcleo del rafe magnus ($R= 1,3$). Sin embargo, el tratamiento crónico con fluoxetina induce cambios diferenciales en la señalización vía este receptor 5-HT_{1B}: desensibilización en los núcleos del tronco cerebral ($R \leq 0,7$) y ausencia de cambios o tendencia a la hipersensibilidad en ciertas áreas telencefálicas y diencefálicas (i.e. $R= 1,4$ en el septo lateroventral; i.e. $R = 1,1$ en hipotálamo ventromedial).

Una de las áreas de proyección serotoninérgica en las que es interesante analizar el valor R es la corteza frontoparietal del animal bulbectomizado aunque no se detectasen cambios significativos ni en la densidad ni en la funcionalidad: vemos una tendencia a una menor señalización (valores de R entre 0,8-0,7) debido a la reducción en la fijación específica [^{35}S]GTP γ S registrada a este nivel (-19/26%) sin cambios en la densidad (+5/10%), y que se revierte tras el tratamiento crónico con fluoxetina.

El tratamiento crónico con fluoxetina en el animal control tiende a producir reducciones paralelas y de similar magnitud en la funcionalidad y en la densidad del receptor ($R \approx 1$), en general, en la mayoría de la áreas analizadas pero con las siguientes excepciones: en la sustancia gris periacueductal se confirma una clara desensibilización ($R = 0,7$) mientras que valores de $R = 1,4$ y $1,6$ confirman la presencia de una hipersensibilidad del receptor en los núcleos del rafe mediano y magnus.

Resultados

Tabla 5. Estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor 5-HT_{1B/D} GTI (10 μM) en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días). *R* representa la ratio funcionalidad/densidad (“señalización neta”) expresada con relación al valor de referencia 1 del grupo de animales control (CO)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	R	OB	% cambio vs CO	R	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO	R
Corteza Cerebral											
Corteza FP externa	124,2 ± 18,5	121,6 ± 22,6	-2,1		101,0 ± 14,7	-18,7		150,5 ± 28,2	49,0	21,2	
Corteza FP interna	140,4 ± 31,7	133,5 ± 12,1	-4,9		103,9 ± 5,9	-26,0		120,4 ± 21,2	15,9	-14,2	
Corteza cingular	140,8 ± 20,8	155,7 ± 11,8	10,6		135,4 ± 9,7	-3,8		144,0 ± 21,1	6,4	2,3	
Corteza entorrinal	164,4 ± 15,0	154,3 ± 16,0	-6,1		156,4 ± 12,6	-4,9		123,3 ± 8,3	-21,2	-25,0	
Ganglios basales											
Caudado putamen	114,1 ± 8,3	119,5 ± 9,2	4,7		125,8 ± 15,8	9,6		148,0 ± 7,1	18,4	29,7	
Globo pálido	142,5 ± 15,5	140,9 ± 21,1	-1,1		151,9 ± 7,8	6,6		140,8 ± 9,9	-7,3	-1,2	
Núcleos septales											
Núcleo septal latero-dorsal	150,9 ± 20,3	132,5 ± 13,4	-12,2	1,0	198,7 ± 43,9	31,7		178,2 ± 38,6	-10,3	18,1	
Núcleo septal latero-ventral	144,6 ± 12,9	116,5 ± 14,5	-19,4		142,9 ± 20,4	-1,2		219,8 ± 11,3⁺⁺⁺	53,8	52,0	1,4
Hipocampo											
CA1 CA2	111,8 ± 1,6	94,6 ± 5,8	-15,4		100,5 ± 10,5	-10,1		141,3 ± 5,7⁺⁺⁺	40,6	26,4	1,1
Giro Dentado	168,6 ± 6,9	118,8 ± 16,6	-29,5		148,3 ± 26,7	-12,0		153,1 ± 14,3	3,2	-9,2	
Tálamo											
Núcleos posteriores	123,3 ± 4,3	115,3 ± 7,4	-6,5		114,3 ± 6,4	-7,3		113,6 ± 12,9	-0,6	-7,9	
Hipotálamo											
Núcleos dorsomediales	116,2 ± 10,6	108,8 ± 7,0	-6,4	1,2	111,4 ± 7,6	-4,1		107,0 ± 7,4	-3,9	-7,9	
Núcleos ventromediales	95,8 ± 8,1	82,0 ± 8,6	-14,4		142,4 ± 16,3^{**}	48,6	1,4	104,6 ± 7,5⁺⁺	-26,5	9,2	1,1
Amígdala											
Núcleos basolaterales	112,7 ± 5,8	95,5 ± 8,8	-15,3		110,5 ± 5,0	-2,0		121,4 ± 3,4	9,9	7,7	
Tronco del encéfalo											
Sustancia negra	161,5 ± 7,5	164,7 ± 34,4	2,0		180,7 ± 6,4	11,9		139,4 ± 8,3	-22,9	-13,7	
Sustancia gris periacueductal	143,9 ± 6,8	102,1 ± 8,4^{**}	-29,0	0,7	125,1 ± 6,5	-13,1		95,5 ± 8,8⁺	-23,7	-33,6	0,7
Rafe dorsal	121,5 ± 9,8	138,5 ± 11,6	14,0		144,0 ± 7,5	18,5		96,9 ± 3,6⁺⁺	-32,7	-20,2	0,8
Rafe mediano	120,5 ± 3,8	153,5 ± 15,3^{**}	27,4	1,6	125,1 ± 8,6	3,8		74,3 ± 7,6⁺⁺	-40,6	-38,3	0,8
Rafe magnus	89,9 ± 4,2	137,4 ± 14,5^{**}	52,8	1,4	137,8 ± 10,0^{**}	53,3	1,3	70,1 ± 15,5⁺⁺⁺	-49,1	-22,0	0,8

Los datos representan las medias ± E.E.M. **p<0.01 versus animales control no tratados (CO). ⁺p<0.05, ⁺⁺p<0.01, ⁺⁺⁺p<0.001 versus bulbectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8, COF=6-8, OB=6-8, OBF=6-8).

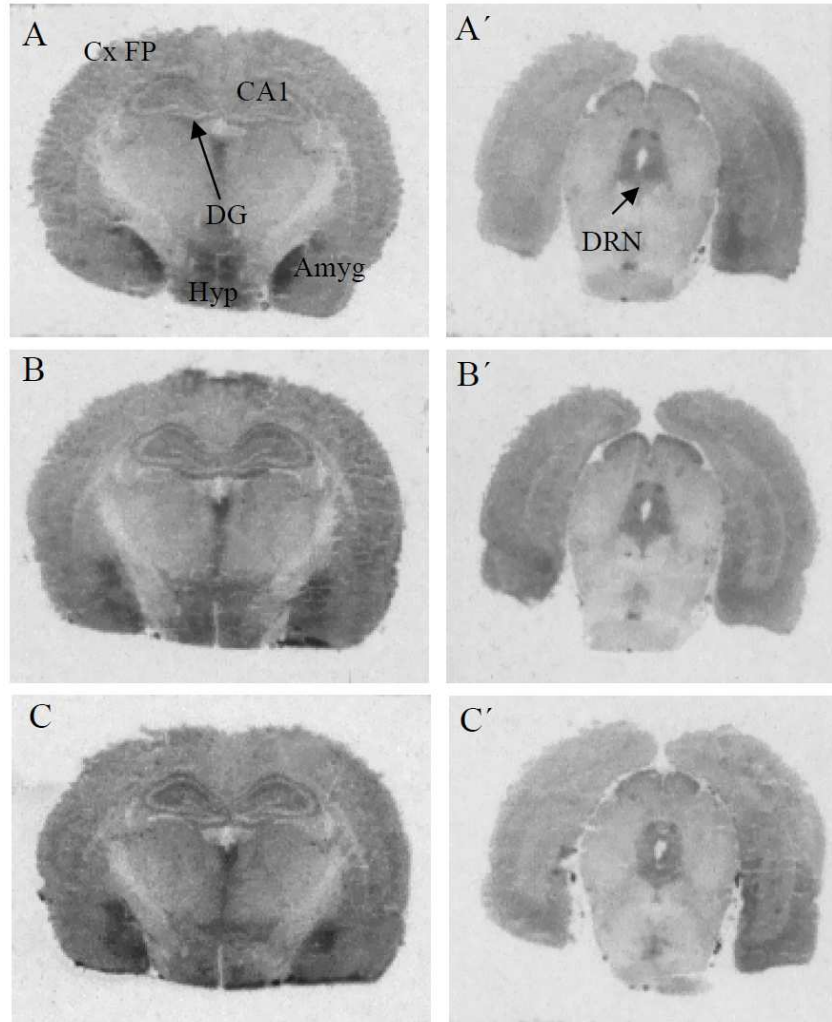


Figura 16. Autorradiograma representativo de la estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γ S por el agonista 5HT $_{1B/D}$ GTI 10 μM en el cerebro de animales bulbectomizados tratados y no tratados con fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días) a nivel del hipocampo anterior y del núcleo dorsal del rafe. A y A', son secciones representativas de la fijación basal de [^{35}S]GTP γ S; B y B', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S por GTI 10 μM en el animal bulbectomizado OB sin tratamiento con fluoxetina; C y C', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S por GTI 10 μM en el animal bulbectomizado tratado con fluoxetina OBF. CxFP, corteza frontoparietal; CA1, lámina CA1 del hipocampo; DG, giro dentado del hipocampo; Amyg, núcleos basolaterales de la amígdala; Hyp, hipotálamo; DRN, núcleo dorsal del rafe.

3.1.6. Autorradiografía anatómica del receptor 5-HT_{2A}: fijación de [³H]-ketanserina

Los hallazgos más relevantes de los estudios de fijación específica de [³H]-ketanserina (2 nM) a secciones cerebrales de animales control y bulbectomizados, y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina se exponen a continuación (tabla 6; fig. 17). El rango de densidades del receptor 5-HT_{2A} en las distintas áreas analizadas fue el siguiente en los animales control: las densidades más altas (>75 fmol/mg tejido) se detectaron en el caudado putamen; densidades moderadas (50-75 fmol/mg. tejido) en las cortezas cingular y entorrinal; densidades más bajas (30-50 fmol/mg. de tejido) se detectaron en la corteza frontoparietal, el hipocampo, la amígdala, la sustancia negra, la sustancia gris periacueductal y en los núcleos del rafe dorsal, mediano y magnus; las densidades más bajas (< 30 fmol/mg tejido) se midieron en el hipotálamo.

Corteza cerebral

En la corteza frontoparietal interna se observó un incremento en la densidad de receptor 5-HT_{2A} en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+30%; $q=4.691$, $p<0.01$). Tras el tratamiento crónico con fluoxetina esta regulación a la alta desapareció totalmente ($q=5.286$, $p<0.01$). El análisis ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación dependió de la variable interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=8.195$, <0.05].

Ganglios basales

A nivel del caudado-putamen se observó un aumento en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+21%; $q=4.636$, $p<0.05$) que tiende a normalizarse tras el tratamiento crónico con fluoxetina. El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que las mayores fuentes de variación dependieron de las variables interacción [ANOVA interacción: $F(3,20)=4.511$, <0.05] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,20)=5.427$, $p<0.05$].

Hipotálamo

En los núcleos hipotalámicos ventromediales se observó una ligera regulación a la baja de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en los animales bulbectomizados (-13%; $q=3.445$, $p<0.05$). El tratamiento con fluoxetina provocó un descenso ligero pero significativo de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en los animales control (-20%; $q=6.175$, $p<0.01$). El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación dependió de la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,20)=9.249$, <0.05].

Tronco del encéfalo

A nivel del rafe mediano no se hallaron diferencias entre los animales control y los bulbectomizados ($p>0.05$), y el tratamiento crónico con fluoxetina no surtió ningún efecto significativo en estos últimos animales ($p>0.05$) si bien produjo un descenso significativo en los animales control (-37%; $q=4.668$, $p<0.05$). El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación dependió de la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,20)=7.844$, <0.05].

A nivel del rafe magnus se halló un descenso significativo en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en las ratas bulbectomizadas (-21%; $q=4.297$, $p<0.01$) que se acentuó aún más después del tratamiento crónico con fluoxetina (-24% del valor en bulbectomizadas; $q=5.973$, $p<0.01$) y que se distanció más aún de los valores hallados en ratas control (-40%; $q=10.27$, $p<0.001$). En los animales control, el tratamiento con fluoxetina también produjo un descenso en la densidad del receptor 5-HT_{2A} (-30%; $q=7.786$, $p<0.001$). El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que las mayores fuentes de variación dependieron de la variables tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,20)=29.41$, $p<0.001$] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,20)=7.144$, $p<0.05$].

Resultados

Tabla 6. Densidades autorradiográficas del receptor 5-HT_{2A} (fmol/mgr. de tejido) medidas como fijación específica de [³H]-ketanserina a 2 nM en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	OB	% cambio vs CO	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO
Corteza Cerebral								
Corteza FP externa	46,77 ± 3,85	51,60 ± 5,64	10,3	49,68 ± 4,91	6,2	39,76 ± 3,15	-20,0	-15,0
Corteza FP interna	44,58 ± 2,70	49,60 ± 3,15	11,3	58,06 ± 5,32**	30,2	46,77 ± 4,64⁺⁺	-19,4	4,9
Corteza cingular	56,07 ± 4,39	67,98 ± 3,91	21,2	65,62 ± 4,87	17,0	70,33 ± 7,17	7,2	25,4
Corteza entorrinal	52,22 ± 1,22	34,20 ± 8,69	-34,5	48,51 ± 5,09	-7,1	44,22 ± 4,08	-8,8	-15,3
Ganglios basales								
Caudado putamen	77,23 ± 3,43	86,68 ± 4,20	12,2	93,37 ± 3,84*	20,9	87,72 ± 2,68	-6,1	13,6
Hipocampo								
CA1 CA2	29,76 ± 2,86	36,77 ± 2,92	23,6	41,77 ± 4,87	40,4	30,94 ± 3,36	-25,9	4,0
Giro Dentado	33,84 ± 2,15	36,72 ± 2,48	8,5	41,47 ± 4,87	22,5	35,77 ± 3,71	-13,7	5,7
Hipotálamo								
Núcleos dorsomediales	19,69 ± 1,16	21,55 ± 2,07	9,4	19,32 ± 0,69	-1,9	21,53 ± 1,82	11,4	9,3
Núcleos ventromediales	27,40 ± 0,54	21,93 ± 1,98**	-20,0	23,87 ± 1,33*	-12,9	21,48 ± 1,58	-10,0	-21,6
Amígdala								
Núcleos basolaterales	41,62 ± 2,05	45,58 ± 3,01	9,5	49,58 ± 5,32	19,1	42,85 ± 2,50	-13,6	3,0
Tronco del encéfalo								
Sustancia negra								
Sustancia gris periacueductal	43,37 ± 3,35	36,29 ± 3,60	-16,3	38,74 ± 4,04	-10,7	35,24 ± 2,51	-9,0	-18,7
Rafé dorsal	49,26 ± 7,70	47,40 ± 8,40	-3,8	55,50 ± 5,59	12,7	51,58 ± 6,67	-7,1	4,7
Rafé mediano	38,60 ± 5,60	24,50 ± 3,60*	-36,5	35,83 ± 3,09	-7,2	32,37 ± 3,44	-9,7	-16,1
Rafé magnus	38,29 ± 4,64	26,76 ± 2,08**	-30,1	30,26 ± 3,62**	-21,0	22,92 ± 1,93^{++***}	-24,3	-40,1

Los datos representan las medias ± E.E.M. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 *versus* animales control no tratados (CO). ⁺⁺p<0,01 *versus* animales bulbectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

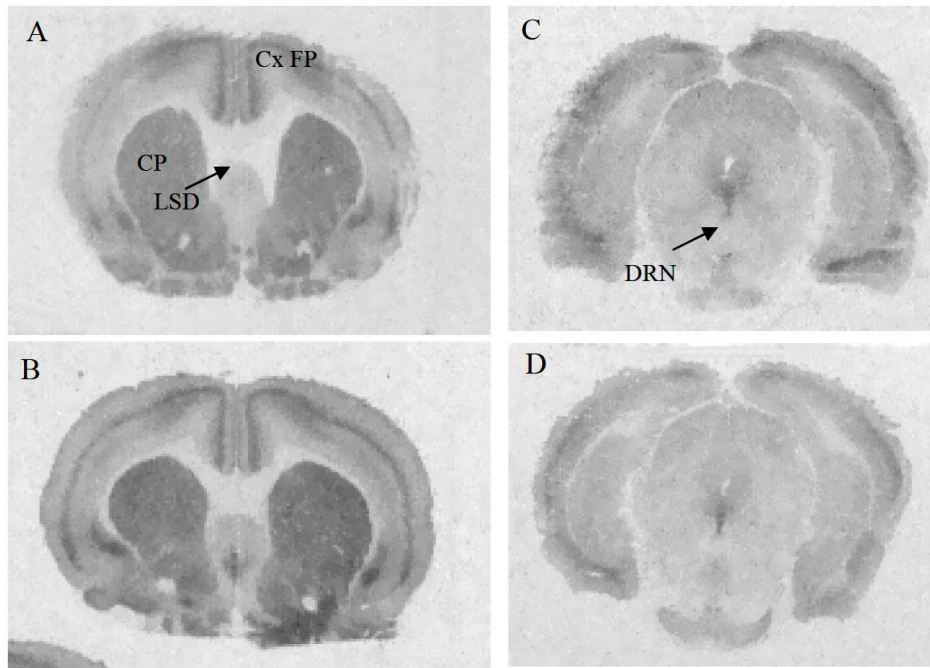


Figura 17. Autorradiograma representativo de la densidad del receptor 5-HT_{2A} a nivel del caudado-putamen (A y C) y del núcleo del rafe dorsal (B y D) medida como la fijación específica de [³H]-ketanserina (2 nM) en el cerebro de animales control y bulbectomizados. A) y B), animal control; C) y D) animal bulbectomizado. CxFP, corteza frontoparietal; LSD, núcleo laterodorsal del septo; CP, caudado-putamen; DRN, núcleo dorsal del rafe.

3.1.7. Autorradiografía funcional del receptor 5-HT_{2A}

Los cambios más significativos o dignos de mención que hemos encontrado en cuanto a la eficacia de acoplamiento a las proteínas G a receptores 5-HT_{2A} se exponen a continuación (tabla 7; fig. 18). Los valores vienen referidos como estimulación de la fijación específica [³⁵S]GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor 5-HT_{2A} TCB-2 (100 μM). Esta es la primera vez que se utiliza un protocolo modificado (ver métodos) del habitualmente descrito en la literatura para la técnica de fijación específica [³⁵S]GTPγS (Sim et al., 1995) con la finalidad de conseguir algo más de sensibilidad y poder detectar cambios en la respuesta mediada a través de receptor. Los estímulos en los animales control son muy débiles, pero la técnica permite ver cambios en la respuesta, si los hubiere, como consecuencia de la cirugía o del tratamiento con el antidepresivo. En los animales control, cierto estímulo (110-115%) en la fijación específica [³⁵S]GTPγS se detectó en la corteza entorrinal, hipotálamo ventromedial, rafe dorsal y rafe mediano, áreas donde previamente hemos descrito la presencia de densidades detectables del receptor 5-HT_{2A} (fig. 18). La selectividad de esta respuesta se demostró mediante la coincubación de secciones con el antagonista selectivo 5-HT_{2A} MDL 11930. Así, en áreas como la corteza el valor medio basal en los animales control fue de 1032 nCi/mg y el valor medio en presencia del antagonista fue de 1081 nCi/mg; y en los núcleos hipotalámicos ventro-mediales, tenemos un valor medio basal de 2060 nCi/mg frente a 1861 nCi/mg de tejido con el antagonista. De cualquier manera, teniendo en cuenta la escasa magnitud de la respuesta funcional, y a veces inexistente, que se observa en el grupo de los animales control, debemos ser cautos a la hora de interpretar los resultados relativos a la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} analizada en cada uno de los distintos grupos experimentales.

Corteza cerebral

En la corteza cingular, se detectó un aumento significativo (hipersensibilidad) tanto en los animales control (+16%; $q=3.665$, $p<0.05$) como en los animales bulbectomizados (+22%; $q=5.258$, $p<0.01$) tras el tratamiento crónico con fluoxetina.

El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación dependió de la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=7.187$, $p<0.05$].

Hipocampo

A nivel del giro dentado se vio un aumento significativo en la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} en el grupo de los animales control tras el tratamiento crónico con fluoxetina (+27%; $q=4.179$, $p<0.05$). El análisis con el ANOVA de dos vías mostró que la mayor fuente de variación dependió de la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,17)=5.013$, $p<0.05$].

Ratio funcionalidad/densidad: “señalización” vía receptor 5-HT_{2A}

En el animal bulbectomizado no se aprecian desviaciones importantes del valor de R (entre 0,8-1,2) a pesar de haberse detectado cambios significativos en la densidad en núcleos como el núcleo del rafe magnus (-21%), el hipotálamo ventromedial (-12%), la corteza frontoparietal (+30%) y el caudado putamen (+21%). Lo mismo ocurre en el cerebro del animal bulbectomizado tras el tratamiento crónico con fluoxetina, exceptuando el valor de $R= 1,7$ observado en el núcleo del rafe magnus debido a un cierto aumento en la funcionalidad (+10%) asociado a una reducción significativa en la densidad (-24%).

En el animal control y tratado con fluoxetina, los valores de R en áreas o núcleos encefálicos reflejan pocos cambios o una cierta tendencia a la hiperfuncionalidad (i.e. en el hipocampo o la amígdala, con valores $R= 1,2-1,3$). En el tronco cerebral (núcleos del rafe mediano y del rafe magnus) se aprecia el mismo patrón de cambio al fijarnos en el valor de $R (\geq 1,4)$, consecuencia de las reducciones significativas en la densidad del receptor.

Resultados

Tabla 7. Estimulación de la fijación específica de [³⁵S] GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor 5-HT_{2A} TCB-2 (100 μM) en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días). *R* representa la ratio funcionalidad/densidad (“señalización neta”) expresada con relación al valor de referencia 1 del grupo de animales control (CO)

ÁREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	R	OB	% cambio vs CO	R	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO	R
Corteza Cerebral											
Corteza FP externa	89,8 ± 4,8	103,0 ± 2,5	14,8		100,5 ± 7,6	12,0		106,0 ± 2,9	5,5	18,2	
Corteza FP interna	104,8 ± 0,7	107,5 ± 2,0	2,6		107,7 ± 4,1	2,8	0,8	116,2 ± 6,7	7,8	10,9	1,1
Corteza cingular	97,2 ± 1,1	113,0 ± 4,9*	16,4	1	104,4 ± 4,9	7,5		127,2 ± 6,8^{++***}	21,9	31,0	1
Corteza entorrinal	113,4 ± 3,1	113,7 ± 11,0	0,3		119,7 ± 1,6	5,5		117,9 ± 3,4	-1,4	4,0	
Ganglios basales											
Caudado putamen	101,7 ± 9,3	106,0 ± 6,9	4,2		109,5 ± 9,0	7,6	0,9	114,7 ± 13,2	4,8	12,8	
Hipocampo											
CA1 CA2	97,8 ± 4,2	116,3 ± 7,8	18,9		97,9 ± 9,1	0,2		111,1 ± 5,5	13,5	13,7	
Giro Dentado	105,3 ± 7,0	133,1 ± 11,6*	26,5	1,2	110,6 ± 8,8	5,1		121,7 ± 5,5	10,0	15,7	
Tálamo											
Núcleos posteriores	103,3 ± 5,8	110,5 ± 8,9	6,9		109,9 ± 9,9	-6,4		105,7 ± 7,7	-3,8	-2,3	
Hipotálamo											
Núcleos dorsomediales	105,3 ± 4,5	109,7 ± 8,6	4,2		115,2 ± 4,5	9,4		113,4 ± 7,3	-1,5	7,7	
Núcleos ventromediales	110,2 ± 3,4	111,4 ± 4,3	1,1	1,3	118,9 ± 5,9	7,9	1,2	117,6 ± 6,1	-1,2	6,7	
Amígdala											
Núcleos basolaterales	107,1 ± 3,3	105,6 ± 15,0	-1,3		101,2 ± 7,3	-5,4		109,6 ± 9,7	8,3	2,4	
Tronco del encéfalo											
Sustancia negra											
Sustancia gris periacueductal	103,0 ± 3,0	108,5 ± 3,8	5,4		106,5 ± 2,2	3,4		110,6 ± 4,6	3,9	7,5	
Rafe dorsal	114,2 ± 4,5	107,8 ± 3,0	-5,6		109,4 ± 2,8	-4,2		121,2 ± 3,9	10,7	6,1	
Rafe mediano	113,8 ± 4,2	106,8 ± 12,1	-6,1	1,5	113,8 ± 3,4	0,0		117,1 ± 6,5	3,0	3,0	
Rafe magnus	107,7 ± 7,3	105,1 ± 3,7	-2,4	1,4	102,3 ± 1,5	-4,9	1,2	112,3 ± 8,6	9,7	4,4	1,7

Los datos representan las medias ± E.E.M. **p*<0.05 y ****p*<0.001 *versus* animales control no tratados (CO). ⁺⁺*p*<0,01 *versus* animales bulbectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

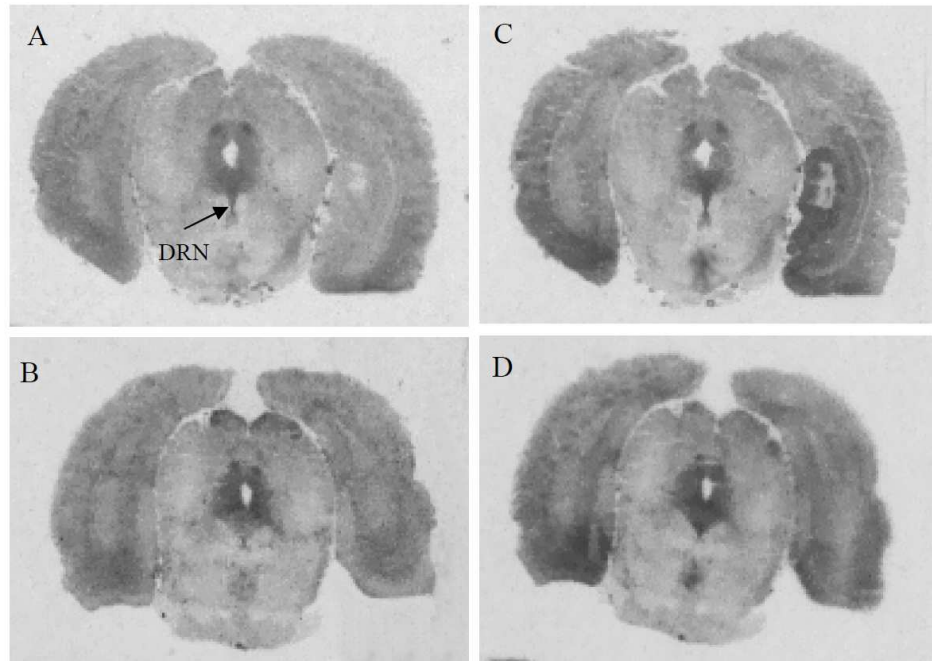


Figura 18. Autorradiograma representativo de la estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γ S por el agonista selectivo del receptor 5HT $_{2A}$ TCB-2 100 μM en el cerebro de animales control y bulbectomizados a nivel núcleo dorsal del rafe. A y B, son secciones representativas de la fijación basal de [^{35}S]GTP γ S del animal control (CO) y del animal bulbectomizado (OB) respectivamente; C y D, representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S por TCB-2 en el animal control y bulbectomizado, respectivamente. DRN, núcleo dorsal del rafe.

3.2. Autorradiografía anatómica y funcional del receptor CB₁

3.2.1 Autorradiografía anatómica del receptor CB₁: fijación de [³H]-CP55,940

Los hallazgos más relevantes de los estudios de fijación específica de [³H]-CP 55,940 (2 nM) a secciones cerebrales de animales control y bulbectomizados, y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina se exponen a continuación (tabla 8; fig 19).

Las densidades del receptor CB₁ observadas en el animal control se situaron en los siguientes rangos: densidades muy altas en la sustancia negra (> 150 fmol/mg tejido); densidades altas (100-50 fmol/mg. tejido) en el septo, el hipocampo y el núcleo parabraquial dorsal; densidades moderadas-bajas (50-20 fmol/mg tejido) en la corteza frontoparietal, la corteza entorrinal, el hipotálamo, la amígdala, la sustancia gris periacueductal, el núcleo del rafe mediano, el núcleo del rafe magnus y el núcleo parabraquial ventral; densidades mínimas (< 20 fmol/ mg tejido) se observaron en la corteza cingular.

Hipocampo

A nivel de giro dentado no se observaron diferencias significativas entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control, aunque sí una cierta tendencia a la disminución en la densidad del receptor CB₁ en las ratas bulbectomizadas (-37%; $q=3.154$, $p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina produjo una regulación a la alta del receptor CB₁ en las ratas bulbectomizadas (+69%; $q=4.767$, $p<0.05$), aumentando los valores de densidad hasta cifras similares a las observadas en las ratas control ($p>0.05$). En cualquier caso, el ANOVA de dos vías no mostró ninguna fuente de variación.

Amígdala

En los núcleos basolaterales de la amígdala tampoco se observaron diferencias entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control, aunque sí una cierta tendencia a la regulación a la baja del receptor CB₁ en las ratas bulbectomizadas (-27%; $q=3.021$, $p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina produjo un aumento en la densidad del receptor CB₁ en las ratas bulbectomizadas (+45%; $q=4.290$, $p<0.05$), con valores similares a los observados en las ratas control ($p>0.05$). El análisis ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación se debió a la interacción entre variables [ANOVA interacción: $F(3,18)=7.266$, $p<0.05$].

Otras áreas cerebrales

Aunque en ningún caso resultase significativo estadísticamente, se detectó una tendencia generalizada a la reducción en la densidad del receptor CB₁ para las ratas bulbectomizadas en las áreas corticales (entre -25 y -30%), los núcleos hipotalámicos (de -30 a -35%), amígdala (-28%), y la mayoría de estructuras del tronco cerebral (-25 a -35%), que desapareció o se redujo tras el tratamiento crónico con fluoxetina salvo en ciertas áreas o núcleos. La única excepción fue la corteza cingular donde se detectó una tendencia a la regulación a la alta que aún se acentuó más tras el tratamiento con fluoxetina (+58% y +106%, respectivamente), pero sin llegar a la significación estadística con el análisis seguido en este estudio (ANOVA de dos vías).

Resultados

Tabla 8. Densidades autorradiográficas del receptor CB₁ (fmol/mg de tejido) medidas como fijación específica de [³H]-CP55,940 3 nM en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	OB	% cambio vs CO	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO
Corteza Cerebral								
Corteza FP externa	30,68 ± 3,20	28,13 ± 6,61	-8,3	23,03 ± 2,02	-24,9	24,68 ± 3,64	7,2	-19,6
Corteza FP interna	43,14 ± 4,30	32,43 ± 7,90	-24,8	30,00 ± 4,54	-30,5	31,46 ± 6,33	4,9	-27,1
Corteza cingular	13,38 ± 1,45	17,21 ± 6,25	28,6	21,15 ± 2,39	58,1	27,58 ± 4,69	30,4	106,1
Corteza entorrinal	32,42 ± 3,15	43,15 ± 11,95	33,1	22,39 ± 2,94	-30,9	34,01 ± 1,79	51,9	4,9
Ganglios basales								
Caudado putamen	46,47 ± 1,55	38,83 ± 11,59	-16,4	33,13 ± 4,67	-28,7	36,58 ± 4,48	10,4	-21,3
Nucleos septales								
Núcleo septal latero-dorsal	48,11 ± 3,29	37,16 ± 10,79	-33,2	29,94 ± 7,19	-46,1	37,85 ± 6,70	26,4	-31,9
Núcleo septal latero-ventral	55,59 ± 4,18	36,96 ± 12,99	-33,5	35,69 ± 6,96	-35,8	40,82 ± 7,04	14,4	-26,6
Hipocampo								
CA1 CA2	51,19 ± 2,62	56,06 ± 11,93	9,5	46,45 ± 3,20	-9,3	50,67 ± 5,54	9,1	-1,0
Giro Dentado	61,71 ± 2,81	69,92 ± 15,10	13,3	38,97 ± 2,91	-36,8	65,76 ± 11,34⁺	68,7	6,6
Hipotálamo								
Núcleos dorsomediales	39,95 ± 6,30	35,25 ± 11,55	-11,8	26,37 ± 5,55	-34,0	32,27 ± 5,54	22,4	-19,2
Núcleos ventromediales	39,46 ± 2,62	32,57 ± 8,70	-17,5	27,38 ± 4,19	-30,6	33,86 ± 4,47	23,7	-14,2
Amígdala								
Núcleos basolaterales	30,11 ± 2,27	24,77 ± 6,75	-17,7	21,55 ± 2,84	-28,4	31,71 ± 3,36⁺	47,1	5,3
Tronco del encéfalo								
Sustancia negra	172,98 ± 4,69	113,24 ± 44,07	-34,5	126,15 ± 15,00	-27,1	116,99 ± 18,22	-7,3	-32,4
Sustancia gris periacueductal	46,46 ± 1,55	38,83 ± 11,59	-16,4	33,13 ± 4,67	-28,7	36,58 ± 4,48	10,4	-21,3
Rafe dorsal	37,64 ± 1,80	53,55 ± 18,02	42,3	26,24 ± 4,33	-30,3	34,97 ± 3,25	33,3	-7,1
Rafe mediano	30,12 ± 2,92	32,30 ± 9,06	7,2	19,60 ± 2,66	-34,9	26,04 ± 3,14	32,9	-13,5
Rafe magnus	21,58 ± 3,60	27,01 ± 7,04	25,2	18,85 ± 8,62	-12,7	25,68 ± 7,59	36,2	19,0
Núcleo parabraquial dorsal	53,51 ± 4,75	40,23 ± 9,29	-24,8	35,40 ± 7,16	-33,8	36,98 ± 7,31	4,5	-30,9
Núcleo parabraquial ventral	45,17 ± 1,71	35,40 ± 7,61	-21,6	32,25 ± 8,36	-28,6	31,18 ± 7,08	-3,3	-31,0

Los datos representan las medias ± E.E.M. ⁺p<0.05 *versus* animales bulbectomizados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

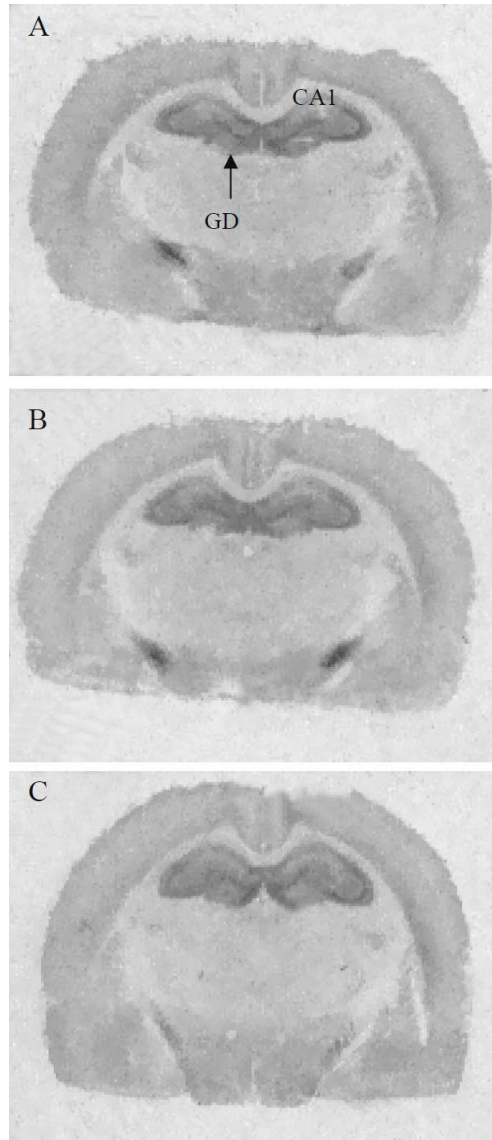


Figura 19. Autorradiograma representativo de la densidad del receptor CB₁ a nivel del hipocampo anterior medida como la fijación específica [³H]-CP55,940 (2 nM) en el cerebro de un animal control (A), bulbectomizado (B) y bulbectomizado tratado con fluoxetina (C). GD, giro dentado del hipocampo; CA1, lámina CA1 del hipocampo.

3.2.2. Autorradiografía funcional del receptor CB₁

Los cambios más significativos que hemos encontrado en cuanto a la eficacia de acoplamiento a las proteínas G a receptores CB₁ se exponen a continuación (tabla 9; fig. 20). Los valores vienen referidos como estimulación de la fijación específica [³⁵S]GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor CB₁ WIN 55212-2 (10 μM).

En los animales control, el área que mostró una gran respuesta en la estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS fue la sustancia negra (< 250% de la fijación basal); niveles altos de estimulación (175-150%) se detectaron en la corteza frontoparietal interna, la corteza entorrinal, el septo lateroventral, y el hipotálamo ventromedial; niveles medios o moderados (150-125%) en la corteza cingular, el septo laterodorsal, el giro dentado del hipocampo, la amígdala y la sustancia gris periacueductal; los porcentajes de estimulación más bajos (125-110%) fueron observados en el hipotálamo dorsomedial, y los núcleos del rafe dorsal, mediano y magnus; finalmente, prácticamente ausencia de respuesta (< 110%) se vio en la corteza frontoparietal externa, las capas de CA1-CA2 del hipocampo, y el núcleo parabraquial ventral.

Corteza cerebral

En la corteza frontoparietal externa se observó una hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en las ratas bulbectomizadas con respecto a las control (+110%; $q=5.973$, $p<0.01$), que no se normalizó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=0.2885$, $p>0.05$). En los animales control la fluoxetina no ejerció ningún efecto ($p>0.05$). El ANOVA de dos vías reveló que la fuente de variación se debió a la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=36.97$, $p<0.001$]. En la corteza frontoparietal interna se observó de nuevo esa hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en las ratas bulbectomizadas con respecto a las control (+116%; $q=10.50$, $p<0.001$) que no se normalizó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=0.3558$, $p>0.05$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún

efecto ($q=0.366$, $p>0.05$). El ANOVA de dos vías reveló que la fuente de variación se debió a la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=96.74$, $p<0.001$].

En la corteza cingular se observó de nuevo la hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en las ratas bulbectomizadas con respecto a las control (+82%; $q=6.170$, $p<0.01$). El tratamiento con fluoxetina no disminuyó esta hiperfuncionalidad del receptor CB_1 ($q=1.535$, $p>0.05$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún efecto ($q=0.996$, $p>0.05$). El ANOVA de dos vías reveló que la fuente de variación se debió a la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=38.66$, $p<0.001$].

A nivel de la corteza entorrinal se detectó una hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en las ratas bulbectomizadas con respecto a las control (+83%; $q=5.361$, $p<0.01$), que disminuyó tras el tratamiento crónico con fluoxetina (-33% vs. rata bulbectomizada; $q=4.023$, $p<0.01$). El tratamiento crónico con fluoxetina no ejerció ningún efecto significativo en los animales control ($p>0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que las fuentes de variación se debieron a las variables tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,18)=5.706$, $p<0.05$] y a la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=15.27$, $p<0.01$].

Caudado putamen

En el caudado-putamen se observó una hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (+229%; $q=7.0123$, $p<0.001$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=35.54$, $p<0.001$].

Núcleos septales

En el núcleo septal laterodorsal se observó una hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (+140%; $q=9.052$, $p<0.001$) que disminuyó tras el tratamiento crónico con fluoxetina (-24%; $q=3.703$,

$p < 0.05$) pero que no llegó a unos niveles equivalentes a los observados en las ratas control, observándose aún una regulación a la alta (+82%; $q = 5.349$, $p < 0.01$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún cambio significativo ($q = 1.188$, $p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 45.54$, $p < 0.001$].

En el núcleo septal lateroventral se observó también esa hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (+60%; $q = 5.860$, $p < 0.01$) que no desapareció tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q = 2.114$, $p > 0.05$). En los animales control la fluoxetina no ejerció ningún cambio ($q = 2.220$, $p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 26.45$, $p < 0.001$].

Hipocampo

En las capas CA_1 y CA_2 del hipocampo anterior se observó una importante hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+143%; $q = 9.618$, $p < 0.001$) que no se modificó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q = 0.915$, $p > 0.05$). En los animales control la fluoxetina no ejerció ningún cambio significativo ($p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 72.36$, $p < 0.001$].

A nivel del giro dentado se observó una también hiperfuncionalidad del receptor CB_1 en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+101%; $q = 9.644$, $p < 0.001$) que no disminuyó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q = 2.717$, $p > 0.05$). En los animales control la fluoxetina no ejerció ningún cambio significativo ($p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 90.36$, $p < 0.001$].

Hipotálamo

En los núcleos hipotalámicos dorsomediales se observó una hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+68%; $q=5.817$, $p<0.01$) que no disminuyó tras el tratamiento crónico con fluoxetina (+36% del valor en el grupo control; $q=2.749$, $p>0.05$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún cambio ($q=2.205$, $p>0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=19.35$, $p<0.01$].

En los núcleos hipotalámicos ventromediales no se observó ninguna diferencia significativa entre las ratas bulbectomizadas y las ratas control, aunque tras el tratamiento crónico con fluoxetina se observó una desensibilización del receptor CB₁ en las ratas control (-31%; $q=2.975$, $p<0.05$). El análisis de ANOVA de dos vías no reveló ninguna fuente de variación significativa.

Amígdala

A nivel de la amígdala basolateral se observó una clara hipersensibilidad del receptor CB₁ en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+77%; $q=5.471$, $p<0.01$) que no se modificó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=1.693$, $p>0.05$). En los animales control la fluoxetina no ejerció ningún cambio ($q=2.513$, $p>0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18)=25.46$, $p<0.001$].

Tronco del encéfalo

En la sustancia negra se observó una hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+79%; $q=7.105$, $p<0.001$) que no desapareció tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=1.135$,

$p > 0.05$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún cambio ($q = 0.679$, $p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 34.90$, $p < 0.001$].

A nivel del núcleo rafe magnus se observó una hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+49%; $q = 4.711$, $p < 0.01$) que no se modificó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($p > 0.05$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún cambio ($q = 1.364$, $p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 11.30$, $p < 0.01$].

Finalmente, en el núcleo parabraquial ventral se detectó una hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (+38%; $q = 4.580$, $p < 0.05$) que no disminuyó tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q = 1.750$, $p > 0.05$). En los animales control, la fluoxetina no ejerció ningún cambio ($p > 0.05$). El ANOVA de dos vías mostró que la fuente de variación provino de la variable cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,18) = 6.997$, $p < 0.05$].

Ratio funcionalidad/densidad para el receptor CB₁

A nivel de los núcleos del tronco cerebral del animal bulbectomizado nos encontramos con áreas en las que la señalización vía receptor CB₁ está incrementada debido a un aumento en la funcionalidad (entre un +15 y un +80%) asociada a una tendencia a la reducción en la densidad, como se refleja con los valores de R en el caso de la sustancia negra, el rafe magnus y el núcleo parabraquial ventral (R de 2,4-1,7 y 1,4, respectivamente); hiperseñalización que revierte con fluoxetina.

En áreas encefálicas, esta hiperseñalización vía receptor CB₁ es aún más manifiesta y estadísticamente significativa (valores de R entre 2,5-4,4), en prácticamente todos los núcleos o áreas estudiadas a consecuencia de los enormes incrementos en la funcionalidad (+80 a +150%) y las reducciones en la densidad del receptor CB₁; el tratamiento crónico

tiende a reducir esta hiperseñalización pero sin conseguir llegar a los valores del grupo control (R entre 1,2-2,7).

Tras el tratamiento con fluoxetina en el animal control se observa una tendencia a la hipofuncionalidad (significativa en el hipotálamo ventromedial) pero con una reducción paralela en la densidad en la mayoría de las áreas cerebrales; de hecho si calculamos los valores de R darían cifras en torno a 1, indicando que estamos ante un regulación a la baja del receptor con la consiguiente bajada proporcional en la funcionalidad.

Resultados

Tabla 9. Estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS (% de la fijación basal, 100%) inducida por el agonista selectivo del receptor CB₁ WIN 55212-2 (10 μM) en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días). *R* representa la ratio funcionalidad/densidad (“señalización neta”) expresada con relación al valor de referencia 1 del grupo de animales control (CO)

AREAS CEREBRALES	CO	COF	% cambio vs CO	R	OB	% cambio vs CO	R	OBF	% cambio vs OB	% cambio vs CO	R
Corteza Cerebral											
Corteza FP externa	108,7 ± 12,8	109,8 ± 15,3	1,0		228,6 ± 31,1**	110,3	2,8	234,0 ± 6,4**	2,4	115,3	2,7
Corteza FP interna	117,5 ± 8,34	112,4 ± 18,1	-4,3		254,1 ± 12,3***	116,3	2,6	239,7 ± 14,6***	-5,7	104,0	1,7
Corteza cingular	144,6 ± 9,8	165,0 ± 26,9	14,1		263,4 ± 25,8**	82,2	1,2	292,9 ± 13,7***	11,2	102,6	1,0
Corteza entorrinal	165,2 ± 24,1	144,3 ± 13,1	-12,7		302,5 ± 40,8***	83,1	2,6	203,4 ± 18,***	-32,8	23,1	1,2
Ganglios basales											
Caudado putamen	151,5 ± 6,4	140,4 ± 19,2	-7,3		498,4 ± 26,3***	229,0	3,7	439,4 ± 27,8***	-11,8	190,0	3,7
Nucleos septales											
Núcleo septal latero-dorsal	145,5 ± 14,3	118,7 ± 15,1	-18,4		349,1 ± 42,1***	139,9	4,4	265,8 ± 16,0***	-23,9	82,7	2,7
Núcleo septal latero-ventral	162,5 ± 10,7	125,3 ± 13,0	-22,9		260,4 ± 28,1**	60,2	2,5	225,1 ± 21,3	-13,6	38,5	
Hipocampo											
CA1 CA2	109,0 ± 8,0	108,5 ± 6,1	-0,5		264,5 ± 19,5***	142,7	2,7	279,3 ± 25,4***	5,6	156,2	2,6
Giro Dentado	129,4 ± 6,4	129,3 ± 4,5	-0,1		260,6 ± 24,0***	101,4	3,2	297,6 ± 17,4***	14,2	130,0	2,2
Hipotálamo											
Núcleos dorsomediales	112,4 ± 12,1	83,1 ± 9,6	-26,1		189,4 ± 28,0**	68,5	2,5	153,0 ± 14,0	-19,2	36,1	
Núcleos ventromediales	155,8 ± 22,4	107,0 ± 5,2*	-31,3	0,8	169,7 ± 21,9	8,9		178,7 ± 21,9	5,3	14,7	
Amígdala											
Núcleos basolaterales	149,1 ± 20,3	104,2 ± 7,9	-30,1		263,1 ± 41,6**	76,5	2,5	227,8 ± 15,1	-13,4	52,8	1,5
Tronco del encéfalo											
Sustancia negra	251,9 ± 22,9	232,9 ± 10,4	-7,5		450,4 ± 24,8***	78,8	2,4	482,1 ± 47,9***	7,0	91,4	2,8
Sustancia gris periacueductal	131,7 ± 11,4	111,7 ± 8,0	-15,2		160,4 ± 8,1	21,8		149,4 ± 9,0	-6,9	13,4	
Rafe dorsal	124,7 ± 12,3	114,7 ± 12,0	-8,0		144,5 ± 11,4	15,9		142,2 ± 6,9	-1,6	14,0	
Rafe mediano	114,6 ± 6,4	133,8 ± 17,0	16,8		143,0 ± 12,7	24,8		156,1 ± 7,4	9,2	36,2	
Rafe magnus	117,7 ± 7,7	134,4 ± 17,4	14,2		175,4 ± 23,0**	49,0	1,7	176,3 ± 7,9**	0,5	49,8	1,3
Núcleo parabraquial dorsal	117,4 ± 3,6	98,8 ± 18,4	-15,8		117,9 ± 7,9	0,4		116,5 ± 6,2	-1,2	-0,8	
Núcleo parabraquial ventral	107,2 ± 6,0	108,6 ± 10,9	1,3		148,1 ± 3,5*	38,2	1,9	132,3 ± 16,5	-10,7	23,4	

Los datos representan las medias ± E.E.M. **p<0,01, ***p<0,001 versus animales control (CO). ⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,01 versus animales bulbectomizados no tratados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

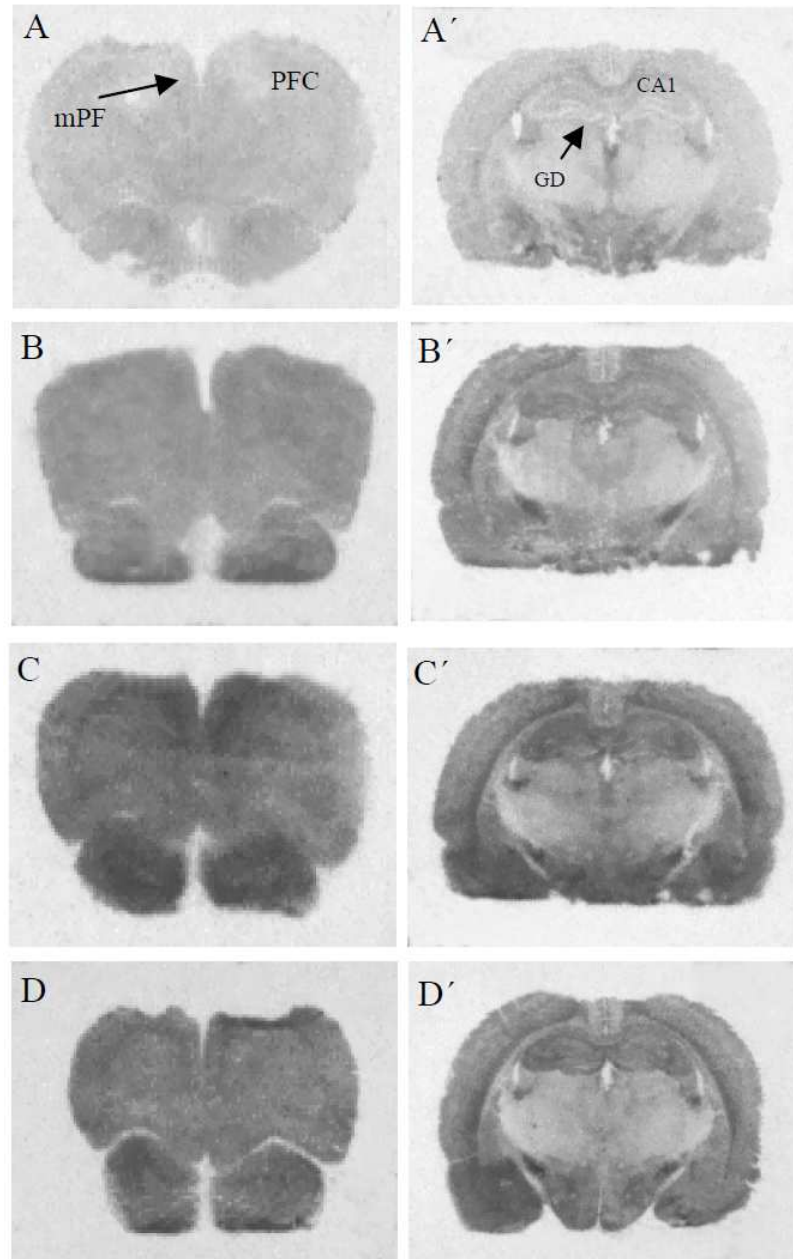


Figura 20. Autorradiograma representativo de la estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γ S por el agonista WIN 55212-2 (10 μM) en el cerebro de animales control y bulbectomizados, y efecto del tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días) a nivel de la corteza frontal y del hipocampo anterior. A y A' son secciones representativas de la fijación basal de [^{35}S]GTP γ S; B y B', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S en animales control (CO); C y C', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S en animales bulbectomizados (OB); D y D', representan la fijación estimulada de [^{35}S]GTP γ S en animales bulbectomizados y tratados con fluoxetina (OBF). mPF, corteza prefrontal medial; PFC, corteza prefrontal, CA1, lámina CA1 del hipocampo; DG, giro dentado del hipocampo.

4. Estudios fijación de radioligandos en homogenizados de membranas de corteza prefrontal

En la sección anterior hemos visto como la bulbectomía olfatoria induce un incremento en la funcionalidad del receptor CB₁ en áreas del telencéfalo (corteza, hipocampo, septo), diencefalo (hipotálamo) y prosencefalo (tronco cerebral), de menor o mayor magnitud y significación estadística. Además, los resultados obtenidos en una serie de experimentos autorradiográficos preliminares apuntaban a que en los niveles más anteriores de la corteza frontal (i.e. corteza prefrontal) la densidad y funcionalidad del receptor CB₁ aparecían incrementadas de forma importante tras la bulbectomía olfatoria: la densidad autorradiográfica del receptor CB₁ en la corteza prefrontal media estaba aumentada (+29%) tras la bulbectomía (37,95±1,83 vs. 28,95±2,61 fmol/mgr tejido en animales control; *p*= 0,02). Además, esta regulación a la alta en esta área cerebral iba asociada a un incremento en la fijación de [³⁵S]GTPγS inducida por el agonista selectivo del receptor CB₁ WIN 55212-2 (+40%; 190,07±17.78 vs. 140.25±10.15% de la fijación basal en animales bulbectomizados y control, respectivamente; *p*= 0,02). Estos hallazgos indicativos de una mayor señalización vía receptor CB₁ en la corteza prefrontal y las recientes evidencias en la literatura sobre similares alteraciones en la depresión, nos llevaron a plantear una serie de ensayos en homogenizados de corteza prefrontal de rata, que son los que a continuación describimos, destinados a analizar los posibles cambios en la densidad y funcionalidad del receptor CB₁ inducidos por la bulbectomía, y su modulación tras el tratamiento crónico con fluoxetina en la corteza prefrontal.

4.1. Fijación de [³H]-CP55,940 a receptores CB₁ en membranas de corteza prefrontal

La fijación de [³H]-CP55,940 (0,0125–3,2 nM) en membranas de corteza prefrontal demostró ser saturable (B_{max} en animales control de 639,4 ± 21,1 fmol/mgr proteína), a un solo sitio de fijación, de alta afinidad (valores de K_d por debajo de 1 nM), y con un nivel de fijación no-específica de menos del 20% de la fijación total. El

análisis ANOVA de dos vías para los datos de Bmax del receptor CB₁ reveló que la mayor fuente de variación correspondió a la variable tratamiento [F (1,24)= 5.69, $p=0.02$] y a la interacción cirugía/tratamiento [F (1,24) =25.98, $p<0.0001$].

Como se muestra en la figura 21, los animales bulbectomizados presentan un incremento significativo (+40%) en la densidad máxima del receptor CB₁ en corteza prefrontal (Bmax= 891,3 ± 54,2 fmol/mgr proteína) en comparación con los animales control ($p < 0.001$). Esta regulación a la alta desaparece en los animales bulbectomizados y tratados crónicamente con fluoxetina, observándose un valor medio de Bmax similar al del grupo de animales control (Bmax= 615,4 ± 38,4 fmol/mg. proteína; $p < 0.001$ vs. animales bulbectomizados sin tratamiento). Por el contrario, el tratamiento crónico con fluoxetina no indujo cambio alguno en la Bmax del receptor CB₁ en el grupo de animales control (Bmax= 739,0 ± 26,6 fmol/mgr proteína).

El análisis estadístico de la comparación entre los valores de afinidad del receptor CB₁ (K_d) en los cuatro grupos experimentales no reveló diferencias significativas debidas a la cirugía y/o tratamiento (K_d en animales control: 0,14 ± 0,02 nM; control-fluoxetina: 0,22 ± 0,03 nM; bulbectomizados: 0,21 ± 0,04 nM; y bulbectomizados-fluoxetina: 0,14 ± 0,03 nM).

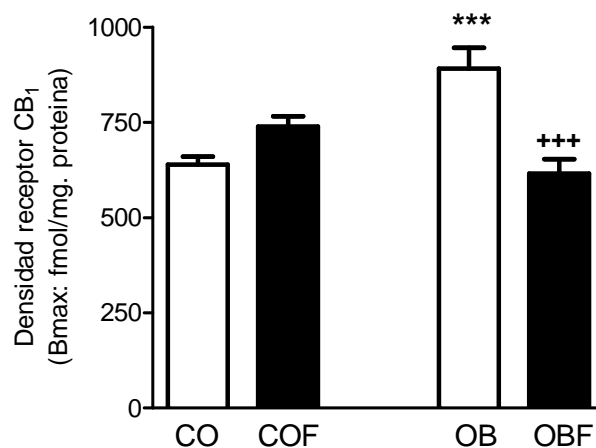


Figura 21. Efecto de la bulbectomía olfatoria y el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días) sobre la densidad máxima (Bmax) del receptor CB₁ medida como la fijación de [³H]-CP55,940 en membranas de corteza prefrontal. Media ± E.E.M. de n valores individuales (CO= 6-7; COF=7-8; OB= 6; OBF= 7-8). *** $p < 0.001$ OB vs. CO y *** $p < 0.001$ OBF versus OB (ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls como *post hoc* test).

4.2. Estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 en membranas de corteza prefrontal

El agonista del receptor CB₁ WIN 55,212-2 estimuló de forma concentración dependiente la fijación de [³⁵S]GTPγS en membranas de corteza prefrontal en el grupo de animales control con valores de eficacia máxima (E_{max}) de 300,9 ± 21,7% de la fijación basal y con una potencia en el rango micromolar (pEC₅₀) de 6,0 ± 0.1 (figura 22).

El análisis ANOVA de dos vías demostró una fuente de variación muy importante tanto en el tratamiento [$F(1,23)=15.04, p= 0.001$], como en la cirugía [$F(1,23)=6.17, p= 0.02$] [ANOVA cirugía: $F=43.73, p<0.001$], además de una interacción significativa entre ambas variables [$F(1,23)=5.41, p= 0.03$] en el parámetro de eficacia máxima (E_{max}) del agonista WIN 55,212-2 para estimular la fijación de [³⁵S]GTPγS. El análisis *post hoc* Newman-Keuls demostró un incremento significativo en la E_{max} en el grupo de animales bulbectomizados (+ 28%) en comparación con el grupo de animales control (E_{max}= 383,4 ± 22,5% vs. 300,9 ± 21,7% de la fijación basal, respectivamente; $p < 0.05$).

Además, al igual que lo observado en los estudios de fijación de [³H]-CP55,940 en membranas de corteza prefrontal, el tratamiento crónico con fluoxetina revirtió este incremento en la eficacia máxima de la estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por WIN 55,212-2 observado en los animales bulbectomizados, alcanzándose un valor medio de eficacia máxima similar al del grupo de animales control (E_{max}= 277,7 ± 11,9 de la fijación basal; $p < 0.01$ vs. animales bulbectomizados sin tratamiento). Por el contrario, el tratamiento crónico con fluoxetina no produjo efecto alguno en los animales control (E_{max} = 274,3 ± 10,4% de la fijación basal) (fig 22).

El análisis estadístico de la comparación entre los valores de pEC₅₀ (potencia) de los cuatro grupos experimentales no reveló diferencias significativas debidas a la cirugía y/o tratamiento (pEC₅₀: control: 6,0 ± 0,1; animales control-fluoxetina: 6,1 ± 0,1; bulbectomizados: 5,9 ± 0,2; y bulbectomizados-fluoxetina: 6,0 ± 0,1).

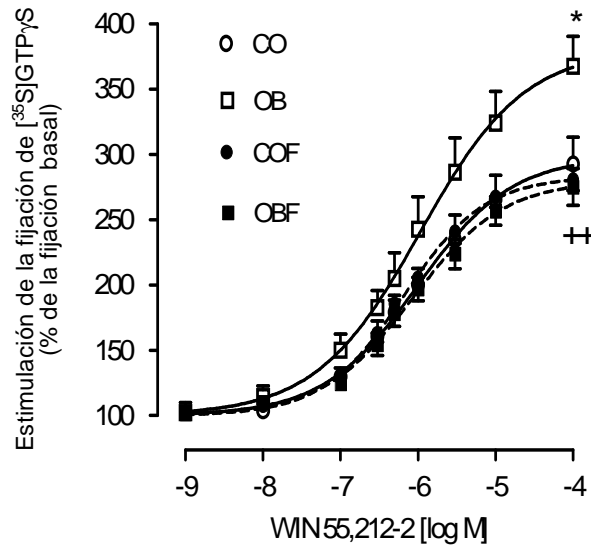


Figura 22. Efecto de la bulbectomía olfatoria y el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días) sobre la estimulación de la fijación de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ por el agonista CB_1 WIN 55212-2 en membranas de corteza prefrontal. Los datos representados son las medias \pm E.E.M. de n valores individuales obtenidos en experimentos realizados por triplicado (CO= 6-7; COF=7-8; OB= 6; OBF= 7-8). * $p < 0.05$ OB vs. CO y ** $p < 0.01$ OBF vs. OB (ANOVA de dos vías seguido de Newman-Keuls como *post hoc* test).

5. Estudios de la expresión de marcadores moleculares relacionados con plasticidad neuronal y neurogénesis

5.1. Estudios de hibridación *in situ* (HIS)

Mediante esta técnica se procedió al marcaje del material genético codificante (ARNm) para las proteínas BDNF y TrkB con la finalidad de valorar su expresión (cuantificación semicuantitativa) en diversas áreas y núcleos del cerebro de animales control/bulbectomizados y su modulación tras la administración crónica de fluoxetina.

5.1.1. Hibridación in situ de BDNF

Corteza cerebral

Se observó un descenso (regulación a la baja) en la expresión del ARNm para el BDNF en la corteza prefrontal de los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (-21%; $q=3.687$, $p<0.05$), que desapareció tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=5.650$, $p<0.01$), alcanzándose niveles de expresión similares a los observados en los animales control ($q=1.962$, $p>0.05$).

El tratamiento crónico con fluoxetina en animales control no produjo cambio alguno en los niveles de expresión del ARNm para el BDNF ($p>0.05$). El análisis estadístico con el ANOVA de dos vías no reveló ninguna fuente de variación sobresaliente (tabla 10; fig. 23).

Hipocampo

Se observó un descenso significativo en la expresión del ARNm para el BDNF en las regiones CA₁ y CA₂ del hipocampo de los animales bulbectomizados (-25%; $q=3.684$, $p<0.05$ vs. animales control), que desapareció tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=5.564$, $p<0.01$) y alcanzó niveles similares a los mostrados por los animales control ($p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina en los animales control no produjo ningún efecto ($p>0.05$) sobre la expresión del ARNm para el BDNF. El análisis estadístico con el ANOVA de dos vías no reveló ninguna fuente de variación sobresaliente. En el resto de regiones del hipocampo, la capa CA₃ y el giro dentado, se observó una tendencia a una mayor expresión del ARNm para el BDNF tras la bulbectomía (+23% y +41%, respectivamente), que se mantiene tras el tratamiento crónico con fluoxetina, pero incrementos que resultaron no ser significativos (tabla 10; fig. 24).

Tabla 10. Unidades densitométricas semicuantitativas correspondientes al marcaje de material genético codificante (ARNm) para el BDNF en el cerebro de la rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

Áreas cerebrales	Grupos experimentales			
	CO	COF	OB	OBF
Corteza Cerebral				
Corteza prefrontal	13,66 ± 0,93	13,68 ± 0,95	10,95 ± 1,03*	14,12 ± 1,76⁺⁺
Hipocampo				
CA1 CA2	16,48 ± 2,03	16,48 ± 1,23	11,75 ± 2,01*	18,12 ± 2,42⁺⁺
CA3	22,0 ± 2,16	21,86 ± 5,07	26,74 ± 4,62	32,12 ± 5,18
Giro Dentado	17,38 ± 1,26	18,37 ± 3,10	24,15 ± 4,81	23,91 ± 2,54

Los datos representan las medias ± E.E.M. * $p < 0.05$ vs. animales control (CO). ⁺⁺ $p < 0.01$ vs. animales bulbectomizados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8, COF=6-8, OB=6-8, OBF=6-8).

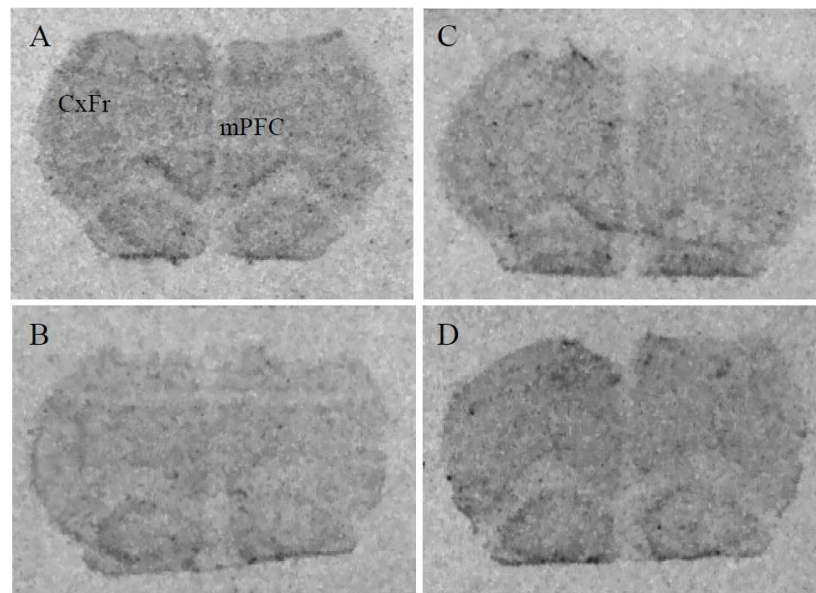


Figura 23. Imagen representativa de la expresión del ARNm (hibridación “in situ”) para el BDNF a nivel de la corteza prefrontal en el cerebro de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). A), control; B) bulbectomizados; C) control+ fluoxetina; D) bulbectomizados+fluoxetina. CxF, corteza frontal; mPFC, corteza prefrontal medial.

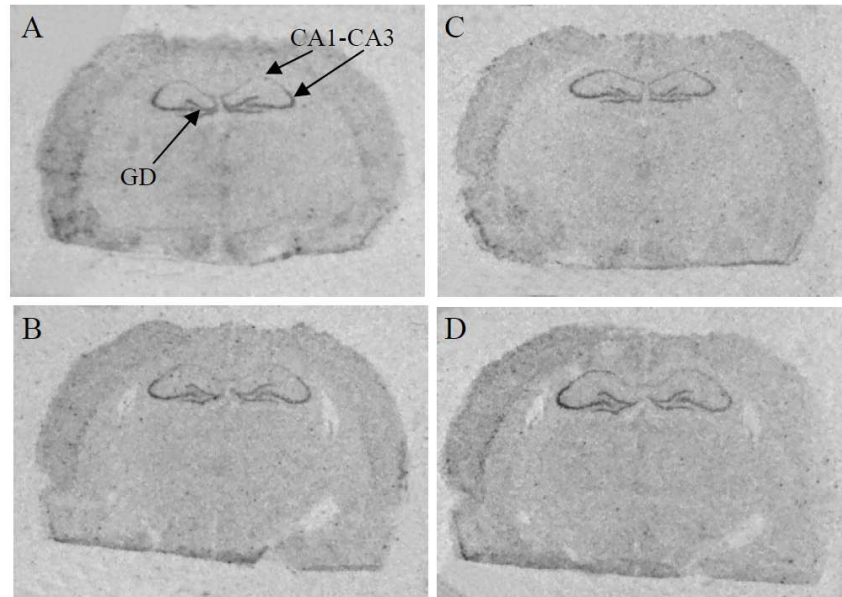


Figura 24. Imagen representativa de la expresión del ARNm (hibridación “in situ”) para el BDNF a nivel del hipocampo anterior en el cerebro de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). A), control; B) bulbectomizado; C) control+fluoxetina; D) bulbectomizado+fluoxetina. GD. Giro dentado; CA1-CA3, láminas CA1 y CA3 del hipocampo.

5.1.2. Hibridación in situ del receptor *TrkB* para BDNF

Corteza cerebral

A nivel de la corteza prefrontal se cuantificó un descenso en la expresión del ARNm para *TrkB* en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (-52%; $q=8.565$, $p<0.001$), que se revirtió tras el tratamiento crónico con fluoxetina ($q=4.264$, $p<0.05$) aunque parcialmente (50%), pues no llegó a los valores de expresión como los encontrados en los animales control (-25% del control; $q=4.301$, $p<0.01$).

Asimismo, el tratamiento crónico con fluoxetina en los animales control produjo un descenso significativo en los niveles de expresión de ARNm para *TrkB* (-38%; $q=6.334$, $p<0.001$). El análisis estadístico con el ANOVA de dos vías reveló que las mayores fuentes de variación fueron la interacción [ANOVA interacción:

$F(3,13)=16.81$, $p<0.01$] y cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,13)=6.385$, $p<0.05$] (tabla 11; fig. 25).

Hipocampo

No se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión del ARNm para TrkB en las regiones del hipocampo analizadas, aunque para el giro dentado se observó una cierta disminución en su expresión tras la bulbectomía (-24%) con respecto a los valores de expresión observados en los animales control, que parece normalizarse tras el tratamiento crónico con fluoxetina (tabla 11; fig. 25).

Tabla 11. Unidades densitométricas semicuantitativas) correspondientes al marcaje de material genético codificante (ARNm) para TrkB en el cerebro de rata control/ bulbectomizada y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días)

Áreas cerebrales	Grupos experimentales			
	CO	COF	OB	OBF
Corteza Cerebral				
Corteza prefrontal	13,83 ± 2,18	8,53 ± 4,00**	6,66 ± 0,97***	10,23 ± 1,10⁺**
Hipocampo				
CA1 CA2	28,38 ± 3,04	29,20 ± 3,94	34,68 ± 5,88	27,66 ± 3,92
CA3	29,30 ± 4,14	30,30 ± 3,62	26,52 ± 5,06	35,35 ± 4,81
Giro Dentado	33,03 ± 1,76	35,17 ± 6,03	24,67 ± 5,19	32,34 ± 4,28

Los datos representan las medias ± E.E.M. ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ vs. animales control (CO). ⁺ $p<0.05$ vs. animales bulbectomizados (OB). ANOVA de dos vías seguido de análisis *post hoc* de Newman-Keuls (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

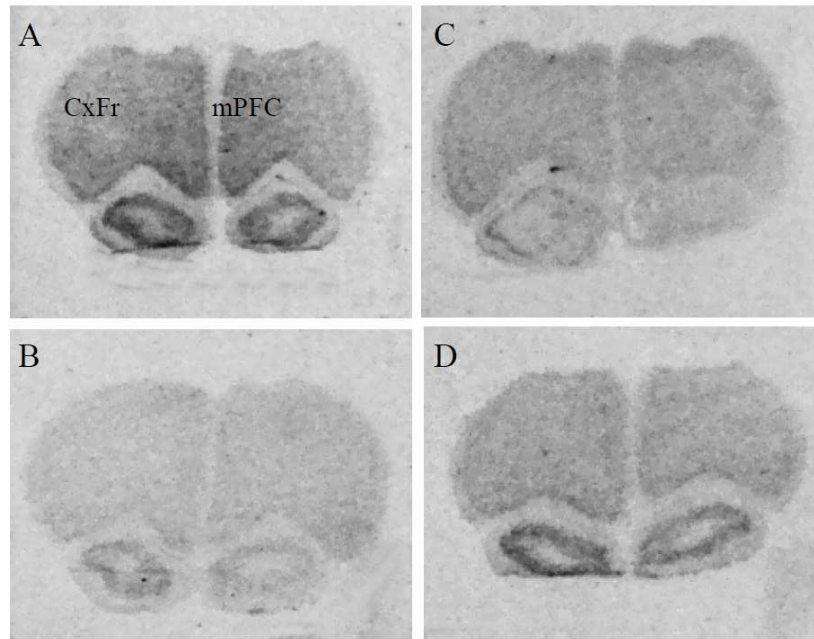


Figura 25. Imagen representativa de la expresión del ARNm (hibridación “in situ”) para el receptor TrkB a nivel de la corteza prefrontal en el cerebro de animales control/bulboectomizados no tratados, y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). A), control; B) bulboectomizados; C) control+ fluoxetina; D) bulboectomizados+fluoxetina. CxF, corteza frontal; mPFC, corteza prefrontal medial.

5.2. Estudio del curso temporal de la expresión de marcadores moleculares implicados en plasticidad neuronal y neurogénesis hipocampal en la rata bulboectomizada mediante técnicas de western-blot

Una vez sacrificados los animales a diferentes tiempos postcirugía (30, 45 y 90 días), obtenidas y procesadas las muestras cerebrales (hipocampo), se analizó y cuantificó el nivel de expresión de diversos elementos intracelulares reguladores de la neurogénesis hipocampal en la rata que están implicados en neuroplasticidad y supervivencia neuronal (AKT, ERK/pERK, CREB/pCREB, TrkB así la cascada de señalización de Wnt/ β -catenina).

5.2.1. AKT

Como se observa (fig. 26), el nivel de expresión de AKT en el hipocampo (medido como el porcentaje de densidad óptica relativa) a los 30 días de la operación disminuye con relación al valor del grupo control ($60,1 \pm 17,3\%$; $q=5.546$, $p<0.01$). A los 45 días la expresión de AKT sigue siendo menor que en los animales control ($70,3 \pm 10,4\%$ $q=4.115$, $p<0.05$), si bien ha aumentado con respecto a los animales bulbectomizados de 30 días. Tras 90 días de la operación el porcentaje de densidad óptica relativa del marcaje de AKT aumenta hasta alcanzar unos valores equivalentes a los mostrados por los animales control ($96,5 \pm 5,5\%$; $q=0.8182$, $p>0.05$).

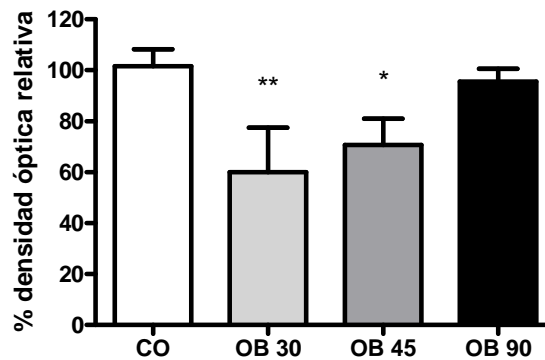


Figura 26. Gráfica representativa del curso temporal de la expresión de AKT (a los 30, 45 y 90 días postbulbectomía) en el hipocampo de animales control (CO) y bulbectomizados (OB) y medida como porcentaje de densidad óptica relativa. Los valores densitométricos están normalizados respecto a la proteína GAPDH. Los datos representan las medias \pm E.E.M * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs. animales control (CO) (test ANOVA 1 vía) (CO=14,OB30=6,OB45=8,OB90=6).

5.2.2. Receptor TrkB

En cuanto a la expresión de la subunidad de 90 Kda de TrkB en el hipocampo, vemos como a los 30 días de la operación no hay cambios significativos en comparación con la expresión en los animales control ($p>0.05$). A los 45 días postbulbectomía, el nivel de expresión de TrkB continúa en unos valores muy similares al de los animales control ($p>0.05$) y, no es hasta los 90 días cuando se aprecia un

aumento significativo con respecto a los animales control (+37%; $q=4.024$, $p<0.05$) (fig. 27).

En la gráfica correspondiente a la subunidad de 110 Kda, vemos como el curso temporal de la expresión es similar a lo descrito para la otra subunidad: ligero descenso a los 30 días postcirugía no significativo ($p>0.05$), que se acentúa transcurridos 15 días más ($q=2.738$, $p>0.05$). Es a los 90 días postcirugía cuando esa tendencia desaparece e incluso el nivel de expresión parece situarse por encima de los valores control (+28%; $q=2.266$, $p>0.05$), aunque sin alcanzar significación estadística.

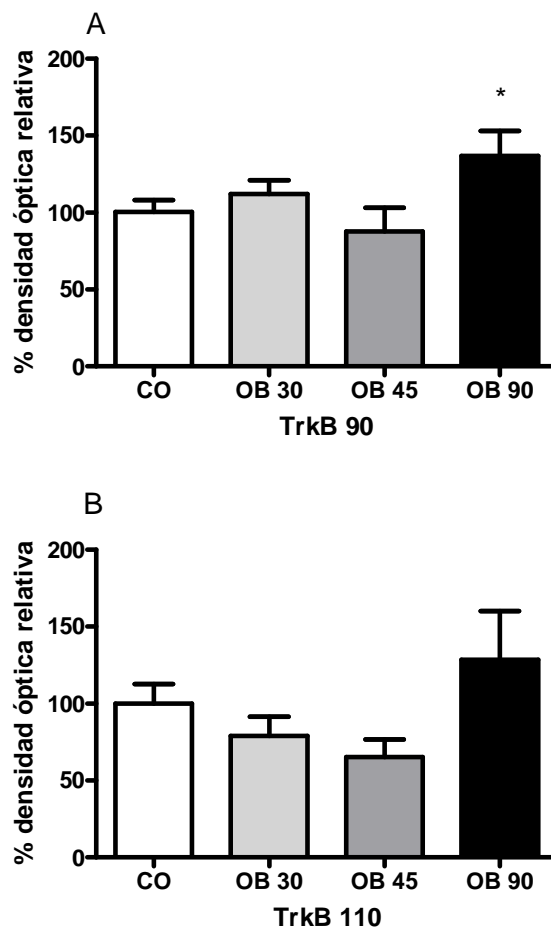


Figura 27. Gráfica representando el curso temporal de la expresión de las dos subunidades de la TrkB, 90 Kda (A) y 110 Kda (B) en el hipocampo de animales control (CO) y bulbectomizados (OB). Los datos representan las medias \pm E.E.M. * $p < 0.05$ vs. animales control (CO=14,OB30=6,OB45=8,OB90=6).

5.2.3 ERK/pERK

Con relación a la expresión de esta quinasa en el homogeneizado de hipocampo de los animales bulbectomizados, podemos ver como la expresión de ERK a los 30 días de la operación es diferente de la observada en los animales control ($p>0.05$). Tras 45 días de la operación, los niveles de expresión siguen siendo similares a los de los animales control ($q=1.741$, $p>0.05$). Ya en el día 90 postcirugía los niveles detectados superaron a los encontrados en el grupo de animales control (+27%; $q=3.822$, $p<0.01$) (fig. 28)

Los datos analizados muestran también que tras 30 días de operación existe una disminución en la expresión de la forma activa de ERK (pERK) con respecto a los animales control ($q=4.199$, $p<0.05$). En el día 45 postcirugía, dicha disminución revierte totalmente hasta unos valores equivalentes a los de los animales control ($p>0.05$). A los 3 meses de la operación, el porcentaje de densidad óptica aumenta drásticamente comparativamente a los animales control (+27%; $q=8.352$, $p<0.001$).

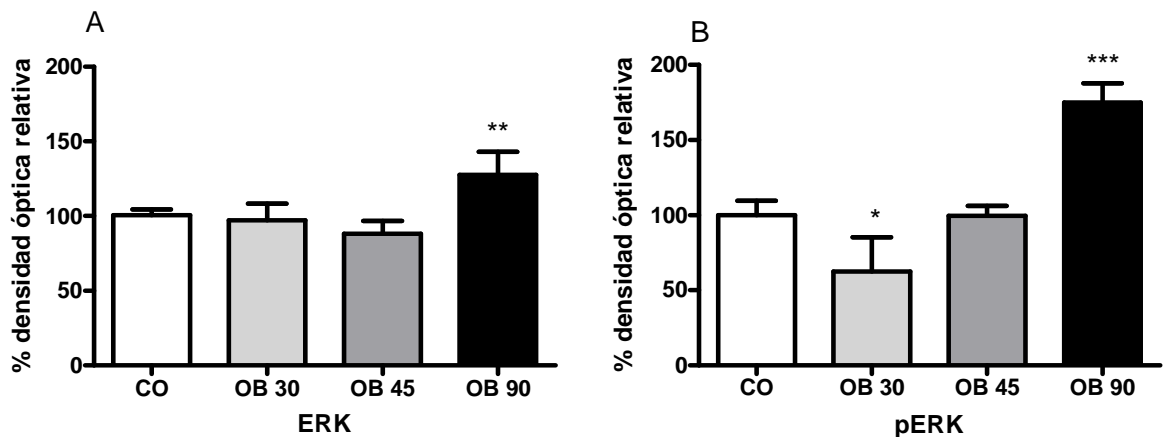


Figura 28. Gráficas representando el curso temporal de la expresión (porcentajes de densidad óptica relativa) de ERK (A) y pERK (B) en hipocampo de animales control (CO) y bulbectomizados (OB). Los datos representan las medias \pm E.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs. animales control (test ANOVA 1 vía) (CO=14,OB30=6,OB45=8,OB90=6).

5.2.4 CREB/pCREB

Los datos analizados muestran que tras 30 días de operación no existe variación en la expresión de CREB con respecto a los animales control ($p>0.05$). En el día 45 postcirugía continúa sin haber variaciones entre ambos grupos de animales ($p>0.05$). Tras 90 días de la operación los valores siguen siendo equivalentes entre animales bulbectomizados y control ($p>0.05$) (fig. 29).

Por su parte, con relación a la expresión de la forma activa de CREB (pCREB), observamos que tras 30 días de operación existe una drástica disminución en su expresión con respecto a los animales control (-48%; $q=5.384$, $p<0.001$). En el día 45 postcirugía, la disminución en el porcentaje continúa, si bien menos acusada que en el día 30 (-37%; $q=4.166$, $p<0.01$). En el día 90 tras la operación el porcentaje de los animales bulbectomizados se equipara con el de los animales control ($q=0.832$, $p>0.05$).

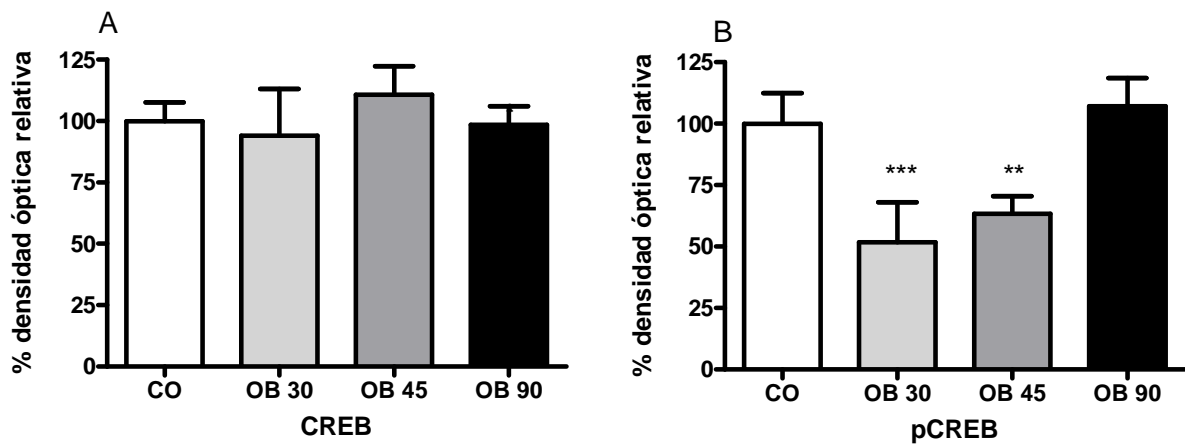


Figura 29. Gráfica representando el curso temporal de la expresión de CREB (A) y pCREB (B) en el hipocampo de animales control (CO) y bulbectomizados (OB). Los datos representan las medias \pm E.E.M. . ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ vs. animales control (test ANOVA 1 vía) (CO=14,OB30=6,OB45=8,OB90=6).

5.2.5 β -catenina

Como se observa, el porcentaje de densidad óptica indica que la expresión de β -catenina disminuye drásticamente a los 30 días de la operación (-40%; $q=6.930$, $p<0.001$). A los 45 días su expresión sigue siendo menor que en los animales control (-30%; $q=5.358$, $p<0.01$). Tras 90 días de la operación, la expresión de β -catenina hipocampal aumenta hasta alcanzar unos valores equivalentes a los mostrados por los animales control ($q=0.6350$, $p>0.05$) (fig. 30).

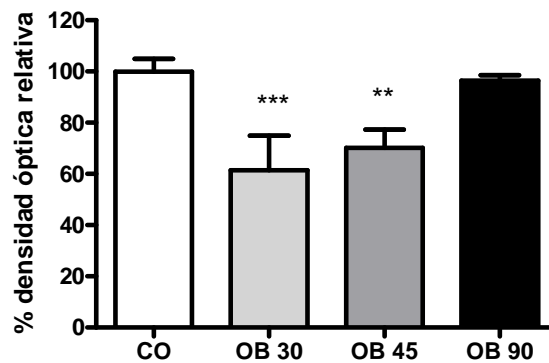


Figura 30. Gráfica representando el curso temporal de la expresión de β -catenina en el hipocampo de animales control (CO) y bulbectomizados (OB). Los datos representan las medias \pm E.E.M. *** $p<0.001$ y ** $p<0.01$ vs. animales control (test ANOVA 1 vía) (CO=14,OB30=6,OB45=8,OB90=6).

5.3. Estudios de expresión de proteínas implicadas en plasticidad neuronal y neurogénesis hipocampal por técnicas de western-blot: efecto de la bulbectomía olfatoria y del tratamiento crónico con fluoxetina

5.3.1 AKT

Como puede apreciarse en la figura 31, hay una tendencia, aunque no significativa, a la disminución en el nivel de expresión de AKT en el hipocampo de las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (-40%; $q=1.603$, $p>0.05$). El

tratamiento crónico con fluoxetina en los animales bulbectomizados induce un espectacular incremento en la expresión de AKT con relación a los no tratados (+186%; $q=4.488$, $p<0.05$) que supera los valores observados en las ratas control indicando una tendencia al aumento (+72%; $q=2.886$, $p>0.05$). En animales control, el tratamiento crónico con fluoxetina también provoca un claro aumento en comparación con los animales no tratados (+112%; $q=4.471$, $p<0.05$). El análisis de ANOVA de dos vías reveló que la mayor fuente de variación correspondió a la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,22)=15.50$, $p<0.001$].

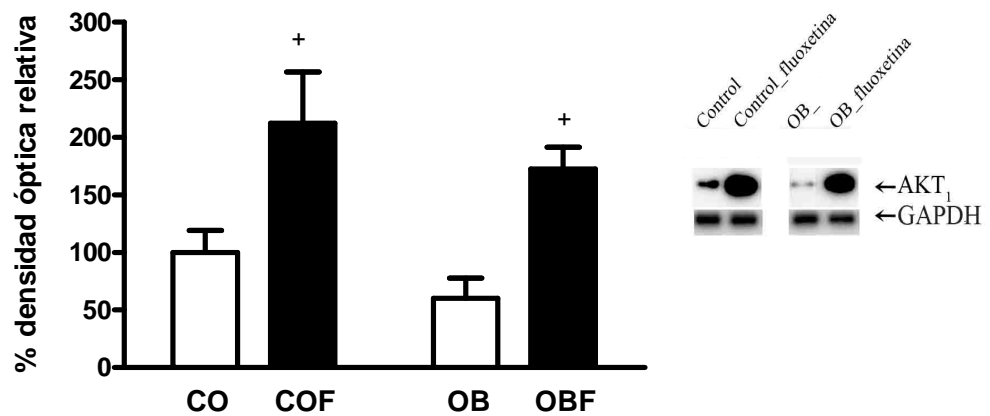


Figura 31. Gráfica y western representativos de la expresión de AKT a nivel del hipocampo de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.) Los datos representan las medias \pm E.E.M. . $^+p<0.05$ vs. animales control/bulbectomizados no tratados (test ANOVA 2 vías tras análisis *post hoc* de Newman-Keuls) (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

5.3.2 Receptor *TrkB*

No se observaron diferencias significativa entre los animales control y los bulbectomizados no tratados ($p>0.05$) en la expresión de la subunidad 90 Kda de *TrkB*. El tratamiento crónico con fluoxetina tampoco provocó ningún cambio significativo en los niveles de expresión de *TrkB* 90 kDa ni en los animales control ($p>0.05$) ni en los animales bulbectomizados ($p>0.05$) (fig. 32).

Los datos analizados sobre la expresión de la subunidad TrkB 110 Kda muestran una ligera tendencia hacia el descenso (-26%) en su expresión en el hipocampo de los animales bulbectomizados con respecto a los animales control, pero que resultó ser no significativa ($p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina tampoco provoca ningún cambio ni en los animales control ($p>0.05$) ni en los animales bulbectomizados ($p>0.05$).

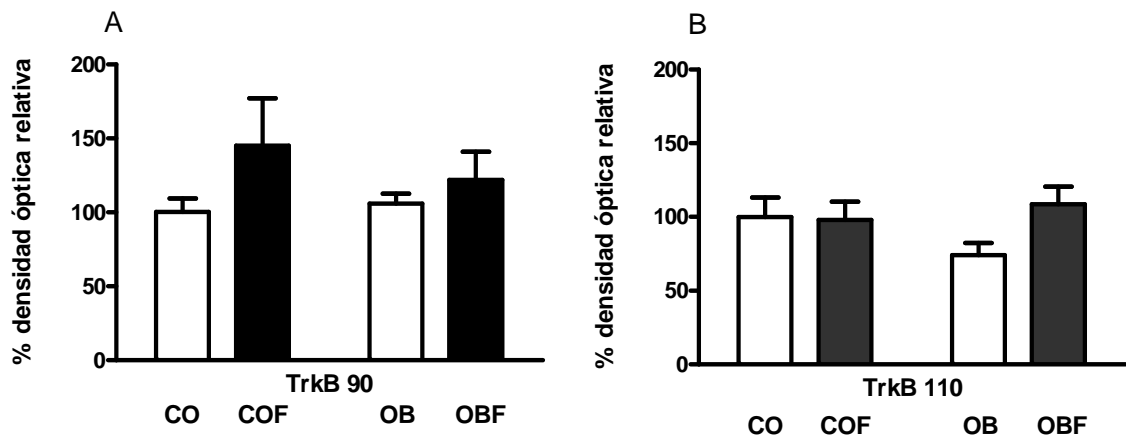


Figura 32. Gráfica representando la expresión de las subunidades TrkB 90 Kda (A) y TrkB 110 Kda (B) en el hipocampo de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

5.3.3 ERK/pERK

Los datos analizados no muestran diferencia alguna en la expresión de ERK en el hipocampo entre los animales control y los bulbectomizados no tratados con el antidepresivo ($p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina tampoco provoca ningún cambio, ni en los animales control ($p>0.05$) ni en los animales bulbectomizados, ($p>0.05$) sobre la expresión de ERK en el hipocampo. Tampoco se encontraron diferencias en la expresión de pERK entre los animales control y los bulbectomizados ($p>0.05$), aunque sí parece haber una cierta tendencia hacia la disminución en el hipocampo de los animales bulbectomizados. Sin embargo, el tratamiento crónico con

fluoxetina indujo cambios significativos tanto en los animales control como los bulbectomizados. En efecto, se observó un aumento en la expresión de pERK en el hipocampo de animales bulbectomizados tratados con fluoxetina (+ 100%; $q=5.421$, $p<0.01$), alcanzando valores similares a los de los animales control ($q=2.728$, $p>0.05$). Además, el tratamiento crónico con fluoxetina en los animales control también produjo un aumento, aunque menor que en el caso anterior, en la expresión de pERK en el hipocampo en comparación con los animales control (+63%; $q=4.791$, $p<0.01$). El análisis ANOVA de dos vías reveló que las mayores fuentes de variación se debieron a la variable tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,22)=22.09$, $p<0.001$] y a la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,22)=4.6$, $p<0.05$] (fig. 33).

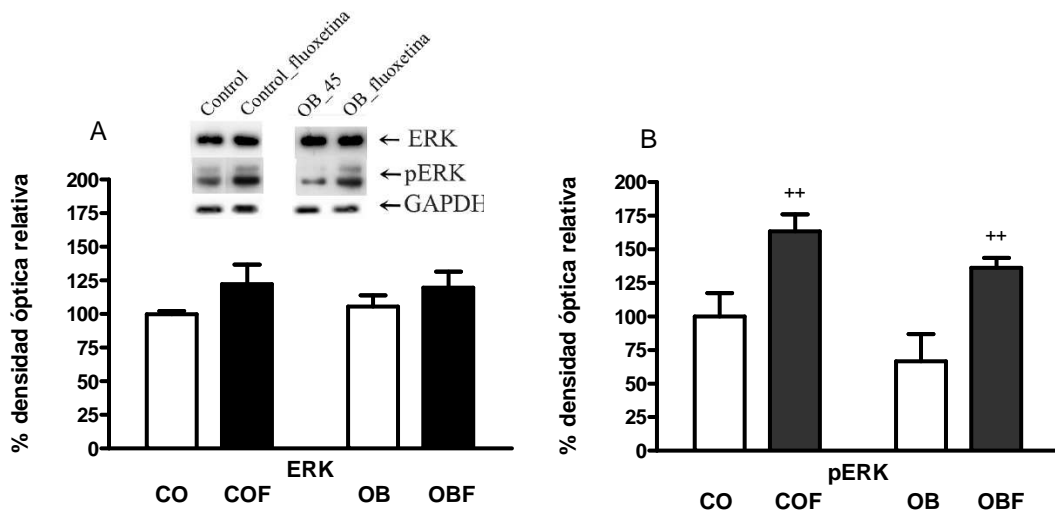


Figura 33. Gráfica representando la expresión de ERK (A) y pERK (B) en el hipocampo de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). Los datos representan las medias \pm E.E.M. $^{**}p < 0.01$ vs. animales control/bulbectomizados no tratados (test ANOVA 2 vías tras análisis *post hoc* de Newman-Keuls) (CO=6-8, COF=6-8, OB=6-8, OBF=6-8).

5.3.4 CREB/pCREB

Los datos analizados no muestran diferencia alguna en la expresión de CREB en el hipocampo entre los animales control y los bulbectomizados no tratados ($p>0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina tampoco provoca ningún cambio significativo ni en los animales control ($p>0.05$) ni en los animales bulbectomizados ($p>0.05$). Tampoco se ven diferencias significativas en la expresión de pCREB en el hipocampo entre los

animales control y los bulbectomizados no tratados ($p>0.05$). Además, de nuevo, el tratamiento crónico con fluoxetina tampoco provoca ningún cambio ni en los animales control ($p>0.05$) ni en los animales bulbectomizados ($p>0.05$) sobre los niveles de expresión de pCREB hipocampales (fig. 34).

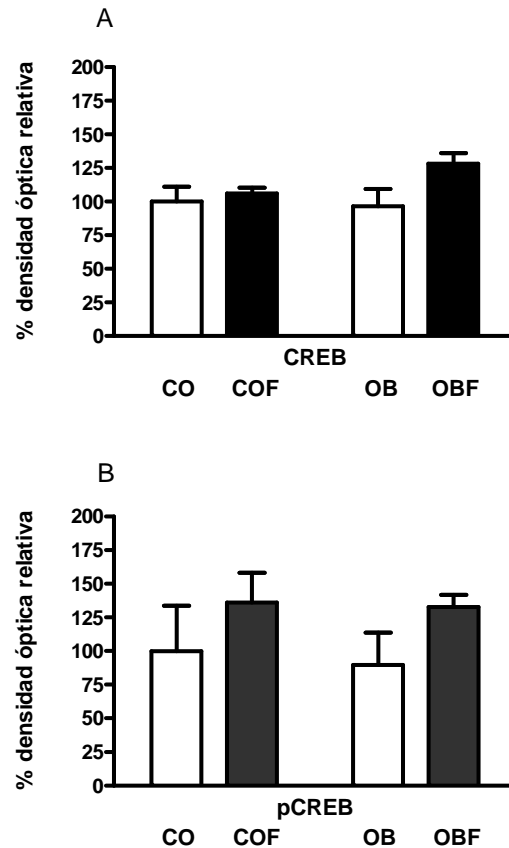


Figura 34. Gráfica representando la expresión de CREB (A) y pCREB (B) en el hipocampo de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). Los datos representan las medias \pm E.E.M. (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

5.3.5 β -catenina

Nuestros resultados demuestran un descenso significativo, casi a la mitad, en el nivel de expresión de la proteína intracelular β -catenina en el hipocampo de las ratas bulbectomizadas con respecto a las ratas control (-42%; $q=3.840$, $p<0.05$). El tratamiento crónico con fluoxetina en estos animales provoca un aumento (+86% del

valor observado en los bulbectomizados no tratados; $q=4.641$, $p<0.01$), recuperándose la expresión de β -catenina hasta valores similares a los encontrados en el hipocampo de los animales control ($q=0.8$, $p>0.05$). En los animales control, también el tratamiento crónico con fluoxetina provocó un aumento significativo en comparación con los animales control (+57%; $q=5.235$, $p<0.01$). El análisis de ANOVA de dos vías reveló que las mayores fuentes de variación correspondieron a las variables tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,22)=17.92$, $p<0.001$] y a la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,22)=12.58$, $p<0.01$] (fig. 35).

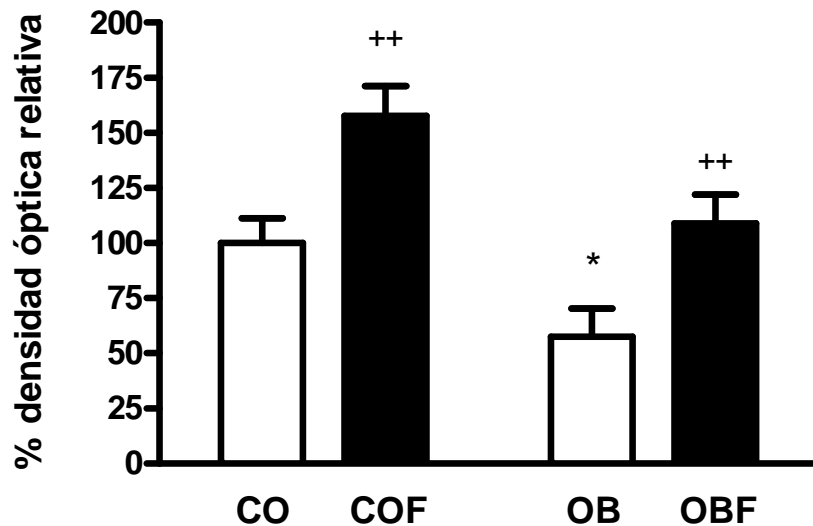


Figura 35. Gráfica representando la expresión de β -catenina en el hipocampo de animales control/bulbectomizados no tratados y tratados crónicamente con fluoxetina (10 mg/kg/día, 14 días, s.c.). Los datos representan las medias \pm E.E.M. * $p<0.05$ vs. animales control no tratados y ++ $p<0.01$ vs. animales control/bulbectomizados no tratados (test ANOVA 2 vías tras análisis *post hoc* de Newman-Keuls) (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

6. Estudios inmunocitoquímicos en el hipocampo de rata

6.1. Marcaje de β -catenina en hipocampo de rata: inmunohistoquímica por DAB

A continuación se describen los resultados correspondientes a los cambios en el número (%) de células inmunopositivas frente al marcaje de β -catenina en el hipocampo de los animales control y bulbectomizados, y el efecto del tratamiento crónico con fluoxetina.

El análisis ANOVA de dos vías nos muestra una fuente de variación muy importante tanto en el tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,22)=20.87$, $p<0.001$] como en la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,22)=43.73$, $p<0.001$], mostrando una interacción no significativa entre ambas [ANOVA interacción: $F(3,22)=1.601$, $p>0.05$].

El análisis *post hoc* “Newman-Keuls” revela una reducción significativa del número de células inmunoreactivas para β -catenina en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (-34%; $q=5.348$, $p<0.01$).

También se observa un aumento de células inmunopositivas frente al marcaje de β -catenina en los animales bulbectomizados tratados crónicamente con fluoxetina (+32%; $q=3.303$, $p<0.05$), llegándose a cuantificar un número de células similar al observado en el hipocampo de animales control ($q=2.044$, $p>0.05$).

También se encontró un aumento significativo en el número de células inmunoreactivas para la β -catenina en animales control tras la administración crónica del antidepresivo (+36%; $q=5.834$, $p<0.001$) (fig. 36 y 37).

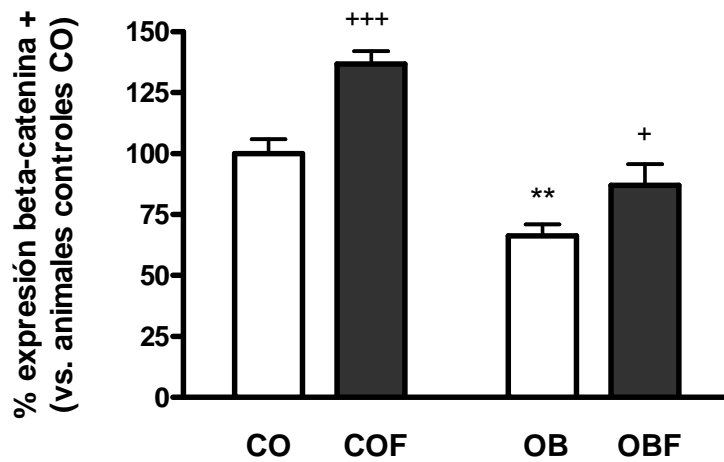


Figura 36. Marcaje de células β -catenina-positivas (% de células inmunoreactivas para β -catenina) en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en animales control/bulbectomizados, y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). Los datos representan las medias \pm E.E.M. ** $p < 0.01$ vs. animales control no tratados, $^+p < 0.05$ y $^{+++}p < 0.001$ vs. control/bulbectomizados no tratados (test ANOVA 2 vías tras análisis *post hoc* de Newman-Keuls) (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

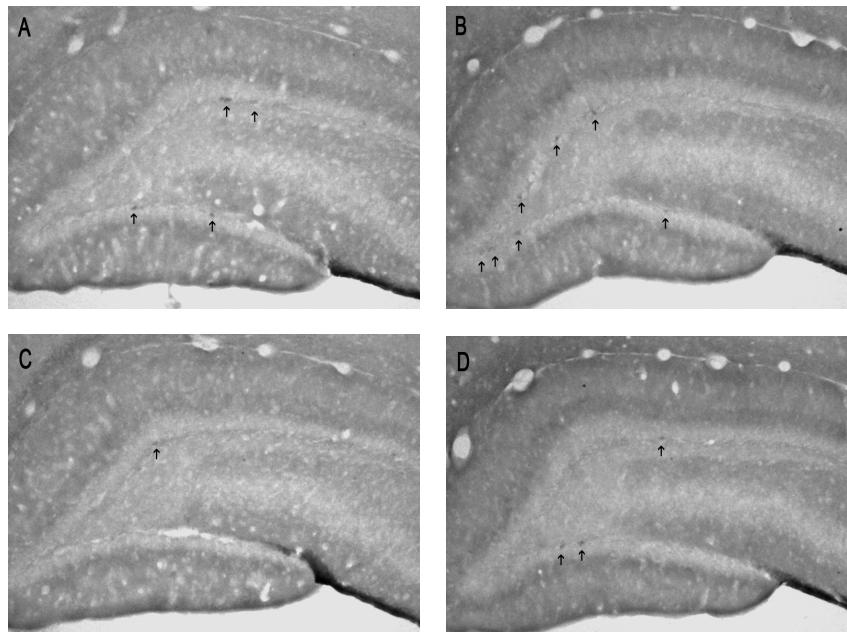


Figura 37. Representación microfotográfica de la inmunohistoquímica de β -catenina en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en una rata control (A), una rata control tratada con fluoxetina 10 mg/kg/día, 14 días (B), una rata bulbectomizada (C) y una rata bulbectomizada tratada con fluoxetina 10 mg/kg/día, 14 días (D).

6.2. Marcaje de BrdU en hipocampo de rata: inmunofluorescencia de células BrdU⁺

A continuación se describen los resultados de los estudios de inmunofluorescencia de BrdU en el hipocampo de los animales control y bulbectomizados, y el efecto del tratamiento crónico con fluoxetina.

Podemos observar cambios significativos en el número (%) de células inmunopositivas frente al marcaje de BrdU en el hipocampo de los animales control y los animales bulbectomizados (fig. 38 y 39).

El análisis ANOVA de dos vías nos muestra una fuente de variación muy importante tanto en el tratamiento [ANOVA tratamiento: $F(3,22)=15.38$, $p<0.01$] como en la cirugía [ANOVA cirugía: $F(3,22)=64.38$, $p<0.001$], mostrando una interacción no significativa entre ambas [ANOVA interacción: $F(3,22)=0.2808$, $p>0.05$].

El análisis *post hoc* “Newman-Keuls” revela una reducción significativa del número de células positivas para el marcaje inmunohistoquímico de BrdU en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en los animales bulbectomizados con respecto a los animales control (-28%; $q=7.494$, $p<0.001$).

También se observa un aumento de células marcadas en los animales bulbectomizados tras la administración crónica de fluoxetina (+18%; $q=3.388$, $p<0.05$) que no llega a revertir el porcentaje hasta los valores mostrados por los animales control, aunque se acerca ($q=4.106$, $p<0.05$).

Observamos igualmente un aumento de células inmunopositivas frente al marcaje de BrdU en los animales control tras la administración crónica del antidepresivo (+16%; $q=4.488$, $p<0.01$).

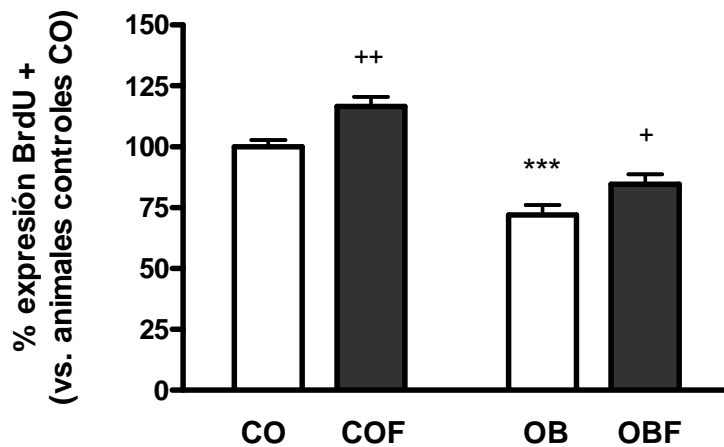


Figura 38. Marcaje de células BrdU-positivas (% de células inmunopositivas para BrdU) en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en animales control/bulbectomizados y efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día, s.c., 14 días). Los datos representan las medias \pm E.E.M. *** p <0.001 vs. animales control no tratados, + p <0.05 y ++ p <0.01 vs. control/bulbectomizados no tratados (test ANOVA 2 vías tras análisis *post hoc* de Newman-Keuls) (CO=6-8,COF=6-8,OB=6-8,OBF=6-8).

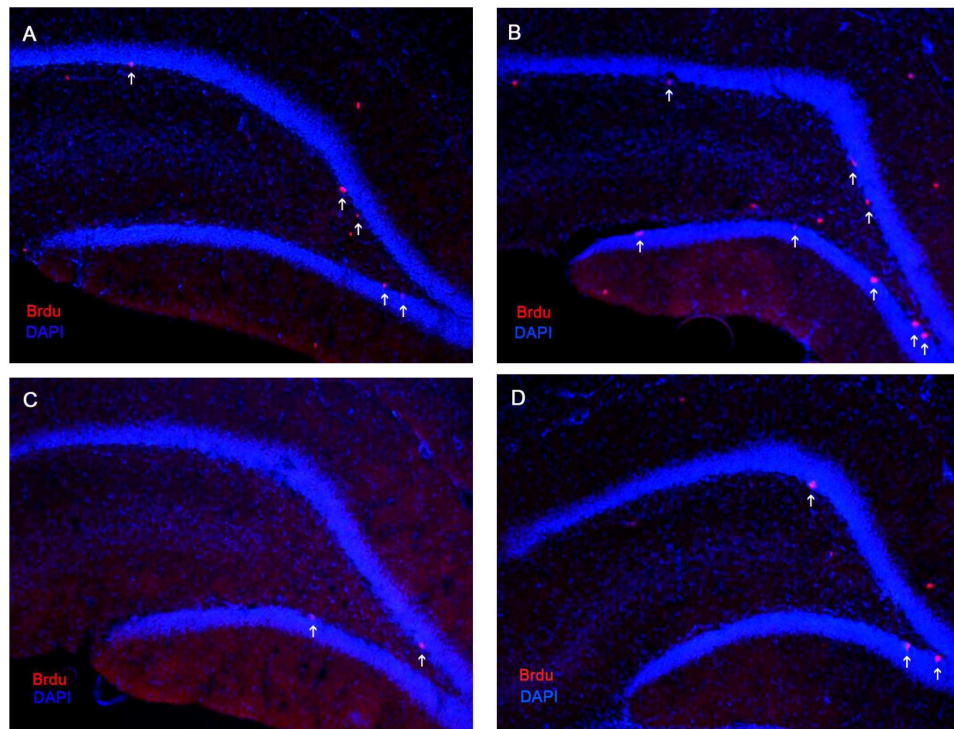


Figura 39. Representación microfotográfica de la inmunofluorescencia de BrdU en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en una rata control (A), una rata tratada con fluoxetina 10 mg/kg/día, 14 días (B), una rata bulbectomizada (C) y una rata bulbectomizada y tratada con fluoxetina 10 mg/kg/día, 14 días (D). Las células BrdU⁺ se marcaron usando Texas-red y los núcleos se visualizaron marcando con DAPI.

Cuando correlacionamos los resultados de los dos últimos estudios inmunohistoquímicos podemos ver claramente que el incremento en el porcentaje de células marcadas con β -catenina es totalmente proporcional al incremento de células marcadas con BrdU, como se muestra en la gráfica de la figura 40 ($r=0.784$, $p<0.001$; análisis de correlación de Pearson).

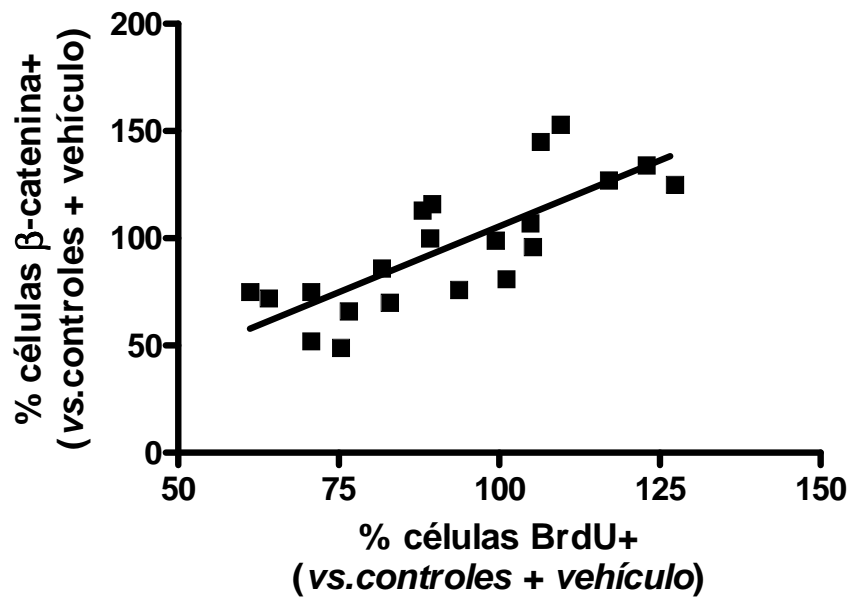


Figura 40. Correlación significativa entre el porcentaje de incremento en el número de células BrdU⁺ y el porcentaje de incremento de células inmunoreactivas para β -catenina inducidos por el tratamiento crónico con fluoxetina (Test de correlación de Pearson).

DISCUSIÓN

1. Alteraciones conductuales del síndrome de bulbectomía olfatoria bilateral en la rata: efecto de la administración crónica de fluoxetina

Nuestros resultados en el test del campo abierto demuestran claramente la aparición de unas alteraciones conductuales persistentes que son inducidas por la bulbectomía olfatoria bilateral y que se consideran propias de este modelo animal de depresión crónica con ansiedad comórbida: la hiperactividad y el aumento de la actividad exploratoria en un entorno abierto y aversivo. Como se ha descrito en los resultados, nuestras observaciones en todos los grupos experimentales de ratas bulbectomizadas han seguido este patrón, en forma de un aumento en el número de deambulaciones totales y del número de alzamientos. Además, nuestro estudio demuestra que el tratamiento crónico con el antidepresivo ISRS fluoxetina revierte esta hiperactividad, el parámetro conductual más representativo del síndrome de bulbectomía olfatoria bilateral.

La manifestación de una mayor actividad motora (hiperactividad reflejada como un mayor número de deambulaciones) y una mayor actividad exploratoria (alzamientos) en un área cerrada como es el campo abierto son los índices más aceptados en el cambio conductual producido por el síndrome de bulbectomía olfatoria (Van Riezen et al., 1976; Kelly et al., 1997; Song y Leonard, 2005; Wang et al., 2007; Roche et al., 2008). Además, este test conductual es el más comúnmente utilizado como indicador de la actividad antidepresiva crónica de un fármaco y que se traduce como la atenuación de la hiperactividad mostrada por la rata bulbectomizada (Van Riezen y Leonard, 1990; Kelly y Leonard, 1994; Kelly et al., 1997; Mar et al., 2000; Cryan y Mombereau, 2004; Roche et al., 2007; Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009). Es importante reseñar que los resultados en el test del campo abierto deben interpretarse correctamente de acuerdo con la forma y el modo en el que se realiza el test. El hecho de que las ratas bulbectomizadas muestren hiperactividad, con respecto a los animales control, en el test del campo abierto en condiciones de alta luminosidad es algo bien establecido (Kelly et al., 1997; Leonard y Tuite, 1981). Por el contrario, se detecta movilidad reducida en condiciones de baja intensidad luminosa (Stockert et al., 1988), aunque también se ha descrito que con unas paredes completamente negras pueden aparecer una respuesta

parecida. En nuestros estudios hemos realizado un test del campo abierto como el descrito originalmente por Kelly y Leonard (1994), es decir, con unas condiciones lumínicas muy intensas y con las paredes interiores del aparato reflectantes. Estas condiciones parecen ser las necesarias para una respuesta típica del síndrome ante un ambiente novedoso estresante y aversivo. Otros investigadores han estudiado el comportamiento, la actividad motora y la actividad exploratoria espontánea de estos animales durante varios días, y no solamente durante los cinco minutos que dura el test del campo abierto, detectándose un aumento en la hiperactividad nocturna, mientras que durante la fase del día su actividad era muy similar a las de las ratas control (Giardina y Radeck, 1991).

Además de estos dos parámetros de medida de la hiperactividad de estos animales, también hemos examinado el número de acicalamientos y el número de deambulaciones centrales como parámetros que puedan reflejar un estado ansioso de estos animales, dado que el modelo se ha definido últimamente como un modelo de depresión con ansiedad comórbida (Wang et al., 2007). Así, observamos en ambos casos que, aunque no se han producido cambios significativos entre los dos grupos experimentales de animales, sí que se observa una cierta tendencia a la disminución de estos dos parámetros en los animales bulbectomizados, lo que reflejaría una cierta predisposición de estos animales a mostrar un fenotipo ansioso. De hecho, en la literatura existen otros estudios realizados de forma más específica para estudiar y confirmar el componente ansioso de los animales bulbectomizados, como el test de la interacción social y el test del laberinto elevado (Wang et al., 2007), ambos tests validados como modelos de ansiedad (Rex et al., 2004), y en el que clara y significativamente los animales bulbectomizados manifiestan un mayor nivel de ansiedad. Otro de los parámetros registrados fue el número de defecaciones (número de bolos fecales), que sería un índice indirecto de la activación vegetativa inducida por la ansiedad ante situaciones novedosas y aversivas. De nuevo no encontramos cambios significativos, aunque sí una tendencia al aumento en el número de bolos fecales en las ratas bulbectomizadas, en consonancia con ese componente ansioso que define a este modelo animal. Tampoco en un estudio previo se encontraron cambios significativos en este parámetro (Stock et al., 2000). Sin embargo, si se han descrito cambios en parámetros fisiológicos que traducen

una mayor activación autonómica o vegetativa en el animal bulbectomizado cuando se le expone al campo abierto, como son alteraciones en la presión arterial, la temperatura corporal o el ritmo cardíaco; estos cambios se revierten tras el tratamiento crónico con antidepresivos junto a esa “normalización” conductual manifestada como una reversión de la hiperactividad en el campo abierto (Roche et al., 2007).

Nuestros resultados también demuestran que la hiperactividad del síndrome de bulbectomía olfatoria en el test del campo abierto típica se mantiene estable durante un período muy largo de tiempo, en nuestro caso hasta los 3 meses tras la cirugía, confirmando los hallazgos previos en la literatura. Mucignat-Caretta et al., (2006) han demostrado que el ratón bulbectomizado no sólo sigue mostrando la hiperactividad típica del modelo en el campo abierto durante al menos un mes sino que también presenta y persisten otras alteraciones visibles en otros tests de valoración de la conducta de tipo depresivo (como el de la natación forzada) y en los tests de evaluación de la memoria y aprendizaje (prueba del laberinto acuático). También hay evidencias experimentales en la rata de la persistencia temporal de dichas manifestaciones semiológicas conductuales propias del síndrome de bulbectomía olfatoria. Así, Van der Stelt et al. (2005) demuestran la hiperactividad en el campo abierto hasta transcurridos 5 meses desde la bulbectomía asociados a diversos cambios neuroquímicos: una reducción en el contenido de 5-HT a nivel de la amígdala y del hipocampo dorsal, y una menor tasa de síntesis de 5-HT. Otros autores describen la persistencia del déficit de memoria tras la bulbectomía en la rata cuando se valora en el test del laberinto acuático (Nesterova et al., 2008), demostrando por tanto que también los cambios en funciones cognitivas (memoria y aprendizaje) permanecen a lo largo del tiempo. En conclusión, todos estos estudios y nuestros resultados confirman que los cambios conductuales en el animal bulbectomizado son crónicos y estables, lo que reflejaría la persistencia a lo largo del tiempo de las alteraciones neuroquímicas, moleculares, morfológicas y estructurales en el cerebro de estos animales que subyacen a dichas alteraciones conductuales.

Uno de los puntos más relevantes del modelo de bulbectomía olfatoria, sino el que más, es la atenuación de esta hiperactividad mostrada por las ratas bulbectomizadas tras

el tratamiento crónico, que no agudo, con varios tipos de antidepresivos (Van Riezen et al., 1976; Cairncross et al., 1977; Jesberger y Richardson, 1986; Kelly et al., 1997; Cryan y Mombereau, 2004). Nosotros demostramos que el antidepresivo fluoxetina a una dosis de 10 mg/kg/día administrado de forma crónica (durante catorce días) mediante infusión s.c. utilizando minibombas osmóticas revierte de forma significativa la hiperactividad motora (deambulaciones) y exploratoria (alzamientos) inducidas por la bulbectomía. En nuestro caso, la administración mediante minibombas osmóticas garantiza unos niveles estables plasmáticos y cerebrales de fluoxetina durante todo el tiempo de administración, como lo confirman estudios realizados en nuestro laboratorio, lo que unido a la farmacocinética de la fluoxetina se traduce en un bloqueo continuo y mantenido del transportador de serotonina (5-HTT).

No hay muchos estudios en la literatura que demuestren este efecto de la fluoxetina en el modelo de bulbectomía olfatoria en la rata. Entre los primeros estudios se encuentra el de Butler y Leonard (1990), en el que la administración de fluoxetina durante 3 semanas no revirtió ni la hiperactividad ni el déficit en la recaptación sinaptosomal de 5-HT que presentaban los animales bulbectomizados. Sin embargo, en estudios posteriores la fluoxetina si ha mostrado actividad antidepresiva tras la bulbectomía tanto en el ratón (Possidente et al., 1996) como en la rata (Mar et al., 2000; Roche et al., 2007). Hay que tener en cuenta que la actividad antidepresiva de la fluoxetina no siempre ha sido confirmada, no sólo en este modelo animal de depresión sino también en otros modelos preclínicos; los resultados dependen del tipo de test y las condiciones ambientales de su realización, así como de la dosis y vía de administración de la fluoxetina, y, por supuesto, de la cepa de rata utilizada (López-Rubalcava y Lucki 2000; Cryan et al. 2005). En nuestro estudio, la aproximación metodológica es relativamente similar a la seguida por Mar et al. (2000) que demostraron la reversión de la hiperactividad inducida por la bulbectomía en la rata tras la administración de fluoxetina 10 mg/kg/día (vía i.p.; 21 días) en condiciones similares de alta luminosidad (aversividad) a la hora de realización del test de campo abierto, factor que es determinante a la hora de detectar la reversión por fluoxetina de esa hiperactividad. En el estudio de Roche et al (2007), el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día; s.c.; 5 semanas) también revirtió todas las alteraciones conductuales, fisiológicas y

neuroquímicas que mostraban las ratas bulbectomizadas al ser expuestas al test del campo abierto: la hiperactividad y el aumento de la actividad exploratoria, la menor capacidad de respuesta predecible al estrés (valorando la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal) y el aumento de la actividad neuronal (expresión de *c-fos*) en el hipocampo, la amígdala, el tálamo y el núcleo del rafe dorsal.

En cuanto a los parámetros de tipo ansiedad como son los acicalamientos, observamos que el tratamiento crónico con fluoxetina no ejerce ningún cambio significativo, ni en los animales control ni en los bulbectomizados, resultados que pueden concordar con el estudio de Mar et al., (2000), donde se muestra cómo la fluoxetina ejerce un efecto mucho menor en el test de ansiedad del laberinto elevado en comparación con el efecto que produce en el test del campo abierto, indicando que los efectos conductuales beneficiosos son mucho más claros cuando se examinan parámetros conductuales relacionados con depresión agitada que con parámetros más de tipo ansioso.

Con relación al número de defecaciones, el tratamiento crónico con fluoxetina provocó un incremento en ambos grupos. Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento crónico con fluoxetina atenúa el aumento de defecaciones observado en las ratas sometidas a una exposición crónica al estrés (Zhang et al. 2000) pero que, en cambio, induce diarrea en las ratas no estresadas (Zhang et al. 2000). Este incremento que hemos detectado en las defecaciones podría deberse a la acción sobre el sistema serotoninérgico localizado a nivel gastrointestinal (James et al. 2005), reflejando quizás un efecto secundario del antidepresivo a este nivel a las dosis empleadas en nuestro estudio. No podemos excluir de todos modos, que el tratamiento crónico con fluoxetina pueda incrementar la ingesta de comida en los animales (en este estudio no hemos valorado los cambios en el consumo del alimento), si bien no se observaron diferencias en cuanto al peso de los animales control y bulbectomizados al finalizar el tratamiento ni en curva de ganancia de peso (datos no mostrados), en concordancia con lo publicado repetidamente en la literatura (Van Riezen y Leonard, 1990; Kelly et al., 1997; Song y Leonard, 2005; Roche et al., 2008).

Al igual que con el antidepresivo fluoxetina, existen estudios en la literatura con otros inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) en los que se demuestra su eficacia antidepresiva (valorada en el test del “open-field” o campo abierto) en las ratas bulbectomizadas, administrados en un rango de dosis similar al de la fluoxetina en nuestro estudio: fluvoxamina (10-30 mg/kg; Leonard, 1993); sertralina (5-20 mg/kg; Leonard, 1993); paroxetina (10 mg/kg; Cryan et al., 1998); escitalopram (10-20 mg/kg; Breuer et al., 2007); trazodona (50 mg/kg; Otmakhova et al., 1992); e incluso venlafaxina, inhibidor dual de la recaptación de 5-HT y NA pero a dosis bajas (7.5 mg/kg; McGrath y Norman, 1998), por lo que no se llegaría a bloquearse la recaptación de noradrenalina.

Con relación al subtipo de receptor serotoninérgico que podría ser responsable de las acciones de los ISRS sobre el síndrome de bulbectomía olfatoria, el receptor 5-HT_{1A} parece jugar un papel importante de acuerdo a los resultados obtenidos tras la administración de paroxetina sola o en combinación con los antagonistas 5-HT_{1A} pindolol (Cryan et al., 1998) o WAY100635 (Cryan et al., 1999), o tras la administración conjunta de citalopram y pindolol, aunque también los receptores 5-HT_{1B} podrían intervenir en esas acciones antidepresivas en la rata bulbectomizada (Nguyen et al., 2009). En los párrafos que siguen, describimos y discutimos las adaptaciones en la expresión y funcionalidad de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} y en la expresión del 5-HTT que siguen a la bulbectomía olfatoria y cómo el tratamiento crónico con fluoxetina puede modularlas. Esta información puede ayudar a conocer un poco más sobre la participación relativa del 5-HTT y de cada subtipo de receptor serotoninérgico en las manifestaciones del síndrome de bulbectomía olfatoria así como en los efectos conductuales de la fluoxetina.

En conclusión, nuestros resultados confirman la validez predictiva del modelo de bulbectomía olfatoria bilateral en la rata para evaluar las acciones crónicas de los antidepresivos y proporcionan el correlato conductual de todos los hallazgos neuroquímicos en los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico y cannabinoide descritos en el presente trabajo y que, a continuación iremos interpretando y discutiendo.

2. Cambios adaptativos en el sistema serotoninérgico inducidos por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata: efecto de la administración crónica de fluoxetina

2.1. Transportador de serotonina: 5-HTT

Este es el primer estudio donde se analiza mediante autorradiografía cuantitativa la densidad regional del transportador de 5-HT (5-HTT) en el cerebro de la rata bulbectomizada y su modulación por fluoxetina crónica. El transportador de serotonina es un elemento clave en la patología de la depresión, principalmente por su papel en la finalización de la acción de la serotonina a la hora de recaptar este neurotransmisor de nuevo hacia el soma neuronal. Las teorías más admitidas para explicar la eficacia de muchos de los fármacos antidepresivos establecen que estos fármacos incrementan la neurotransmisión serotoninérgica bloqueando el proceso de recaptación de serotonina en el transportador, impidiendo que ésta vuelva al interior celular (Backstrom et al., 1989); el efecto terapéutico, consecuencia de esta acción neuroquímica, aparecería una vez instaurados (a las 2-4 semanas) toda una serie de cambios adaptativos en distintos elementos del sistema serotoninérgico (transportador, receptores presinápticos y postsinápticos) (Rutter et al., 1994; Gardier et al., 1996).

En nuestro estudio hemos encontrado cambios significativos en la densidad del 5-HTT en áreas restringidas del cerebro de la rata bulbectomizada en comparación con los animales control. Detectamos un aumento de la densidad del 5-HTT en los núcleos basolaterales de la amígdala, y reducciones en el núcleo del rafe mediano y en la sustancia gris periacueductal. Sin embargo, no se encontraron cambios adaptativos en el resto de las áreas o núcleos cerebrales estudiados. Hasta ahora, en la literatura se había descrito un aumento en la densidad del 5-HTT, sin cambios en la afinidad, en estudios de fijación de [³H]-paroxetina en homogeneizados de membranas de corteza frontal (Grecksh et al., 1997). En otro estudio, Slotkin et al. (1999) también encontraron diferencias en los niveles de fijación de [³H]paroxetina en membranas de varios niveles cerebrales, como la corteza frontoparietal y el hipocampo en las ratas bulbectomizadas, pero en sentido opuesto dependiendo de la edad del animal: incremento en la densidad

del 5-HTT en ambas áreas (aunque más pronunciado en la corteza) en las ratas jóvenes (9 semanas de vida), y reducción en ambas áreas en el caso de las ratas de edad avanzada (19 meses). Aunque sería necesario comprobarlo experimentalmente, podríamos especular que la ausencia de cambios en nuestro estudio en áreas corticales e hipocampo, y quizás en otras áreas, se deba al haber utilizado ratas que se encuentran en un rango de edad y peso intermedio. Slotkin et al. (1999) también estudiaron la expresión del ARNm para el 5-HTT en áreas mesencefálicas, pero sin encontrar cambios significativos. Estos resultados, discordantes con los nuestros podrían atribuirse, aparte de al factor edad de los animales ya mencionado, a las siguientes circunstancias: por un lado, la técnica/tejido utilizados (membranas *vs.* secciones cerebrales en nuestro estudio; densidad máxima *vs.* densidad autorradiográfica en nuestro caso); por otro lado, la cepa del animal de experimentación (*Wistar vs. Sprague-Dawley* en nuestro estudio) puesto que se ha demostrado que la cepa influye en los resultados de ciertos estudios y, en especial, a la hora de evaluar acciones antidepresivas en roedores (Lahmame et al., 1997; López-Ruvalcaba y Lucki, 2000; Tejani-Butt et al., 2003); en este sentido y apoyando esta argumentación, también existen estudios en ratones sometidos a bulbectomía olfatoria en los que se observa diferencias conductuales y neuroquímicas dependiendo de la cepa (Otmakhova et al., 1992).

El único área en el que observamos un aumento significativo en la rata bulbectomizada (regulación a la alta) fue la amígdala, área no estudiada por otros autores (Zhou et al., 1998; Slotkin et al., 1999), lo que sorprende por ser una importante área de proyección serotoninérgica desde los núcleos mediano y dorsal del rafe, y que a su vez proyecta hacia numerosas áreas cerebrales del mesencéfalo (Kelly et al., 1997), además de ser centro de integración de la sensación olfatoria (McDonald, 1992). Se ha postulado que la bulbectomía induciría una hiperexcitabilidad (desinhibición) de la amígdala manifestada como un incremento en la activación neuronal en este área (expresión de *c-fos* en núcleos centrales y basolaterales), fenómeno neuronal que podría contribuir a la hiperactividad observada en el campo abierto; además, esta mayor actividad neuronal se revierte, al igual que la alteración conductual, tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Roche et al., 2007). De hecho, la amígdala juega un papel crucial en la fisiopatología y en las alteraciones conductuales subsecuentes a la

bulbectomía olfatoria ya que esta región límbica está considerada como un centro relacionado con el procesamiento de información considerada aversiva y emocional (Kelly et al., 1997). Podríamos especular que los cambios adaptativos en el 5-HTT a este nivel y su modulación tras el tratamiento crónico con fluoxetina pueden contribuir a las alteraciones conductuales propias del síndrome de bulbectomía olfatoria y su reversión por el antidepresivo, respectivamente. Todos estos cambios adaptativos en la expresión del 5-HTT postbulbectomía y tras el tratamiento con fluoxetina refuerzan el papel que juega este núcleo del sistema límbico en la respuesta al estrés de estos animales, y por ende, en el patrón conductual que exhiben en ese nuevo entorno aversivo.

A nivel del tronco del encéfalo también detectamos importantes cambios en la rata bulbectomizada, en este caso una regulación a la baja en la densidad del 5-HTT en ciertos núcleos como el rafe mediano y la sustancia gris periacueductal. Respecto al núcleo del rafe mediano, no existe en la literatura ningún dato previo sobre la densidad del 5-HTT tras bulbectomía, pero el descenso que hemos hallado podría encajar con las evidencias sobre la neurodegeneración neuronal descrita en los núcleos del rafe, reversible por antidepresivos crónicos, que se observa tras la operación de bulbectomía olfatoria (Nesterova et al., 1997). Por otra parte, en este núcleo, como más tarde describiremos, hay una desensibilización del receptor 5-HT_{1A} en la rata bulbectomizada. Ambos fenómenos, desensibilización del receptor 5-HT_{1A} y regulación a la baja del 5-HTT son cambios que también observamos en el núcleo dorsal del animal control en nuestro estudio. Otros autores también han descrito tanto la desensibilización del receptor 5-HT_{1A} (Castro et al., 2003; Hensler, 2002) como la regulación a la baja del 5-HTT en condiciones experimentales idénticas a las nuestras (Lesch et al., 1993; Piñeyro et al., 1994), adaptaciones neuroquímicas que se consideran relevantes para la acción beneficiosa del antidepresivo. Por lo tanto, podríamos especular que una menor disponibilidad del 5-HTT y una menor funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} tras la bulbectomía, en este caso en el rafe mediano, surgirían como mecanismo de compensación en un intento de mantener la homeostasis y el buen funcionamiento del sistema serotoninérgico, pero sin llegar a ser suficiente como para obtener la mejoría conductual, que sólo aparecería tras el tratamiento crónico con el antidepresivo.

Además, los datos obtenidos, en muestras postmortem en deprimidos suicidas, por el grupo de Arango et al (2001) apoyarían esta hipótesis: una menor fijación de [³H]-8-OH-DPAT a los autorreceptores del rafe y de [³H]-Cyanoimipramina al 5-HTT en el rafe dorsal; estos hallazgos, para los autores, significarían una menor inhibición por parte de los receptores 5-HT_{1A} sobre la actividad eléctrica del neuronas del rafe y una mayor acción de la serotonina al disminuir su recaptación, fenómenos compensadores en respuesta a la hipofunción serotoninérgica de los pacientes deprimidos suicidas.

En la sustancia gris periacueductal (SGP) hemos observamos una regulación a la baja de la densidad del 5-HTT en los animales bulbectomizados; este núcleo es el mayor centro integrador del control homeostático del dolor, y lo más importante, un área muy relacionada con el comportamiento defensivo. La activación de la SGP provoca la liberación de encefalinas por parte de las neuronas que proyectan a los núcleos del rafe, que a su vez liberarían serotonina a nivel espinal inhibiendo la entrada de estímulos nociceptivos (Géranton et al., 2008). Además, la modificación de los niveles de 5-HT en este núcleo (administración local) atenúa los efectos antinociceptivos que se observan tras la estimulación eléctrica (Hämäläinen y Lovick, 1997). En este contexto, es importante reseñar que estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran una mayor respuesta dolorosa de la rata bulbectomizada a estímulos nociceptivos térmicos y mecánicos (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005a), alteración de la sensibilidad dolorosa que se “normaliza” tras la administración crónica de fluoxetina a la vez que se observa el efecto antidepresivo (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b). La regulación a la baja del 5-HTT en la SGP refleja una alteración del sistema serotoninérgico que podría estar relacionada con esos cambios en la respuesta al dolor que observamos tras bulbectomía, aunque es evidente que son necesarios futuros estudios (i.e. administración local de antidepresivos) para confirmar esta hipótesis.

En este mismo contexto de modulación de la transmisión nociceptiva podríamos encuadrar los cambios detectados en la densidad del 5-HTT a nivel del rafe magnus en el animal control y bulbectomizado tras la administración crónica de fluoxetina. Este es un núcleo clave en el control descendente del dolor, cuya estimulación directa produce analgesia (Oliveras et al. 1975) y que recibe aferencias desde la sustancia gris

periacueductal, los núcleos hipotalámicos paraventriculares y la amígdala. Los cambios observados en la densidad del 5-HTT en este núcleo en los animales bulbectomizados y los animales control tras la administración crónica de fluoxetina pueden explicar, al menos en parte, el efecto “normalizador” de la sensibilidad dolorosa observado en las ratas bulbectomizadas y al efecto analgésico que también hemos observado en las ratas control, respectivamente, tras las administración crónica del antidepresivo (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b).

Hasta la fecha, no hay estudios en la literatura acerca de los cambios que pueda ejercer el tratamiento crónico con fluoxetina sobre la densidad del 5-HTT en el cerebro del animal bulbectomizado, sin embargo, si hay estudios en animales control pero con resultados muy diversos, como posteriormente comentaremos. En el presente trabajo demostramos un descenso generalizado en el número de transportadores de 5-HT tras el tratamiento crónico con fluoxetina en todas las áreas cerebrales estudiadas tanto en los animales control como los bulbectomizados. Se podrían distinguir, tanto en los animales control como los bulbectomizados, tres grupos de áreas cerebrales según el grado de reducción en la densidad del 5-HTT: reducción ligera (25-45%) para áreas/núcleos como la corteza frontoparietal y cingular, el caudado putamen y el hipocampo; moderada (45-65%) en el caso de la corteza entorrinal, el septo y el núcleo del rafe magnus; y alta (+ del 65%, incluso hasta el 85%) en el hipotálamo, la amígdala, la sustancia negra, la sustancia periacueductal gris, así como en los núcleos del rafe dorsal y mediano. De cualquier manera, los resultados obtenidos en ambos grupos experimentales reflejan claramente el cambio adaptativos en la densidad del 5-HTT consecuencia principal del mecanismo de acción propio de la fluoxetina, la inhibición crónica y mantenida de la recaptación de 5-HT.

Hay en la literatura diversas evidencias experimentales sobre la regulación de la expresión del 5-HTT en el cerebro de roedores tras el tratamiento con diferentes antidepresivos (Benmansour et al, 1999; Yau et al., 1999). En lo que respecta al inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina fluoxetina, hay varios estudios en el animal de experimentación pero con resultados diversos. Algunos autores no encuentran cambios tras el tratamiento crónico (Dewar et al., 1993; Gobbi et al., 1997); otros

demuestran aumentos en la densidad autorradiográfica del 5-HTT en la corteza frontoparietal, el estriado, la corteza visual y el área CA₁ del hipocampo (Hrdina y Vu, 1993); y otros, como Hébert et al. (2001), un descenso significativo en la densidad del 5-HTT tan sólo en la corteza entorrinal, aunque con una tendencia a la reducción en otras regiones cerebrales, tras el tratamiento i.p. con fluoxetina (2 mg/kg/día, 21 días); nuestros resultados estarían más en línea con los hallazgos de este último autor.

De cualquier manera, todas estas discrepancias pueden ser resultado de las distintas particularidades metodológicas de los estudios reseñados: la dosis de fluoxetina, la vía de administración, la especie animal así como el período de “wash-out” tras el cese de la administración del antidepresivo. En nuestro caso, creemos que la administración por infusión continua s.c. (minibombas) de una dosis alta de fluoxetina (10 mg/kg/día) garantizaría niveles plasmáticos estables del ISRS, factor que podría ser crítico para inducir esa clara regulación a la baja del 5-HTT que hemos detectado en nuestro estudio (Lesch et al., 1993; Piñeyro et al., 1994). Sin embargo, es importante también considerar, a la hora de interpretar los resultados, el denominado período de “wash-out” o tiempo que transcurre desde el cese del tratamiento hasta el sacrificio de los animales para la realización de los estudios neuroquímicos. En nuestro estudio, el período de “wash-out” fue 24 horas de acuerdo al protocolo habitualmente utilizado en nuestro laboratorio (Castro et al., 2003). En el estudio de Hébert et al (2001) fue de 72 horas y en el de Gobbi et al (1997) fue de 7 días, en este último caso no encuentran cambios en la expresión del 5-HTT, quizás porque este período de tiempo podría ser suficiente para que comenzasen a revertir los efectos de la fluoxetina. En otra especie animal, el cobaya, El Mansari et al., (1995) tampoco observan efectos sobre el transportador de 5-HTT en la corteza cerebral con 96 horas de “wash-out” tras el tratamiento crónico con fluoxetina administrada con minibombas. Sin embargo, en la misma especie animal otro antidepresivo ISRS paroxetina reduce la densidad del transportador en la corteza frontal (Blier y Bouchard, 1994; El Mansari et al., 1995) o en el hipotálamo (Blier y Bouchard, 1994).

De todos los estudios anteriores se deduce que el período de “wash-out” podría ser un elemento crítico a la hora de detectar cambios en la expresión del 5-HTT, bien

porque un período excesivamente largo puede permitir una reversión de los efectos inducidos por la fluoxetina o bien porque un período excesivamente corto podría no ser suficiente como para descartar la presencia de fluoxetina residual en las muestras cerebrales, lo que podría estar interfiriendo en la cuantificación real de la densidad del 5-HTT. Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran la presencia de niveles detectables de fluoxetina y de su metabolito norfluoxetina en el plasma y el cerebro de animales a las 24 horas de finalizar el tratamiento crónico con fluoxetina (10 mg/kg/día, minibombas, 14 días). Aunque en los estudios autorradiográficos la fase de preincubación de las secciones cerebrales tiene como finalidad “limpiar” el tejido de ligandos endógenos y de restos del fármacos administrados, no podemos descartar totalmente la posibilidad de que cierta fluoxetina residual pudiese estar presente durante la fase de incubación con el radiotrazador [³H]-citalopram influyendo, en mayor o menor medida, sobre la fijación específica [³H]-citalopram al 5-HTT y por lo tanto en los datos relativos a la densidad regional del 5-HTT. Parece pues clara la necesidad de realizar futuros experimentos ensayando distintas dosis, distintos períodos de “wash-out” con la misma dosis y/o modificaciones en el tiempo/temperatura de la fase de preincubación de las secciones cerebrales para poder aclarar esta cuestión, sobre todo teniendo en cuenta las características farmacocinéticas y propiedades farmacodinámicas de la fluoxetina.

Todos estos hallazgos sobre la expresión del 5-HTT en el animal de experimentación tienen su referente en estudios con muestras *postmortem* de humanos y por técnicas de neuroimagen *in vivo* en pacientes. Hay estudios con muestras *postmortem* de pacientes con síntomas recientes de episodios depresivos que demuestran la ausencia de cambios en la densidad del 5-HTT en el rafe dorsal y en el locus coeruleus (Bligh-Glover et al, 2000; Klimek et al., 2003). Arango et al. (2001) han demostrado una regulación a la baja en el sistema de recaptación de 5-HT en los núcleos del rafe mediano y dorsal en el cerebro de suicidas deprimidos en comparación con pacientes control, valorando la fijación específica de [³H]-Cianoimipramina y teniendo en cuenta varios factores (volumen del área analizada, número de neuronas serotoninérgicas que expresaban el ARNm del 5-HTT y cantidad de expresión por neurona). En áreas de proyección serotoninérgica, como la corteza prefrontal, se ha

descrito tanto una disminución como ausencia de cambios en la densidad del 5-HTT en muestras *postmortem* de deprimidos suicidas (Perry et al., 1983; Austin et al., 2002). Sin embargo, también se han observado aumentos en la densidad del 5-HTT en la corteza frontal (Mann et al., 2000) y, especialmente, en la corteza prefrontal medial (Arango et al., 1995). De cualquier manera, tal y como refieren Stockmeier (1997) y Meyer (2007), los hallazgos en muestras *postmortem* deben ser tomados con cautela por la heterogeneidad de los casos incluidos: cuadros clínicos tanto precoces como tardíos de la depresión mayor, presencia de otros trastornos psiquiátricos como la enfermedad bipolar, así como pacientes con y sin tratamiento antidepresivo.

En cuanto a los estudios de neuroimagen *in vivo*, los resultados tampoco son homogéneos: mientras algunos autores han descrito una regulación a la baja del 5-HTT en el tronco del encéfalo (Malison, 1998) y los núcleos mesencefálicos (Newberg et al., 2005) sobre todo en pacientes no tratados (Parsey et al., 2006), otros (Herold et al., 2006) no han encontrado cambios significativos en la fijación al 5-HTT en el mesencéfalo. También se han descrito cambios en áreas de proyección: descensos en la fijación al 5-HTT en la amígdala, sobre todo más acusados en pacientes deprimidos no tratados (Parsey et al., 2006), y aumentos en el tálamo (Ichimiya et al., 2002); sin embargo, otros no encuentran cambios en el tálamo y el estriado humanos (Newberg et al., 2005). Parsey et al. (2006) tampoco detectaron cambios en la fijación al 5-HTT en áreas límbicas como el hipocampo y la corteza cingular. Finalmente, hay autores (Meyer et al., 2004) que describen ausencia total de cambios en el cerebro de pacientes deprimidos. Además, los cambios en la expresión del 5-HTT en el cerebro de deprimidos no parecen ser permanentes puesto que se han medido unos niveles normales de fijación al 5-HTT en pacientes ya recuperados del cuadro depresivo (Bhagwagar et al., 2007), a diferencia de la persistente alteración en la expresión de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} (disminución) y 5-HT_{2A} (aumento) que se detecta en estos pacientes (Bhagwagar et al., 2004; 2006).

Los estudios en humanos no aportan datos concluyentes sobre los cambios adaptativos en el 5-HTT como consecuencia del tratamiento antidepresivo, pero a partir de los resultados obtenidos en los estudios con el animal de experimentación se postula

que el efecto terapéutico de los ISRS seguramente deriva de un cambio adaptativo en el sistema serotoninérgico, disminuyendo la densidad y función del 5-HTT, algo que no se produce con otros antidepresivos no ISRS (Benmansour et al., 1999, 2002). Sin embargo, también se ha propuesto que, a largo plazo, esa regulación a la baja del 5-HTT inducida por el antidepresivo podría explicar la pérdida de eficacia de los ISRS que se observa en ciertos pacientes (Byrne y Rothschild, 1998).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la administración crónica del ISRS fluoxetina regula a la baja su diana farmacológica, el 5-HTT. En el animal bulbectomizado, en el que encontramos modificaciones en la densidad del 5-HTT en ciertas áreas cerebrales, los cambios inducidos por la administración crónica de fluoxetina sobre la densidad del 5-HTT van asociados al efecto conductual positivo del antidepresivo.

2.2. Receptor 5-HT_{1A}

Este es el uno de los primeros estudios donde se analiza no solo la densidad sino también la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} mediante técnicas autorradiográficas en un modelo animal de depresión como es la bulbectomía olfatoria en la rata. También hemos analizado los posibles cambios en la densidad y funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} inducidos por la administración crónica de fluoxetina en el animal bulbectomizado en comparación con el animal control para correlacionar estos parámetros neuroquímicos con los efectos conductuales del antidepresivo. Nuestros datos demuestran que tras la bulbectomía olfatoria se producen cambios en la señalización serotoninérgica vía receptor 5-HT_{1A} pero de forma diferencial según las áreas cerebrales analizadas.

En áreas corticales no límbicas del animal bulbectomizado, como la corteza frontoparietal, hemos detectado un incremento en la señalización vía receptor 5-HT_{1A} (hiperfuncionalidad real) valorada como un incremento en la eficacia de acoplamiento del receptor a la proteína G, que se revierte (apareciendo incluso una cierta

desensibilización) tras el tratamiento con fluoxetina. En otra área cortical, que forma parte del sistema límbico, como es la corteza entorrinal encontramos una regulación a la alta en la densidad del receptor 5-HT_{1A}, aunque si no fijamos en la ratio funcionalidad/densidad tendríamos una cierta hiposeñalización neta; de cualquier manera vemos el efecto positivo que produce el antidepresivo sobre la densidad del receptor y su funcionalidad hasta llevarlas a valores similares a los del animal control.

En los núcleos del septo latero-dorsal del animal bulbectomizado aparece una hiperfuncionalidad real (hay una tendencia a la reducción en el número de receptores) que desaparece tras el tratamiento crónico con fluoxetina. A nivel del hipocampo, se observa claramente la desensibilización inducida por fluoxetina en el animal bulbectomizado. En el caso de la amígdala, los resultados indican la existencia de un menor grado de acoplamiento del receptor a la proteína G en el animal bulbectomizado aunque la señalización parece tender a “equilibrarse” si se consideran los valores de densidad, indicando que la bajada en la funcionalidad se debe realmente a un menor número de receptores disponibles; lo que si se aprecia claramente es la desensibilización inducida por fluoxetina tras su administración crónica.

A nivel de los núcleos situados en el tronco cerebral observamos, en general, un menor grado de señalización (funcionalidad real) en el animal bulbectomizado. La desensibilización se produce a expensas del acople del receptor a la proteína G (descensos en fijación específica de [³⁵S]GTPγS inducida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT de hasta el 41%) o bien debido a cambios en su densidad que no llevan asociados de forma paralela cambios en la funcionalidad (i.e. hay aumentos en la densidad en núcleos como el rafe magnus y los núcleos parabraquiales pero sin incrementos parejos de funcionalidad). Lo más relevante es que estas alteraciones se revierten con el antidepresivo en todos los núcleos, salvo para el núcleo del rafe dorsal en donde se produce una desensibilización del receptor 5-HT_{1A} tras el tratamiento crónico con fluoxetina.

En definitiva, en el animal bulbectomizado el tratamiento crónico con fluoxetina intentaría “normalizar”, en general, esas alteraciones en la densidad/ funcionalidad del

receptor observadas tanto a nivel de áreas encefálicas como en los núcleos del tronco, además de producir una clara desensibilización a nivel del autorreceptor 5-HT_{1A} del rafe dorsal y de los receptores postsinápticos del hipocampo.

Por su parte en el animal control, el tratamiento crónico con fluoxetina desensibiliza el receptor 5-HT_{1A} en los núcleos del rafe dorsal y mediano, efecto farmacológico en consonancia con las adaptaciones a este nivel inducidas por la mayoría de los antidepresivos. Esta desensibilización del receptor inducida por fluoxetina también aparece en áreas límbicas bien del telencéfalo (hipocampo CA₁-CA₂ y giro dentado al igual que lo observado en el animal bulbectomizado) o diencefalo (hipotálamo dorsomedial); sin embargo, el antidepresivo indujo hipersensibilidad en áreas corticales.

Hasta ahora sólo hay un trabajo muy reciente en la literatura (Sato et al., 2007) en el que se estudian mediante autorradiografía cuantitativa los cambios en la densidad, pero no en la funcionalidad, del receptor 5-HT_{1A} en el cerebro de la rata bulbectomizada y el efecto de la administración crónica de buspirona. En este estudio, se demuestra una menor densidad del receptor 5-HT_{1A} prácticamente en todo el cerebro del animal bulbectomizado, especialmente en áreas límbicas (corteza prelímbica, amígdala e hipotálamo ventral) pero también en regiones corticales y en el rafe dorsal (excepto su porción ventral) con reducciones que van desde el 25% (i.e. hipocampo) hasta el 50% (i.e. hipotálamo). En cambio, en el ratón bulbectomizado no se han encontrado cambios ni en la densidad ni en afinidad de la fijación de [³H]-8-OH-DPAT en membranas de varias áreas cerebrales (corteza frontal, hipocampo, amígdala, corteza piriforme, tubérculo olfatorio e hipotálamo) (Gurevich et al., 1993). Tampoco Slotkin et al. (2005), en sus estudios en membranas encontraron diferencias entre el animal bulbectomizado y el control en el estriado y la corteza cerebral.

Nuestros resultados indican también una cierta tendencia a la reducción, aunque no significativa, en la densidad del receptor 5-HT_{1A} en muchas de las áreas analizadas: el septo (del 18-26%), el hipotálamo ventral (29%) y la amígdala (17%) como regiones del encéfalo; también, en general una menor funcionalidad (reducciones entre el 15-

25%) llegando a ser significativa en alguna región (- 41% en rafe mediano). De todos modos hay algunos datos que muestran resultados en sentido contrario: en la corteza cerebral, los cambios son hacia la regulación a la alta tanto en la funcionalidad (+36% en corteza frontoparietal) como en la densidad (i.e. +41% en la corteza entorrinal aunque con una importante reducción en la funcionalidad); en los núcleos del tronco vemos cierta reducción en la funcionalidad, pero los resultados sobre la densidad indican la presencia de incrementos que van desde el 28% al 43% (significativos en núcleos como el rafe magnus y parabraquial dorsal).

Estos hallazgos discrepan con los del grupo de Sato et al. (2007). No tenemos una explicación clara para estas diferencias porque desde el punto de vista metodológico hemos utilizado el mismo radioligando para marcar el receptor 5-HT_{1A} ([³H]-8-OH-DPAT a 2 nM) y la misma cepa de ratas (*Sprague-Dawley*) aunque con una diferencia en cuanto a la edad de los animales. Nosotros partimos de pesos de entre 250-280 gramos antes de la bulbectomía, mientras que en el estudio de Sato et al., (2007) utilizan animales más jóvenes (< 240 gramos), en este sentido, el grupo de Slotkin (1999, 2000 y 2005) ha señalado que hay cambios diferenciales en marcadores de señalización serotoninérgica (i.e. en la densidad de receptores serotoninérgicos y en la actividad adenilato ciclasa ligada a los mismos) dependiendo de la edad de la rata. Por otra parte, puede haber habido diferencias en el nivel anatómico escogido para cuantificar los parámetros en tronco cerebral; de hecho, Sato et al. (2007) ven diferencias en la densidad del receptor 5-HT_{1A} entre las mitades anterior y posterior del núcleo del rafe dorsal, algo que también se ha demostrado por técnicas de neuroimagen para el rafe dorsal en humanos (Boldrini et al., 2008). Todos estos son aspectos relacionados con cuestiones de tipo metodológico (especie animal, edad, diferencias en la densidad receptorial según un gradiente antero-posterior, etc...) que necesitarían ser aclarados en futuros estudios experimentales.

También existen otros modelos animales de depresión en los que se ha analizado los posibles cambios en la densidad del receptor 5-HT_{1A} en el cerebro: el modelo animal de indefensión aprendida (Edwards et al, 1991, 1992) y el modelo genético de las ratas sensibles tipo *Flinders* (Nishi et al., 2009a). En las ratas *Flinders* sensibles al estrés hay

una reducción en la densidad autorradiográfica del receptor 5-HT_{1A} en numerosas áreas cerebrales tanto corticales, límbicas como en los núcleos mesencefálicos en comparación con los animales control (*Sprague-Dawley*) pero aún más si se compara con las ratas *Flinders* resistentes al estrés (Nishi et al. 2009). En otros modelos de depresión como la indefensión aprendida y manipulación/separación maternal (Neumaier et al., 2002) no se han descrito cambios en la expresión del ARNm del receptor 5-HT_{1A}. Hemos comentado que en nuestro estudio se observa una tendencia a la reducción en la densidad del receptor en muchas áreas pero también un comportamiento en sentido claramente contrario en otras, a veces con cambios significativos. Parece evidente que cada modelo animal de depresión debe tener o provocar alteraciones diferenciales en el sistema serotoninérgico en una u otra dirección y con un patrón región-dependiente. Por ejemplo, nuestro modelo de la bulbectomía y el de las ratas *Flinders* muestran diferencias en marcadores de la función serotoninérgica como son el contenido tisular de 5-HT (Lumia et al., 1992; Van der Stelt et al., 2005) y la síntesis regional de 5-HT (Watanabe et al., 2003 y 2006; Hasegawa 2006). Además, conductualmente el síndrome de bulbectomía olfatoria supone un modelo de depresión agitada o depresión con ansiedad comórbida e hiperactividad (Song y Leonard, 2005; Wang et al., 2007; Roche et al., 2008) mientras que, por ejemplo, el de las ratas *Flinders* ha sido propuesto como modelo de depresión con retardo psicomotor, un tipo de depresión descrito en humanos (Lapierre y Butter, 1980). Así pues, los mecanismos patogénéticos que se desencadenarían en cada modelo son diferentes y podrían explicar esos cambios adaptativos diferenciales en los marcadores del sistema serotoninérgico; de hecho, distintos modelos animales de depresión presentan un patrón diferencial en la expresión génica cerebral (Urigüen et al., 2008).

En las áreas corticales del animal bulbectomizado hemos observado aumentos significativos en la densidad (i.e. corteza entorrinal) o en la funcionalidad (i.e. corteza frontoparietal) del receptor 5-HT_{1A}. Estos cambios pudieran suponer un mecanismo adaptativo a la hiperinervación serotoninérgica (Zhou et al., 1998) y los cambios en el contenido tisular de 5-HT (Lumia et al., 1992) y en la síntesis regional de 5-HT (Wrynn et al., 2000; Hasegawa et al., 2005; Watanabe, 2006) detectados en la rata bulbectomizada. Este es el primer estudio que aporta datos autorradiográficos

anatómicos y funcionales sobre el receptor 5-HT_{1A} postsináptico en áreas corticales en un modelo animal de depresión, en el que se observan cambios en el mismo sentido que los hallazgos en muestras cerebrales postmortem de deprimidos suicidas (Arango et al., 1995), apoyando la hipótesis de que, en la depresión, el receptor 5-HT_{1A} postsináptico estaría regulado a la alta en esta región cerebral, importante en la modulación de la conducta (Bechara et al., 2000).

Los hallazgos en el hipocampo reforzarían más la similitud patofisiológica con la depresión humana porque al igual que lo descrito en deprimidos suicidas (Dillon et al., 1991; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997) no hemos observado ningún cambio significativo en la densidad del receptor 5-HT_{1A} (aunque si incrementos en su funcionalidad-significativo en las áreas CA₁-CA₂). En el resto de áreas del cerebro límbico como el hipotálamo y la amígdala hemos detectado reducciones en la densidad (i.e. -28% de reducción en la densidad en hipotálamo ventromedial, -17% en amígdala, aunque no significativas por el análisis estadístico de múltiples comparaciones) o en la funcionalidad (-17% en amígdala y significativo), datos experimentales que estarían más en consonancia con los hallados por otros en el animal bulbectomizado (Sato et al., 2007) y en otros modelos de depresión (Nishi et al., 2009) y como en el caso de la amígdala con los hallazgos en humanos deprimidos (Drevets et al., 1999).

Ya hemos comentado anteriormente que en los núcleos del tronco vemos cierta reducción en la funcionalidad, pero los resultados sobre la densidad indican la presencia de incrementos en la densidad que van desde el 28% al 43% (significativos en núcleos como el rafe magnus y el parabraquial dorsal), en clara discrepancia con Sato et al. (2007). En el caso del rafe dorsal, si consideramos la ratio funcionalidad/densidad el balance es a una menor eficacia en la señalización (más receptores para mantener la función) lo que iría en consonancia con los estudios en muestras *postmortem* de deprimidos suicidas que demuestran aumentos en la densidad del receptor 5-HT_{1A} compensatorios ante una disminución de la actividad serotoninérgica (Stockmeier et al., 1998) y con los estudios funcionales de PET en humanos que demuestran una menor fijación potencial a los receptores 5-HT_{1A} (Bmax/Kd ratio) presinápticos (Meltzer et al., 2004; Drevets et al., 2007).

En relación al núcleo del rafe magnus y los núcleos parabraquiales (éstos últimos no analizados en el estudio de Sato et al., 2007) es importante recordar que son áreas no tradicionalmente ligadas a la depresión, sino que más bien intervienen en fenómenos de transmisión y control del dolor, y además el rafe magnus es un área extremadamente caudal, por lo que es difícil establecer similitudes con el humano. La aparente diferencia en los niveles de receptor en las diferentes núcleos del rafe no es extraña, ya que se trata de un área extremadamente regionalizada y diversa en cuanto a la expresión del nivel de autorreceptores 5-HT_{1A} ya que proyecta y recibe aferencias nerviosas de una amplia variedad de regiones cerebrales dependiendo del núcleo concreto analizado (Puig et al., 2005; Boldrini et al., 2008). Es conocido el papel del núcleo del rafe magnus en el control descendente del dolor: la serotonina liberada por las neuronas de este núcleo en la médula espinal y en el núcleo trigémino produce antinocicepción (Brodie y Proudfit, 1986; Bowker y Abbott, 1990). Además, la propia serotonina (Llewelyn et al., 1984; Hentall et al., 2000) y los distintos subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} (Pazos y Palacios, 1985; Pazos et al., 1985; Pompeiano et al., 1992; Li y Bayliss, 1998) aquí presentes son importantes funcionalmente dentro del propio rafe magnus para modular la actividad eléctrica neuronal y por ende, la transmisión y/o la modulación nociceptiva (Kiefel et al., 1992). Esta serotonina del rafe magnus procede bien de las aferencias desde la sustancia gris periacueductal (Beitz, 1982) o de los colaterales axónicos y dendritas de las propias neuronas del rafe magnus (Pan et al., 1993; Potrebic et al., 1993). Estos cambios en el receptor 5-HT_{1A} tras la bulbectomía (hiperfuncionalidad) junto a los también hemos encontrado para el 5-HTT y los otros receptores serotoninérgicos, como luego veremos, podrían contribuir a explicar la alteración en la sensibilidad dolorosa observada tras la bulbectomía y como el tratamiento con fluoxetina es capaz de revertir esa alteración nociceptiva (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b).

En cuanto al aumento en la densidad del receptor 5-HT_{1A} en el núcleo parabraquial dorsal hemos de hacer las mismas consideraciones en relación con la modulación nociceptiva; además esta región tiene una amplia conexión de aferencias y eferencias con el núcleo del tracto solitario, relacionado con el sistema parasimpático, y tiene eferencias directas hacia el tálamo y de ahí proyecta hacia la corteza parietal,

frontal, insular y cingular; existen también otras conexiones con el hipotálamo lateral y la amígdala. Así pues, el aumento de receptores a este nivel podría estar relacionado con el aumento de receptores detectado en corteza, indicando una fuerte conexión entre la corteza y los núcleos parabraquiales.

Uno de los hallazgos más relevantes es el efecto que el tratamiento crónico con fluoxetina induce sobre la densidad/funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} del rafe dorsal en el animal control al igual que en el animal bulbectomizado. En cuanto al animal control, la fluoxetina desensibiliza el receptor 5-HT_{1A} en ambos núcleos del rafe dorsal y mediano. Los estudios electrofisiológicos demuestran que la estimulación de estos autorreceptores atenúa la actividad eléctrica de la neuronas serotonérgicas del rafe (Blier y Montigny 1990.; Stahl, 1998) y como consecuencia la liberación de 5-HT al espacio sináptico (Sharp et al., 1993); como lo demuestran múltiples evidencias clínicas y preclínicas es necesaria esta desensibilización de los autorreceptores 5-HT_{1A} para que aparezca el efecto terapéutico de los antidepresivos (Piñeyro et al., 1994; Sayer et al., 1999; Dremencov et al., 2000). Esta desensibilización del receptor inducida por fluoxetina en el animal control también aparece en áreas límbicas bien del telencéfalo (hipocampo CA₁-CA₂ y giro dentado al igual que lo observado en el animal bulbectomizado) o diencefalo (hipotálamo dorsomedial); sin embargo, el antidepresivo indujo hipersensibilidad en áreas corticales. Con relación a la densidad del receptor 5-HT_{1A} en el animal control no hemos encontrado cambios significativos salvo una regulación a la baja en el septo lateo-dorsal, en concordancia con el trabajo de Le Poul et al. (2000) en el que utilizando también fluoxetina a una dosis similar (8 mg/kg/día) y durante 2-3 semanas no encontraron cambios en la densidad autorradiográfica del receptor 5-HT_{1A}; también coincide con los previamente publicado por nuestro grupo (Castro et al., 2003).

En el animal bulbectomizado, el tratamiento crónico con fluoxetina intenta “normalizar”, las alteraciones en la densidad/ funcionalidad del receptor observadas tanto a nivel de áreas encefálicas como en los núcleos del tronco y consecuencia de las adaptaciones en la vías serotonérgicas que se producen por la bulbectomía; son cambios inducidos por el antidepresivo que se reflejan en una regulación a la baja en la densidad

(i.e. corteza entorrinal, ciertos núcleos del rafe) o en una desensibilización funcional (i.e. corteza frontoparietal, hipocampo, amígdala y núcleo dorsal del rafe) o en una “normalización” funcional (i.e. corteza entorrinal y rafe magnus). Otros autores también han encontrado una disminución en la densidad máxima de receptores 5-HT_{1A} en membranas de corteza cerebral del ratón bulbectomizado y tratado con amitriptilina o trazodona pero ausencia de cambios con imipramina (Gurevich et al., 1993). Sin embargo, el tratamiento crónico con buspirona durante 2 semanas no provocó una reducción en la densidad autorradiográfica del receptor 5-HT_{1A} más allá de la observada en el animal bulbectomizado (Sato et al., 2007) a pesar de normalizar la síntesis regional de 5-HT en el animal bulbectomizado (Watanabe et al., 2003) como lo hace el citalopram, otro antidepresivo ISRS tipo fluoxetina (Hasegawa et al., 2005).

En el animal bulbectomizado, el núcleo del rafe mediano muestra un comportamiento diferencial tras el tratamiento con fluoxetina en comparación con el animal control puesto que apreciamos una hipersensibilidad tras el antidepresivo. Aunque no tenemos explicación para este hecho, podríamos estar ante algo similar, en el animal, a lo descrito en estudios funcionales en humanos (Boldrini et al., 2008): una hipofuncionalidad en la parte más dorsal del rafe dorsal pero una hiperfuncionalidad en la zona más ventral del rafe dorsal (la que proyecta a la corteza prelímbica) pero aplicándolo al rafe dorsal y mediano en nuestro caso.

En relación al núcleo del rafe magnus y los núcleos parabraquiales, ya hemos comentado anteriormente su papel en la modulación nociceptiva; los efectos inducidos por la fluoxetina sobre la densidad del receptor 5-HT_{1A}, además de los que se ven en el 5-HTT y otros receptores en estos núcleos, en el cerebro del animal bulbectomizado podrían estar relacionados con la atenuación de la hipersensibilidad dolorosa que vemos en este modelo animal (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b).

Si realizamos una descripción detallada por áreas vemos, en primer lugar que el tratamiento crónico con fluoxetina no produjo ningún cambio en la densidad en áreas corticales en el animal control, coincidiendo con los datos de experimentos realizados en deprimidos postmortem (Sargent et al., 2000; Moses-Kolko et al., 2007), aunque

funcionalmente sí observamos una hipersensibilización del receptor a nivel de la corteza frontoparietal. En cambio, en la rata bulbectomizada el tratamiento con fluoxetina revirtió la regulación a la alta de los receptores en la corteza entorrinal y la hiperfuncionalidad de la corteza frontoparietal, devolviendo la homeostasis al sistema en ambas áreas y aportando datos sobre la similitud existente en cuanto a disregulación serotoninérgica que comparten la depresión y el modelo de bulbectomía olfatoria bilateral en áreas corticales (Arango et al., 1995). En los núcleos septales, el antidepresivo revierte la hiperfuncionalidad observada en el animal bulbectomizado en un comportamiento similar a lo detectado en la corteza frontoparietal; por el contrario el antidepresivo indujo una regulación a la baja en la densidad de receptores en el septo latero-dorsal del animal control. No tenemos una explicación clara para este efecto, pero desde un punto de vista anatómico-funcional el área septal forma parte del sistema límbico (emocional) y ha estado siempre muy ligado con diferentes tipos de sensaciones placenteras. Además hay una correlación entre una actividad neuronal atenuada en esta área con el comportamiento conductual de tipo depresivo en animales que muestran un alto grado de ansiedad (Muigg et al., 2007); además hay bastantes evidencias experimentales de que la actividad neuronal en el septo lateral contribuye a la fisiopatología de la depresión y al efecto terapéutico de los antidepresivos (Sheehan et al., 2003).

El hallazgo de una desensibilización funcional del receptor 5-HT_{1A} del hipocampo tanto en el animal control como bulbectomizado merece ser comentado: es un dato muy discutido en la literatura, pues a pesar de que está ampliamente aceptado que la mejora de la transmisión serotoninérgica es uno de los principales mecanismos de acción de los antidepresivos, los resultados publicados son contradictorios. Algunos autores evidencian la hipersensibilización de estos receptores, como nosotros mismos, en estudios autorradiográficos utilizando la misma vía y dosis de fluoxetina (Castro et al., 2003), y también otros autores en estudios electrofisiológicos (Blier y Montigny, 1994); esta discrepancia puede ser debida a la distinta cepa de rata utilizada en el presente trabajo (*Sprague-Dawley*) y en el de Castro et al (2003) (*Wistar*), de hecho se ha demostrado que la cepa influye en las acciones conductuales y neuroquímicas que producen los antidepresivos en roedores (Lahmame et al., 1997; López-Ruvalcaba y

Lucki, 2000; Tejani-Butt et al., 2003). Otros estudios defienden la postura contraria, la desensibilización de estos receptores postsinápticamente además de presinápticamente (Dremencov et al., 2000; Sayer et al., 1999) tras el tratamiento crónico con antidepresivos lo que supuestamente conduciría a una mayor disponibilidad de serotonina en el medio para acoplarse a otros subtipos de receptores serotoninérgicos (Mizuta y Segawa, 1988; Yildiz et al., 2001; Naudon et al., 2002).

En el hipotálamo encontramos una desensibilización significativa de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos, que mantienen su densidad, en los animales control tratados con fluoxetina, un dato concordante con la literatura y con la idea de una desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos en varias áreas del sistema nervioso central tras la administración crónica con antidepresivos (Li et al., 1996; Dremencov et al., 2000).

En la amígdala observamos una clara desensibilización del receptor 5-HT_{1A} significativa tanto en el animal control como bulbectomizado; este dato, que va en paralelo a lo encontrado en hipocampo, sobre todo en el animal bulbectomizado es de enorme relevancia, al igual que describíamos para la expresión del 5-HTT, puesto que desde la amígdala (a donde llegan aferencias de los bulbos olfatorios) salen proyecciones a muchas áreas en la que hemos descrito cambios adaptativos en el receptor 5-HT_{1A} como la corteza frontoparietal y de aquí a hipotálamo y otras regiones límbicas así como al tronco cerebral, representando un sistema clave que puede ser influenciado y modulado por estímulos externos, y que juega un papel fundamental en la respuesta conductual del animal al ambiente aversivo. Wrynn et al. (2000) han demostrado que los cambios neurodegenerativos tras la bulbectomía tienen su reflejo en este núcleo que muestra una intensa inmunoreactividad para serotonina junto a un aumento en la inmunoreactividad para los genes de expresión tardía Jun que modulan los procesos de supervivencia y plasticidad neuronal; en el ratón bulbectomizado, los antidepresivos parecen revertir los procesos neurodegenerativos presentes en los núcleos basolaterales de la amígdala (Jarosik et al., 2007).

Podemos concluir, como colofón, que el animal bulbectomizados presenta una serie de cambios adaptativos en la densidad y funcionalidad receptor 5-HT_{1A} que reflejan claramente la disfunción serotoninérgica que caracteriza a este modelo animal de depresión, en algunos casos similares a los observados en enfermos deprimidos. El tratamiento crónico con fluoxetina ejerce, en general, un efecto “normalizador” en la señalización serotoninérgica mediada a través del receptor 5-HT_{1A}, consecuencia de su efecto modulador del tono serotoninérgico endógeno. Los cambios adaptativos en el receptor 5-HT_{1A} tras la bulbectomía olfatoria y el hecho de que la mayoría de esos cambios sean revertidos tras el tratamiento crónico con fluoxetina apoyan la validez constructiva y confirman la validez predictiva de este modelo animal de depresión.

2.3. Receptor 5-HT_{1B}

La bulbectomía olfatoria bilateral en la rata no indujo, en general, cambios relevantes en la señalización serotoninérgica (densidad y/o funcionalidad) mediada a través del receptor 5-HT_{1B} salvo en dos áreas en las que se detectó una hiperfuncionalidad real y significativa, el núcleo del rafe magnus y el hipotálamo ventromedial (incrementos del \approx 50% en la estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTP γ S inducida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B/D} GTI) y que fue revertida por fluoxetina. En el resto de áreas cerebrales sólo se observan tendencias al cambio, así en la corteza frontoparietal del animal bulbectomizado hay una tendencia a la hipofuncionalidad (que desaparece con fluoxetina) reflejada como una reducción en la fijación específica [³⁵S]GTP γ S estimulada por GTI pero en ausencia de cambios proporcionales en la densidad.

Tras el tratamiento crónico con fluoxetina no se observaron modificaciones en la densidad del receptor 5-HT_{1B} en el cerebro del animal bulbectomizado, pero el tratamiento con el antidepresivo indujo cambios diferenciales en su funcionalidad de una forma región-dependiente. A nivel encefálico, se observaron cambios en estructuras límbicas bien hacia una mayor señalización o funcionalidad del receptor 5-HT_{1B} en el septo lateroventral y en las áreas CA₁-CA₂ del hipocampo, o bien hacia una

“normalización” de la hiperfuncionalidad que se había detectado en el hipotálamo ventromedial tras la bulbectomía. En cambio a nivel del tronco cerebral del animal bulbectomizado, los resultados demuestran claramente el efecto desensibilizador de la fluoxetina sobre el receptor 5-HT_{1B}, sin cambios en la densidad, en todos los núcleos estudiados con reducciones significativas con respecto a los valores observados en el grupo de animales control no tratados.

En el animal control, la fluoxetina produjo también cambios diferenciales según las áreas analizadas: a nivel de los núcleos encefálicos se observó una tendencia a la reducción en el número de receptores 5-HT_{1B} en áreas límbicas (significativa en el septo latero-dorsal y en el hipotálamo dorsomedial) y en ciertas áreas corticales (frontoparietal) pero sin afectarse de manera significativa la funcionalidad; por el contrario, en el tronco del encéfalo detectamos una desensibilización o hipofuncionalidad del receptor 5-HT_{1B} a nivel de la sustancia gris periacueductal (29% de reducción en la estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS inducida por GTI con respecto al animal control no tratado) pero una hipersensibilidad o hiperfuncionalidad en ciertos núcleos del rafe (mediano y magnus), y en ambos casos sin cambios significativos en la densidad.

Es necesario reseñar que, a la hora de interpretar los datos sobre cambios en la densidad y/o funcionalidad de los receptores 5-HT_{1B} en un área cerebral en particular, la técnica autorradiográfica aquí empleada no permite determinar la contribución relativa de los autorreceptores y heterorreceptores, aunque los primeros suelen representar una pequeña fracción de los sitios de fijación de los radioligandos selectivos (Boschert et al., 1994); sería muy tentador especular que los cambios aquí observados se debiesen primordialmente a consta de adaptaciones en la población de los heterorreceptores 5-HT_{1B}, aunque evidentemente se necesitaría la confirmación experimental.

Este es el primer trabajo donde se analizan de forma conjunta los cambios adaptativos en la densidad y/funcionalidad del receptor 5-HT_{1B} en este modelo animal de depresión crónica y su modulación por fluoxetina. Tampoco hay trabajos en donde se hayan evaluado los posibles efectos conductuales de fármacos agonistas y/o

antagonistas del receptor 5-HT_{1B} sobre el síndrome de bulbectomía olfatoria. Como se apuntó en la introducción, los receptores 5HT_{1B} se encuentran localizados a nivel presináptico en el terminal axónico de las neuronas serotonérgicas controlando inhibitoriamente la liberación de la propia serotonina (autorreceptores 5-HT_{1B}), pero también se localizan a nivel postsináptico funcionando como heterorreceptores 5-HT_{1B} en neuronas no serotonérgicas donde actuarían inhibiendo la liberación de otros neurotransmisores, de manera que tal y como evidencian estudios preclínicos y clínicos, estarían modulando fenómenos como la repuesta y sensibilidad al estrés, los mecanismos de recompensa, la ansiedad, la agresividad y el ánimo (Clark y Neumaier, 2001). Aunque, como ya hemos comentado, no hay estudios en el animal bulbectomizado sobre el receptor 5-HT_{1B}, si hay estudios con modelos animales genéticos (knockout de 5-HT_{1B}) en los que se demuestra la participación de los receptores 5-HT_{1B} en la reactividad al estrés y en las acciones de los antidepresivos (Gingrich y Hen, 2001); además, estudios farmacológicos confirman las acciones conductuales diferenciales de agonistas y antagonistas del receptor 5-HT_{1B} en test preclínicos predictivos de actividad ansiolítica y antidepresiva (Tatarczynska et al., 2004).

Nuestros resultados sobre los cambios adaptativos del receptor 5-HT_{1B} en el animal bulbectomizado, definidos por la ausencia de cambios en su densidad no concuerdan con los obtenidos en otros modelos animales de depresión: en la literatura hay estudios que demuestran la implicación del receptor 5-HT_{1B} en la respuesta adaptativa a situaciones estresantes/novedosas como es el caso del modelo de indefensión aprendida (Edwards et al, 1991, 1992) o el modelo genético de las ratas sensibles *Flinders* (Hasegawa et al., 2006). Así, se ha descrito un aumento en la densidad del receptor 5-HT_{1B} en la corteza, el hipocampo y el septo, pero una reducción en el hipotálamo (Edwards et al., 1991 y 1992) y a un aumento en la expresión de su ARNm a nivel del núcleo dorsal del rafe (Neumaier et al., 1997), todo ello asociado a un déficit en la liberación de serotonina a nivel de las áreas corticales (Petty et al., 1992) tras la exposición aguda al estrés en el paradigma de la indefensión aprendida. En el modelo genético de depresión de la rata sensible *Flinders* también se ha observado un

aumento de la densidad del receptor 5-HT_{1B} en numerosas áreas cerebrales en comparación con los animales control o *naive* (Hasegawa et al., 2006).

Estas diferencias con nuestros resultados podrían deberse a cuestiones de tipo metodológico: el marcaje del receptor 5HT_{1B} se lleva a cabo con [¹²⁵I]-GTI (agonista) en el trabajo de Edwards et al, (1991,1992) y con [³H]-5HT (en presencia de antagonistas 5-HT_{1A} y 5-HT₂) en el trabajo de Hasegawa et al. (2006), mientras que nosotros hemos utilizado la forma radiactiva del antagonista GR125,743 que marca receptores tanto acoplados como no acoplados, a diferencia de los radioligandos agonistas que solo se fijan a los receptores funcionales (acoplados). Sin embargo, es más probable que esta discrepancia sea debida a los mecanismos adaptativos desarrollados sobre el sistema serotoninérgico para cada modelo animal de depresión en concreto. De hecho, se han descrito diferencias entre nuestro modelo de bulbectomía olfatoria y el de las ratas *Flinders* sensibles con relación a varios marcadores de la función serotoninérgica como son el contenido tisular de 5-HT (Lumia et al., 1992; Van der Stelt et al., 2005) y la síntesis regional de 5-HT (Watanabe et al., 2003 y 2006; Hasegawa 2006) que podrían explicar esas diferencias en la regulación o los cambios adaptativos a nivel de los receptores 5-HT_{1B}, al igual que ocurría con el receptor 5-HT_{1A} y que ya hemos comentado anteriormente. Además, desde el punto de vista conductual, el síndrome de bulbectomía olfatoria supone un modelo de depresión agitada o depresión con ansiedad comórbida e hiperactividad (Song y Leonard, 2005; Wang et al., 2007; Roche et al., 2008), mientras que, por ejemplo, el de ratas *Flinders* ha sido propuesto como modelo de depresión con retardo psicomotor, un tipo de depresión también descrito en humanos (Lapierre y Butter, 1980). También, en el propio modelo de indefensión aprendida se encuentran cambios diferenciales en la densidad del receptor 5-HT_{1B} al subdividir los animales en resistentes y sensibles al estrés (Neumaier et al, 2002), lo que apoyaría la idea de cambios adaptativos dependientes del fenotipo conductual del animal objeto de estudio.

En nuestro modelo de bulbectomía olfatoria, no observamos cambios en significativos en la densidad del receptor 5-HT_{1B} pero si en la funcionalidad, aunque encontramos hiperfuncionalidad solamente en un área límbica, el hipotálamo

ventromedial, que además se revierte con fluoxetina. De hecho, en general, la tendencia en el animal bulbectomizado sería más bien a la hipofuncionalidad del receptor 5-HT_{1B}, como es el caso de la corteza frontoparietal, donde se observa una cierta hipofuncionalidad que podría llevar a una desinhibición de la liberación de glutamato debido a la desensibilización de los heterorreceptores 5-HT_{1B} en las neuronas glutamatérgicas; este incremento en la liberación de glutamato en respuesta a un ambiente novedoso podría contribuir a la hiperexcitabilidad de la amígdala en la rata bulbectomizada, que es uno de los motivos por el que estas ratas muestran su hiperactividad típica en el test del campo abierto (Song y Leonard, 2005).

En cuanto a lo descrito en la literatura, algunos autores han postulado que los receptores 5-HT_{1B} estarían supersensibilizados en condiciones patológicas como la depresión, la ansiedad y el trastorno obsesivo-compulsivo (Moret y Briley, 2000), pero también se ha propuesto, en base a otras evidencias experimentales, que la menor actividad de los heterorreceptores 5-HT_{1B} podría incrementar las conducta impulsivas y de agitación psicomotriz (Clark y Neumaier 2001). En este mismo contexto, se ha descrito una menor expresión cerebral de la p11 (proteína que interactúa con el receptor 5-HT_{1B} permitiendo su expresión y, sobre todo, su funcionalidad en la membrana sináptica) en modelos animales de depresión y en muestras de pacientes deprimidos (Ruf y Bhagwagar, 2009); además, los animales knockout para p11 exhiben un fenotipo depresivo, muestran una menor respuesta a agonistas 5-HT_{1B} y una menor respuesta a los efectos conductuales de los antidepresivos; por el contrario, los antidepresivos y la terapia electroconvulsiva aumentan la expresión de esta proteína p11 (Svenningsson et al., 2006).

Cuando nos fijamos en el tronco cerebral, a nivel del rafe magnus encontramos cambios significativos en forma de una hiperfuncionalidad del receptor 5-HT_{1B} (aumento en la fijación específica de [³⁵S]GTPγS inducida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B/D} GTI del +53% con respecto al grupo control) que se asocia a un cierto aumento en la densidad de receptores (+18%), aunque no significativo estadísticamente. Los receptores 5-HT_{1B} modulan la actividad serotoninérgica del rafe magnus por su localización tanto en los terminales serotoninérgicos (autorreceptores)

procedentes de la sustancia gris periacueductal (Hentall et al., 2000) como en los terminales glutamatérgicos (heterorreceptores) que llegan hasta estos núcleos caudales del rafe (Li y Bayliss, 1998). En nuestro animal bulbectomizado, modelo de disregulación serotoninérgica, podríamos especular que la existencia de una hiperfuncionalidad de los autorreceptores 5-HT_{1B} provocaría una menor disponibilidad sináptica de 5-HT; la hiperfuncionalidad a nivel de los heterorreceptores de terminales glutamatérgicos, a su vez, una menor disponibilidad de glutamato. Estos cambios en el receptor 5-HT_{1B} tras la bulbectomía (hiperfuncionalidad) junto a los ya mencionados para el 5-HTT y el receptor 5-HT_{1A}, podrían contribuir a explicar esa alteración en la sensibilidad dolorosa que observamos tras la bulbectomía olfatoria en la rata (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005 a).

Tras el tratamiento crónico con fluoxetina observamos cambios diferenciales entre los animales control y los bulbectomizados así como diferencias regionales (tronco del cerebro vs. áreas encefálicas) en la expresión y funcionalidad del receptor 5-HT_{1B}. En el animal bulbectomizado, muchos de los cambios significativos observados en la funcionalidad son revertidos por el antidepresivo (i.e. hipotálamo ventromedial, rafe magnus). Lo mismo cabría comentar para esa tendencia a la hipofuncionalidad en áreas corticales: la fluoxetina parece restablecer esa funcionalidad. De ser así, la actividad de los heterorreceptores 5-HT_{1B} se reflejaría en una inhibición de la liberación de glutamato, que dejaría de hiperexcitar a la amígdala de la rata bulbectomizada, contribuyendo a la aparición del efecto terapéutico beneficioso que se observa en el test del campo abierto tras la administración crónica de fluoxetina.

Sin embargo, a nivel de las capas CA₁-CA₂ del hipocampo y del septo lateroventral la fluoxetina indujo hipersensibilidad. Aunque no tenemos una explicación plausible para este efecto sobre estas áreas límbicas, es importante recordar el papel de la transmisión colinérgica en el control de la ansiedad: la activación de los heterorreceptores 5-HT_{1B} en hipocampo inhibe la liberación de acetilcolina y la fuente primaria de “inputs” colinérgicos al hipocampo es el septo (Colgin et al., 2003). Se ha demostrado que la acetilcolina puede regular el estado ansioso en el test del laberinto elevado (File et al., 1998), y por tanto los cambios en los heterorreceptores 5-HT_{1B} del

animal bulbectomizado podrían estar relacionados con estos procesos; así, la fluoxetina modularía esta señalización, lo que podría reflejarse en los efectos conductuales que se valoran en otros paradigmas experimentales descritos en la literatura para el animal bulbectomizado (laberinto en cruz, laberinto acuático etc...) (Song y Leonard, 2005; Wang et al., 2007; Roche et al., 2008).

En el hipotálamo, el antidepresivo reduce la densidad del receptor en el animal control y la funcionalidad en el animal bulbectomizado (hipotálamo ventromedial) lo que concuerda, en cierto modo, con la regulación a la baja de los receptores 5-HT_{1B} descrita en el hipotálamo anterior tras el tratamiento crónico con antidepresivos como desipramina y paroxetina (Sayer et al., 1999).

En el tronco cerebral del animal bulbectomizado, encontramos una clara y significativa desensibilización del receptor 5-HT_{1B} en los núcleos del rafe dorsal y mediano. Aunque el receptor 5-HT_{1A} es el fundamental en el control de la actividad neuronal del rafe dorsal y rafe mediano, hay evidencias experimentales de la contribución funcional del autorreceptor 5-HT_{1B} de estos núcleos en determinadas circunstancias, como lo demuestran Evrard et al. (1999) en los ratones knockout para el receptor 5-HT_{1B} o los estudios del grupo de Stamford (Davidson y Stamford, 2000). Tras la administración crónica de paroxetina, en estudios que miden liberación de 5-HT en rodajas de rafe dorsal de rata se observa una desensibilización del autorreceptor 5-HT_{1B} cuando el control por parte del autorreceptor 5-HT_{1A} queda anulado (Davidson y Stamford, 2000). Sin embargo, Bosker et al. (1995) han descrito que la fluvoxamina no desensibiliza el receptor 5-HT_{1B} del rafe mediano. Nuestros resultados apoyarían la desensibilización del receptor 5-HT_{1B} en los núcleos del rafe dorsal y mediano tras la administración crónica de fluoxetina, sugiriendo que estos cambios funcionales puedan contribuir a las acciones beneficiosas del antidepresivo sobre la conducta del animal bulbectomizado.

A nivel de rafe magnus, en nuestro modelo animal encontramos que la hiperfuncionalidad es revertida por fluoxetina. Ya hemos comentado como los auto y heterorreceptores 5-HT_{1B} del rafe magnus modularían su actividad serotoninérgica

(Hentall et al., 2000; Li y Bayliss, 1998). Esta “normalización” en la funcionalidad del receptor 5-HT_{1B} (probablemente a nivel de los autorreceptores) en el animal bulbectomizado (modelo de disregulación serotoninérgica) inducida por fluoxetina, equilibraría los niveles tisulares/sinápticos de 5HT, lo que podría ayudar a explicar la “normalización” de la sensibilidad dolorosa en este modelo animal tras la administración crónica del antidepresivo (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b). Sin embargo, un hallazgo paradójico es que la fluoxetina crónica desensibilizó el receptor 5-HT_{1B} del rafe magnus en el animal bulbectomizado pero produjo hipersensibilidad en el rafe magnus y en el rafe mediano del animal control. Como hemos comentado, también hay heterorreceptores 5-HT_{1B} en terminales glutamatérgicos que actúan inhibiendo las sinapsis excitatorias en los núcleos caudales del rafe (Li y Bayliss, 1998) y, por otro lado, hay evidencias de la participación del glutamato en esta vía descendente del dolor y en las acciones de los opioides (Van Praag y Frenk, 1990). Aunque sería necesaria su comprobación experimental, podríamos especular que la hipersensibilidad de estos receptores 5-HT_{1B} produce una menor actividad excitatoria que contribuiría al efecto analgésico que la fluoxetina, administrada de forma crónica, induce en los animales control (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b).

En este mismo contexto de modulación nociceptiva habría que interpretar la desensibilización significativa del receptor 5-HT_{1B} observada en la sustancia gris periacueductal tras el tratamiento crónico con fluoxetina, tanto en el animal control como en el bulbectomizado, teniendo en cuenta la relevancia funcional de esta área sobre el control descendente del dolor (Beitz, 1982; Géranton et al., 2008).

El tratamiento crónico con fluoxetina en el animal control redujo de forma significativa la densidad del receptor 5-HT_{1B} en el septo y en el hipotálamo; la tendencia a la regulación a la baja inducida por el antidepresivo también se ve en la mayoría de la áreas encefálicas estudiadas (reducciones de 15-35%) con disminuciones paralelas pero menos acusadas en la funcionalidad, que en ninguno de los casos resultaron significativas. En la literatura podemos encontrar estudios con resultados variados sobre la modulación de este receptor dependiendo de la técnica, del parámetro analizado (densidad o función) y del área cerebral analizada. Se han descrito tanto una

regulación a la baja (Johanning et al., 1992) como una ausencia de cambios en la densidad del receptor 5-HT_{1B} (Montero et al., 1991) tras el tratamiento crónico con ISRS. Por otra parte, estudios funcionales sobre el control inhibitorio que los autorreceptores 5-HT_{1B} ejercen sobre liberación de 5-HT y el efecto de los antidepresivos arrojan resultados variables: desensibilización para algunos (Mongeau et al., 1997) pero ausencia de efectos para otros (Auerbach y Horth, 1995; Gobbi et al., 1997). Lo mismo ocurre con los estudios “in vitro” habiéndose encontrado una regulación a baja de los autorreceptores en el hipocampo (Blier y Bouchard, 1994) y el hipotálamo (Moret y Briley, 1990; Blier y Bouchard, 1994) pero no en la corteza frontal (Blier y Bouchard, 1994) de los animales tratados con citalopram o paroxetina.

El grupo de Le Poul et al. (2000) ha analizado también por técnicas autorradiográficas los posibles cambios en la densidad del receptor 5-HT_{1B} en el cerebro de rata tras el tratamiento crónico (2-3 semanas) con fluoxetina a dosis similares a las empleadas en nuestro estudio (8 mg/kg/día, vía i.p.): no encontraron cambios en ninguna de las regiones estudiadas (sustancia negra, globo pálido, estriado, colículo superior y subiculum) aunque si se observaron aumentos en la expresión del ARNm del receptor en la corteza y el estriado. Sin embargo, no estudiaron áreas corticales ni áreas límbicas como el hipotálamo y el septo, en donde nosotros encontramos reducciones significativas en la densidad del receptor. Otras diferencias a tener en cuenta son de tipo metodológico como el uso del agonista GTI marcado radiactivamente que emplean en su estudio (en nuestro caso el antagonista GR125,743) o la administración del antidepresivo por vía i.p. (minibomba subcutánea en nuestro estudio). Tampoco observaron cambios en la expresión del ARNm del receptor 5-HT_{1B} a nivel del rafe lo que apoyaría el hallazgo de ausencia de cambios en los autorreceptores 5-HT_{1B} en terminales serotoninérgicos. Sin embargo, otros autores si han demostrado reducciones de la expresión del ARNm en el rafe dorsal tras el tratamiento de paroxetina o fluoxetina crónica pero sin observar cambios en el ARNm del receptor 5-HT_{1B} en neuronas no serotoninérgicas (heterorreceptores) del hipocampo, la corteza y el estriado (Neumaier et al., 1996).

Podemos concluir que en el animal bulbectomizados no se aprecian cambios relevantes en la densidad y funcionalidad del receptor 5-HT_{1B}. Sin embargo, el tratamiento crónico con fluoxetina induce en este modelo animal de depresión cambios diferenciales en la funcionalidad del receptor de una forma región-dependiente: hipersensibilidad y “normalización” de la funcionalidad en ciertas áreas límbicas (septo, hipocampo, hipotálamo) y un claro efecto desensibilizador en núcleos del tronco cerebral. Podríamos postular que aunque la bulbectomía olfatoria no produce cambios significativos en el receptor 5-HT_{1B}, si parece haber una modulación de su funcionalidad por el antidepresivo que podría contribuir a los efectos conductuales observados en este modelo animal tras su administración crónica.

2.4. Receptor 5-HT_{2A}

Tras la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata, tanto en ausencia como en presencia del tratamiento con fluoxetina, se observan sobre todo cambios en la densidad más que en la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} (a diferencia de lo descrito para los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}). Ello puede deberse a la dificultad técnica para valorar el grado de acoplamiento funcional de los receptores 5-HT_{2A} mediante la técnica de fijación específica de [³⁵S]GTPγS.

En el animal bulbectomizado apreciamos un patrón diferencial dependiendo de las áreas cerebrales estudiadas: una regulación a la alta bastante marcada en la corteza frontoparietal interna y un poco más moderada en el caudado-putamen; en cambio, se aprecian disminuciones significativas en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en áreas diencefálicas (hipotálamo) y del tronco cerebral (rafe magnus). Es importante resaltar que el tratamiento crónico con fluoxetina revierte esa regulación a la alta detectada en áreas corticales del animal bulbectomizado aunque no modifica la densidad en el hipotálamo y rafe magnus. Además, se aprecia una cierta hipersensibilidad del receptor 5-HT_{2A} en la corteza cingular del animal bulbectomizado y tratado con fluoxetina, también presente en el animal control tras el tratamiento con el antidepresivo.

También observamos una hipersensibilidad a nivel del giro dentado del hipocampo en los animales control tras el tratamiento con fluoxetina. Además, el antidepresivo induce en el animal control una regulación a la baja, y significativa, de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en el rafe mediano y rafe dorsal así como en el hipotálamo ventromedial.

En la literatura hay varios estudios que han analizado los cambios adaptativos en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en animales de experimentación, inclusive el modelo animal de depresión de bulbectomía olfatoria, mediante estudios con radioligandos bien en membranas o en secciones. Uno de los hallazgos más relevantes de nuestro estudio es la significativa regulación a la alta que se observa en la corteza frontoparietal en este modelo animal de depresión, dato concordante con los hallazgos en la corteza frontal de pacientes deprimidos suicidas (Stanley y Mann 1983; Arango et al., 1990). Esta regulación a la alta se observa también en el caudado-putamen de la rata bulbectomizada. Además, en ambas áreas, esta regulación se revierte total (en la corteza) o parcialmente (caudado-putamen) después de la administración crónica de fluoxetina, de acuerdo también con los resultados obtenidos por otros autores, utilizando animales de experimentación “normales” o *naive*, y con distintos antidepresivos como desipramina (Peroutka y Snyder, 1980; Eison et al., 1991), imipramina (Watanabe et al., 2003), venlafaxina (McGrath y Norman, 1998) y también fluoxetina (Stolz y Marsden., 1981; Wamsley et al., 1987).

Estos cambios adaptativos tras la bulbectomía y su reversión por antidepresivos en este modelo animal también han sido referidos por otros autores, principalmente en estudios de fijación de radioligandos a membranas. En la rata bulbectomizada, McGrath y Norman (1998) han observado una fuerte tendencia al aumento en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en áreas corticales, que revirtió tras la administración crónica de venlafaxina. Igualmente, el antidepresivo desipramina redujo la densidad del receptor 5-HT_{2A} en la corteza, pero no en el hipocampo, de la rata bulbectomizada (Mudunkotuwa y Horton, 1996). También en el ratón bulbectomizado se ha detectado un aumento de la densidad en la corteza frontal (Gurevich et al., 1993). Sin embargo, Slotkin et al. (2005) encuentran cambios dependiendo de la edad de la rata bulbectomizada, mostrando las

ratas jóvenes una ligera reducción a nivel cortical pero ausencia de cambios en las ratas adultas que si exhibieron una marcada reducción en la densidad del receptor a nivel del estriado.

En lo que respecta a estudios funcionales, se ha demostrado un aumento significativo en la funcionalidad del receptor en la rata bulbectomizada en un síndrome comportamental típicamente asociado al receptor 5-HT_{2A}, la generación de “head twitches” inducida por el agonista 5-HT_{2A} DOI, lo que indicaría una supersensibilidad del receptor y apoyaría la existencia de ese aumento en la señalización a través de este receptor (Nakagawasai 2003); además, se ha demostrado la reducción en la sensibilidad de los receptores 5-HT_{2A} en este paradigma experimental tras la administración de varios antidepresivos como la fluoxetina, la sertralina y el citalopram (Maj y Moryl, 1993). Por el contrario, otros autores han descrito supersensibilidad del receptor 5-HT_{2A} tras la administración crónica de ISRS en otros ensayos funcionales (aumento en la expresión de *c-fos* inducida por DOI o de la hidrólisis de fosfatidil-inositol inducida por 5-HT) (Cadogan et al., 1993).

En cuanto a la relevancia funcional de esta regulación a la alta que vemos en la corteza del animal bulbectomizado, es importante recordar que los receptores 5-HT_{2A} corticales se encuentran localizados postsinápticamente en neuronas piramidales glutamatérgicas, estimulando la liberación de glutamato. Hemos descrito anteriormente una regulación a la baja del heterorreceptor 5HT_{1B} a nivel cortical, también presente en neuronas glutamatérgicas, en el cerebro del animal bulbectomizado, Así pues, encontramos una disminución en la densidad de receptores con respuesta final inhibitoria (5-HT_{1B}) y un aumento en la densidad de receptores con respuesta final excitatoria (5-HT_{2A}), ambos cambios produciendo el mismo efecto en estas neuronas, aumentando la liberación de glutamato, lo que podría estar relacionado con la hiperexcitabilidad de la amígdala propia de la rata bulbectomizada que se traduciría conductualmente como esa hiperactividad típica en el test del campo abierto. Podríamos postular que el efecto positivo de la fluoxetina en esta alteración conductual postbulbectomía sería reflejo de una “normalización” inducida por el antidepresivo

sobre la expresión/función de ambos subtipos de receptores y por lo tanto sobre la señalización serotoninérgica del circuito cortico-amigdalario.

En el hipocampo del animal bulbectomizado no observamos cambios significativos aunque hay una tendencia al incremento que no parece persistir tras el tratamiento con fluoxetina. Aunque no hay datos sobre el receptor 5-HT_{2A} del hipocampo en las ratas bulbectomizadas y en los pacientes deprimidos, esta tendencia es paralela a lo que hemos observado en la corteza. De cualquier manera, la ausencia de significación se corresponde con otros estudios que reflejan ausencia de cambios tras la administración de antidepresivos (Peroutka y Snyder, 1980; Fuxe et al., 1983).

A nivel del hipotálamo encontramos un descenso en la densidad de receptores 5-HT_{2A} en las ratas bulbectomizadas así como en las ratas control tratadas con fluoxetina. En el hipotálamo, los receptores 5-HT_{2A} modulan la liberación de la hormona liberadora de corticotropinas (Calogero et al., 1989); en la rata bulbectomizada se ha demostrado una clara disfunción en el eje HPA con alteraciones en la liberación de neuropéptidos y de otros neurotransmisores hipotalámicos lo que podrían contribuir a las alteraciones conductuales en la respuesta al estrés y en el comportamiento sexual de la rata bulbectomizada (Song y Leonard, 2005); además, se ha demostrado que la activación de receptores 5-HT_{2A}, mediante el agonista DOI, tienen un papel protector frente a disfunciones en el comportamiento sexual (Maswood et al., 1996). Así pues, parece evidente que los cambios en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en el hipotálamo podrían relacionarse con esas alteraciones en la respuesta al estrés y en la conducta sexual. En cuanto a la reducción en la densidad del receptor 5-HT_{2A} inducida por fluoxetina en ratas control no tenemos una explicación plausible, aunque podría relacionarse con los efectos adversos sobre la libido y el funcionamiento sexual que aparecen, en clínica, tras el tratamiento crónico con antidepresivos. De cualquier manera es una adaptación receptorial, que como ya hemos comentado anteriormente, se observa en muchos estudios como consecuencia de la administración crónica de antidepresivos.

Un dato discordante con ese efecto desensibilizador de la fluoxetina sobre el receptor 5-HT_{2A}, lo constituye el resultado obtenido en la corteza cingular y en el

hipocampo; efectivamente, si nos fijamos en el parámetro funcionalidad (fijación específica de [³⁵S]GTPγS inducida por la agonista TCB-2) vemos aumentos significativos en la corteza cingular de los animales tratados con fluoxetina tanto los animales control como los bulbectomizados, así como en el giro dentado de los animales control tratados con fluoxetina. Estos aumentos en la funcionalidad van asociados a aumentos proporcionales en la densidad (ratio funcionalidad/densidad cercana a 1), lo que apoyaría algunos estudios de la literatura que refieren una regulación a la alta en la expresión del receptor 5-HT_{2A} tras la administración crónica de antidepresivos (Dumbrille-Ross y Tang, 1983; Wamsley et al., 1987; Hrdina y Vu, 1993).

Los resultados obtenidos a nivel del tronco cerebral tanto en los animales control como los bulbectomizados merecen un comentario aparte. Detectamos una reducción en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en el rafe magnus del animal bulbectomizado que no se revierte tras el tratamiento con fluoxetina, sino que es incluso potenciada por el antidepresivo. Por otra parte, el tratamiento con el antidepresivo induce una regulación a la baja en dos núcleos caudales del rafe en el animal control (rafes mediano y magnus). Ya hemos comentado como desde el punto de vista anatómico-funcional, el rafe magnus es un centro clave en la regulación descendente del dolor por ser origen de vías descendentes serotoninérgicas de tipo inhibitorio (Brodie y Proudfit, 1986; Bowker y Abbot, 1990) y que además su actividad está regulada por la serotonina a través de los distintos tipos de receptores aquí presentes 5-HT₁ y 5-HT₂ (Pazos et al., 1985; Pazos y Palacios, 1985; Pompeiano et al., 1992; Li y Bayliss, 1998). Además, se ha demostrado la modulación de la analgesia opioide por fármacos selectivos del receptor 5-HT₂ inyectados localmente en el rafe magnus (Kiefel et al., 1992). Aunque serían necesarios estudios complementarios, podemos especular que las alteraciones en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en el rafe magnus que observamos en nuestros animales podrían contribuir a los cambios en la sensibilidad dolorosa inducidos por la bulbectomía y al efecto antinociceptivo de la fluoxetina en el animal control (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2005b). En cuanto a la regulación a la baja en el núcleo del rafe mediano que observamos en el animal control y que no aparece en el animal bulbectomizado, lo que no sorprende por haberse también visto diferencias en la regulación de otros receptores

(i.e. 5-HT_{1B}), no tenemos una explicación clara para ella, aunque, podría estar relacionado con el control o modulación de la nocicepción que vemos en el animal control tras el tratamiento crónico con el antidepresivo (Nayebi y Charkhpour, 2006).

Se podría concluir postulando que la regulación a la alta en varias regiones telencefálicas (producidas probablemente como mecanismo compensatorio ante el déficit de transmisión serotoninérgica) coincide con los hallazgos en pacientes deprimidos, y que el tratamiento crónico con fluoxetina revierte dichas alteraciones, por lo que los datos obtenidos aportan más solidez y validez constructiva/predictiva al modelo de bulbectomía olfatoria como modelo animal de depresión.

3. Cambios adaptativos en el sistema endocannabinoide (receptor CB₁) inducidos por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata y efecto de la administración crónica de fluoxetina

Este es el primer estudio que analiza de forma conjunta la densidad y funcionalidad del receptor CB₁ en el modelo animal de bulbectomía olfatoria y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina utilizando técnicas radiométricas bien en secciones o en homogeneizado de membranas cerebrales. Como hemos comentado en la introducción, el interés de estudiar este sistema de neurotransmisión se debe a la existencia de evidencias en la literatura sobre cambios en el sistema endocannabinoide en otros modelos de depresión/ansiedad como es el paradigma de “estrés crónico moderado impredecible” en roedores y su modulación por antidepresivos (Hill et al., 2006a; Bortolato et al., 2007; Hill et al., 2008); además hay numerosos trabajos que muestran la profunda interrelación entre el sistema serotoninérgico y el endocannabinoide (ver introducción).

Los resultados de los estudios autorradiográficos y de los estudios de fijación en membranas de corteza prefrontal demuestran que no sólo en la corteza prefrontal (Bortolato et al., 2007; Hill et al., 2008), sino en prácticamente la totalidad de las áreas medidas existe una hiperfuncionalidad del receptor CB₁. Efectivamente, en nuestros

estudios autorradiográficos se observa un aumento de la señalización endocannabinoide mediada a través del receptor CB₁ tanto en núcleos del tronco cerebral (i.e. sustancia negra y rafe magnus) como en áreas del telencéfalo (corteza, septo e hipocampo) y del diencéfalo (i.e. hipotálamo). Esta hiperfuncionalidad es real (valores de ratio funcionalidad/densidad incluso de 4,4 en el septo) y se debe al enorme incremento en la eficacia de acoplamiento del receptor a la proteína G (aumento en la estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS por el agonista CB₁ WIN 55212-2, +140% vs. fijación basal en el septo laterodorsal) asociado a esa tendencia a la reducción en el número de receptores CB₁ (entre - 10% a -30% con respecto a los valores del grupo control), en prácticamente todas la áreas cerebrales.

Otro de los hallazgos relevantes de nuestros estudios autorradiográficos es que el tratamiento crónico con fluoxetina en el animal bulbectomizado tiende a producir el efecto inverso a lo producido por la bulbectomía, en un intento de reducir esa hiperseñalización endocannabinoide, bien mediante la reducción en la eficacia de acoplamiento del receptor a la proteína G (funcionalidad) en ciertas áreas (significativa para la corteza entorrinal y el septo laterodorsal) y/o el incremento en la densidad del receptor CB₁ en otras (de forma significativa en el giro dentado y la amígdala). En cambio, en el animal control, el tratamiento crónico con fluoxetina, a diferencia de lo que ocurre en el bulbectomizado, no induce cambios significativos ni en la densidad ni en la funcionalidad del receptor excepto en áreas muy concretas (i.e. desensibilización en hipotálamo ventromedial).

Todos estos resultados autorradiográficos tienen su confirmación en los ensayos de fijación del [³H]-CP55940 a receptores CB₁ y de estimulación de la fijación específica de [³⁵S]GTPγS por el agonista CB₁ WIN 55212-2 en homogeneizados de corteza prefrontal, que permitieron caracterizar de forma más detallada los posibles cambios en la densidad máxima y afinidad del receptor CB₁ así como en la eficacia y potencia del agonista WIN 55212-2 para estimular la fijación de [³⁵S]GTPγS. Los datos obtenidos en ambos tipos de ensayos en membranas demuestran, de nuevo, el incremento en la señalización endocannabinoide en la corteza prefrontal tras la bulbectomía olfatoria consecuencia de una aumento en la densidad máxima del receptor

CB₁ sin cambios en su afinidad y el aumento en su eficacia máxima de acoplamiento a la proteína G. Además, en estos estudios se observa claramente cómo el tratamiento crónico con fluoxetina revierte de forma significativa, a valores similares a los del animal control, tanto la densidad como la funcionalidad del receptor CB₁ de la corteza prefrontal en el animal bulbectomizado sin producir efecto alguno en el animal control. Estos resultados sobre los cambios en la corteza prefrontal del animal bulbectomizado están en concordancia con los estudios clínicos que demuestran elevados niveles de endocannabinoides, receptores CB₁ y de su funcionalidad en corteza prefrontal de suicidas deprimidos (Hungund et al., 2004; Vinod y Hungund, 2006), un área donde los endocannabinoides parecen regular el ánimo, la agresión, la impulsividad, y la capacidad para tomar decisiones, que están alteradas en el suicidio (Egerton et al., 2006; Vinod y Hungund, 2006).

Nuestros datos en el animal bulbectomizado están, en general, en buena consonancia con los del grupo de Hill en modelos animales de “estrés crónico moderado impredecible”. Estos autores demuestran un incremento significativo tanto en el ARNm (Bortolato et al., 2007) como en la densidad del receptor CB₁ (Hill et al. 2008) en la corteza prefrontal de roedores expuestos al paradigma del “estrés crónico moderado impredecible”, otro modelo animal de depresión crónica validado. Los resultados de nuestros estudios en membranas de corteza prefrontal confirman este hecho, además de demostrar, por primera vez, un aumento en la funcionalidad, reflejando que el cambio conlleva una mayor señalización real del sistema endocannabinoide mediada a través del receptor CB₁. Sin embargo, en su estudio Hill et al. (2008) también describen reducciones significativas en la densidad del receptor CB₁ en membranas de hipocampo, hipotálamo y estriado ventral así como una ausencia de cambios en la amígdala. En nuestro estudio autorradiográfico también detectamos una tendencia a la reducción en la densidad autorradiográfica del receptor CB₁ pero que solo resultó significativa en el caso del núcleo septal laterodorsal. Las diferencias metodológicas entre ambos estudios (autorradiografía vs. ensayos de fijación en membranas) podría explicar que no concuerden totalmente los resultados en ciertas áreas. Un aspecto importante a reseñar es que nosotros si hemos realizado una medida funcional del receptor CB₁, a diferencia de Hill et al., (2008), que nos ha permitido demostrar la

hiperfuncionalidad del receptor CB₁ en la mayoría de las áreas cerebrales analizadas, incluso en núcleos donde estos autores detectaron reducciones (hipocampo, hipotálamo, estriado) o ausencia de cambios (amígdala) en la densidad del receptor CB₁; futuros experimentos de este tipo en animales expuestos al “estrés crónico moderado impredecible” permitirían determinar el estado de funcionalidad del sistema endocannabinoide en este modelo animal de depresión.

Uno de los datos más relevantes de nuestro estudio es que el tratamiento crónico con fluoxetina revierte esos cambios en la corteza prefrontal y atenúa los cambios observados en la densidad y funcionalidad que habíamos detectado en el animal bulbectomizado en otras áreas cerebrales mediante técnicas autorradiográficas. Además, nuestros resultados concuerdan con los del grupo de Hill et al., (2008) que demuestran como la imipramina revierte el incremento en la densidad del receptor CB₁ de la corteza prefrontal de ratas expuestas al “estrés crónico moderado impredecible”.

En la literatura existen numerosos estudios sobre la modulación de la neurotransmisión de serotonina por endocannabinoides y viceversa, la modulación del sistema endocannabinoide mediante la manipulación farmacológica de la transmisión de serotonina (ver introducción). El tratamiento crónico con fluoxetina reduce la expresión de genes codificantes (ARNm) para el receptor CB₁ en el caudado putamen de rata (Oliva et al., 2005); el tratamiento crónico con citalopram induce una reducción en la funcionalidad de este receptor en el hipocampo y el hipotálamo de rata, dos áreas importantes en el control de la función endocrina y anímica; y la administración crónica de desipramina induce un aumento en la densidad del receptor CB₁ en el hipocampo y en el hipotálamo de rata (Hill et al., 2006a). Además, otro tipo de tratamientos aplicados en humanos con fines antidepresivos parecen modular el sistema endocannabinoide: la terapia electroconvulsiva reduce la densidad del receptor CB₁ en la corteza prefrontal y en el hipocampo de rata, aunque la incrementa en la amígdala (Hill et al, 2007); y, la privación de sueño incrementaría el contenido tisular de ligandos endocannabinoides en el hipocampo de rata (Chen y Bazan 2005).

Es importante recordar que en los animales bulbectomizados el tratamiento crónico con fluoxetina revirtió la hiperactividad típica del síndrome de bulbectomía observada en el test del campo abierto. Esta normalización de la conducta es fácilmente entendible desde el punto de vista de la “normalización” o los cambios adaptativos que la fluoxetina induce sobre sus dianas farmacológicas directas (5-HTT) e indirectas (receptores serotoninérgicos pre y postsinápticos) que hemos ido describiendo e interpretando en los apartados anteriores, pero es más difícil comprender la vinculación con el sistema endocannabinoide, aunque éste debe estar contribuyendo de alguna manera a la manifestación conductual del animal bulbectomizado. En este sentido, experimentos realizados en nuestro laboratorio (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009) demuestran que una dosis aguda del agonista cannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabinol (5 mg/kg, i.p.) atenúa la hiperactividad típica del animal bulbectomizado al igual que lo hace la administración crónica de fluoxetina, sin afectar la conducta del animal control. Sin embargo esa misma dosis no alteraba la conducta del animal bulbectomizado una vez tratado con fluoxetina y revertida la hiperactividad postbulbectomía, puesto que el antidepressivo habría ejercido ya su efecto “normalizador” sobre la señalización vía receptor CB₁: parece evidente que esta señalización CB₁ alterada del animal bulbectomizado contribuiría de manera importante a la manifestación conductual de hiperactividad. En base a todos estos datos, podríamos especular que los cambios en la señalización vía receptor CB₁ aparecerían, al menos en ciertas áreas (i.e. corteza cerebral), como mecanismo compensatorio de las alteraciones conductuales y neuroquímicas inducidas en el sistema serotoninérgico por la bulbectomía; una vez corregida la disregulación serotoninérgica propia del animal bulbectomizado, los cambios en el sistema endocannabinoide (receptor CB₁) ya no serían necesarios. Es evidente que con nuestra aproximación experimental no podemos determinar el mecanismo molecular por el que una elevada concentración de receptores CB₁ y con mayor funcionalidad es revertida por el tratamiento crónico con fluoxetina. En este sentido, Devlin y Christopoulos (2002) mostraron que la serotonina reduce la unión de los agonistas cannabinoides HU210 y WIN 55212-2 en membranas cerebrales de rata, fenómeno en el que parecen intervenir los receptores 5-HT_{2A}; estos datos, que sugieren una modulación recíproca entre los receptores serotoninérgicos y cannabinoides y podrían ayudar a explicar los efectos de la fluoxetina crónica en la densidad de receptores CB₁,

sobre todo en áreas cerebrales en las que también hemos detectado cambios significativos en la densidad/funcionalidad de receptores serotoninérgicos (i.e. regulación a la alta en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en corteza frontoparietal; i.e. hiperfuncionalidad del receptor 5-HT_{1A} en este mismo área).

En relación a la relevancia farmacológica de nuestros resultados sobre la densidad y/o funcionalidad del receptor CB₁ en este modelo animal de depresión, es difícil aventurar cuál sería la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide con la finalidad de obtener un efecto terapéutico sobre las manifestaciones depresivas y/o ansiosas. De hecho, todavía es materia de debate si el tratamiento debería ser con agonistas o antagonistas o agonistas inversos del receptor CB₁. De acuerdo a nuestros estudios con el cannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabinol en el animal bulbectomizado (Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2009), parece claro que la activación/potenciación de la señalización vía receptor CB₁ resultaría beneficiosa (Hill et al., 2009). En línea con nuestros resultados, la estimulación del sistema endocannabinoide con agonistas produjo efectos antidepresivos y ansiolíticos en la rata (Berrendero y Maldonado 2002; Gobbi et al., 2005; Bambico et al. 2007), efecto que parece estar vinculado, al igual que para los antidepresivos serotoninérgicos, a un incremento en los procesos de neurogénesis hipocampal (Jiang et al. 2005). También se ha demostrado que los ratones knockout del receptor CB₁ exhiben conductas de tipo ansioso y depresivo (Haller et al. 2002; Martin et al. 2002; Urigüen et al. 2004). Por el contrario, dosis altas de agonistas cannabinoides evocan conductas depresivas en roedores (Shearman et al. 2003; Tzavara et al. 2003a); y antagonistas/agonistas inversos del receptor han demostrado actividad antidepresiva en modelos animales (Shearman et al. 2003; Tzavara et al. 2003a; Griebel et al. 2005). Un dato especialmente relevante es el que proviene de ensayos clínicos con el antagonista CB₁ rimonabant: se observó una incidencia elevada de depresión en determinados pacientes (Griebel et al. 2005; Van Gaal et al. 2005); este resultado obtenido en seres humanos apoya de forma clara la posibilidad de que es la potenciación del sistema endocannabinoide la que puede tener interés terapéutico en depresión (Hill et al., 2009).

Podemos concluir que la bulbectomía olfatoria induce cambios relevantes en la señalización endocannabinoide que se asemejan a los encontrados en pacientes deprimidos suicidas, en particular la densidad y funcionalidad del receptor CB₁ en áreas como la corteza prefrontal. Además, el efecto que la fluoxetina ejerce sobre esas alteraciones de la densidad/funcionalidad del receptor CB₁ refuerza la existencia de una interrelación entre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide relevante de cara a la patofisiología y el tratamiento de la depresión. Además, todos estos hallazgos confirman, de nuevo, la utilidad del modelo de bulbectomía olfatoria en la rata como modelo de depresión crónica con validez predictiva y constructiva además de paradigma experimental para explorar la implicación del sistema endocannabinoide en la neurobiología y el tratamiento de la depresión.

4. Cambios adaptativos en las vías de plasticidad neuronal y neurogénesis inducidos por la bulbectomía olfatoria bilateral en la rata: efecto de la administración crónica de fluoxetina

En nuestro estudio hemos analizado la expresión de varios marcadores moleculares relacionados con la neurogénesis y la plasticidad neuronal desde las dos semanas a los tres meses postbulbectomía. Además, hemos analizado la expresión de esos marcadores tras la administración crónica de fluoxetina durante 14 días en el animal bulbectomizado, e iniciando el tratamiento dos semanas después de la bulbectomía; estos estudios nos pueden proporcionar una valiosa información sobre el correlato molecular que acompaña a todas esas alteraciones conductuales y neuroquímicas en los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide que hemos descrito y discutido en los párrafos anteriores.

Los estudios que hay en la literatura científica con relación a estos marcadores moleculares de plasticidad celular y neurogénesis en el animal bulbectomizado, y su modulación por fluoxetina, son muy escasos; éste trabajo es uno de los primeros estudios que realiza este tipo de análisis sobre las vías celulares que gobiernan la neuroplasticidad y los procesos de neurogénesis en este modelo animal de depresión

crónica. En el mamífero adulto, por el momento, la neurogénesis está restringida a dos regiones muy concretas, los bulbos olfatorios y el hipocampo (Gage, 1998; Gould et al., 1999b; Gross, 2000). En nuestros estudios nos hemos centrado en la neurogénesis localizada en la zona subgranular del hipocampo, ya que los bulbos olfatorios son extraídos en nuestro modelo animal. En modelo de la rata bulbectomizada, en los últimos años, se ha descrito que el tratamiento crónico con antidepresivos promueve la neurogénesis en el hipocampo (Malberg et al., 2000) regulando a la alta la cascada AMPc-CREB, la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), su receptor correspondiente (TrkB) y varios de los elementos de su cascada (ERK/pERK) (Nibuya et al., 1995, 1996; Thome et al., 2000) así como la vía de la β -catenina y varias de las enzimas implicadas en su regulación como la AKT (Mostany et al., 2008), confirmando la relevancia de la relación entre estas cascadas y la neurogénesis.

4.1. Receptor TrkB y factor BDNF

En nuestro estudio, no hemos visto ningún cambio significativo en ninguna de las dos subunidades del receptor TrkB, aunque se observa una tendencia al descenso en la expresión de las mismas tras la bulbectomía, en línea con lo que se describirá con respecto a los niveles de expresión de AKT y β -catenina en el hipocampo de estos animales. Tras la bulbectomía parece haber un descenso en sus niveles de expresión que se recuperan después de tres meses, alcanzando los valores mostrados por los animales control e incluso sobrepasándolos. No hemos encontrado, en la literatura hasta ahora revisada, ningún estudio previo con relación al modelo de bulbectomía, siendo nuestros resultados, por lo tanto, totalmente novedosos.

La activación del receptor TrkB por BDNF pone en marcha una cascada de señalización de la MAP quinasas, incluyendo proteínas como ERK/pERK, y que culmina en un aumento de CREB en el núcleo que pondrá en marcha la transcripción de numerosos genes (Finkbeiner 2000). En este sentido, Vergaño-Vera et al. (2006) y Chiaramello et al. (2007) han encontrado datos que apuntan a la importancia tanto del BDNF como del receptor TrkB en la supervivencia y la migración de células

progenitoras de los bulbos olfatorios; sin embargo, otros grupos como el de Galvao et al., (2008) defienden una postura contraria, sustrayéndole una función principal al BDNF en la neurogénesis adulta. Nuestros resultados está claro que indican una cierta implicación del receptor TrkB, al menos relativa, con respecto a la diferenciación de neurogénesis entre los animales bulbectomizados y los animales control, siguiendo un patrón temporal que relaciona su proceso de recuperación con el de las otras proteínas relacionadas con neurogénesis investigadas.

En cuanto a la expresión de las dos subunidades del receptor TrkB tras el tratamiento crónico con fluoxetina, podemos hablar de una tendencia general al aumento en la subunidad menor tanto en el hipocampo de las ratas control como de las bulbectomizadas, y de una tendencia mayor para la subunidad mayor del receptor en las ratas bulbectomizadas. Este estudio sobre la expresión de la proteína receptora TrkB en el hipocampo, valorada mediante técnicas de western-blot, lo hemos completado con ensayos de hibridación *in situ* analizando la expresión de su ARNm en varias áreas del hipocampo y en la corteza prefrontal complementando la información aportada por los resultados anteriores. Podemos observar cómo en la corteza prefrontal de los animales bulbectomizados encontramos un menor marcaje del material genético codificante (ARNm) para estos receptores TrkB que en las ratas control.

Un hallazgo realmente relevante es que el tratamiento crónico con fluoxetina revierte dicho descenso en la expresión del ARNm de TrkB, si bien no llega al nivel mostrado por las ratas control, aunque el aumento sea muy significativo estadísticamente. Ya hemos hablado de la importancia de este receptor en las vías de señalización celular relacionadas con neurogénesis, y con su ligando endógeno el factor neurotrófico BDNF. Por otra parte, podemos encontrar evidencias en la literatura sobre la importante relación del receptor TrkB con el efecto de los antidepresivos: Banasr y Duman (2008) demostraron la ausencia total del efecto ejercido por la fluoxetina y la imipramina sobre la neurogénesis en los ratones mutantes para el receptor TrkB, demostrando, de este modo, que este receptor ejercería un efecto clave en la acción de los antidepresivos sobre la neurogénesis hipocampal. En este sentido, nuestros resultados muestran esa tendencia a la alta que ejerce la fluoxetina sobre estos

receptores en la rata bulbectomizada, lo que podría estar indicando un intento por parte de este sistema neurotrópico de mejorar esta cascada de señalización mediante el aumento del número de receptores TrkB, un resultado acorde con los datos de la literatura.

Debemos incluir en esta sección la discusión de los resultados de los estudios de hibridación *in situ* para el BDNF, ligando endógeno del receptor TrkB. Los niveles de expresión del ARNm para este factor neurotrópico están disminuidos tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo del animal bulbectomizado, coincidiendo con los resultados obtenidos en pacientes deprimidos (Duman et al., 1997). La literatura correspondiente a los animales bulbectomizadas es mucho menos clara en cuanto a esos cambios: Hellweg et al., (2007) describen un aumento de los niveles de expresión del BDNF en el hipocampo de ratón, mientras que otros autores como Van Hoomissen et al. (2003) no encuentran ningún cambio en la rata *Long-Evans* bulbectomizada, al igual que Buckland y Cunningham (1998) tampoco en sus estudios con los ratones bulbectomizados. Todas estas diferencias en las observaciones experimentales pueden deberse a múltiples variables, entre ellas la especie y cepa utilizada. En nuestro estudio también observamos que tras el tratamiento crónico con fluoxetina, los niveles de expresión del ARNm de BDNF en estas áreas aumentan y alcanzan los mostrados por las ratas control, hasta un restablecimiento completo de su expresión, en consonancia con los datos proporcionados por el grupo de Duman en sus estudios con muestras cerebrales de pacientes deprimidos (Nibuya et al., 1996; Duman et al., 2001).

Así pues, podemos postular que la fluoxetina aceleraría los mecanismos compensatorios que el sistema pone en marcha para intentar restablecer la homeostasis en esta cascada de señalización, aumentando la expresión de receptores TrkB y del factor trófico BDNF, demostrándose una vez más los efectos beneficiosos de este antidepresivo en el modelo de rata bulbectomizada y su relación con la neurogénesis hipocampal.

4.2. AKT

Con respecto a los niveles de expresión de AKT en el hipocampo, proteína inhibidora de la enzima GSK-3 (Cross et al., 1995), que a su vez inhibe la translocación de la proteína β -catenina al núcleo, podemos observar que los resultados son muy similares a los descritos para el receptor TrkB y también para la β -catenina (que examinaremos a continuación). Ambas proteínas, AKT y β -catenina, están directamente relacionadas, de forma que el aumento de los niveles de la AKT debería conllevar un incremento en los niveles de β -catenina. En nuestro estudio, los niveles de expresión de ambas proteínas en el hipocampo de las ratas bulbectomizadas y a lo largo de los tres meses son prácticamente iguales, con un descenso tras treinta días de la operación, recuperándose paulatinamente hasta volver a unos niveles similares a los observados en los animales control, una vez transcurridos noventa días postbulbectomía.

En nuestro estudio, observamos un descenso en los niveles de expresión de AKT en el hipocampo de las ratas bulbectomizadas con respecto a los animales control a las dos semanas postcirugía y una vez desarrollado plenamente el síndrome de bulbectomía olfatoria, siendo ésta la primera vez que se demuestra en un modelo animal de depresión. En este sentido, en pacientes deprimidos suicidas se ha descrito una baja actividad para esta enzima en la corteza prefrontal (Hsiung et al., 2003), lo que concordaría con el descenso que hemos observado en nuestro modelo de la rata bulbectomizada. Un candidato clave en este proceso es la cascada del Wnt: su activación conduce a la inhibición de la enzima GSK-3 por AKT, permitiendo así a la β -catenina estabilizarse en el citosol y translocarse al núcleo, donde activaría la transcripción de diversos genes implicados en neurogénesis (Logan y Nusse, 2004).

Un hallazgo relevante de nuestro estudio es que el tratamiento crónico con fluoxetina aumenta significativamente los niveles de expresión de AKT en el hipocampo de las ratas bulbectomizadas hasta los mostrados por las ratas control e incluso los sobrepasa. No hay datos en la literatura sobre la expresión de AKT en el modelo de la rata bulbectomizada pero si hay un estudios utilizando homogenizados de hipocampo de animales control: el tratamiento crónico con venlafaxina aumenta los

niveles citosólicos de esta enzima en el hipocampo de la rata *Wistar* (Mostany et al., 2008). El incremento en los niveles de expresión de AKT tras la administración crónica de antidepresivos reduciría la inhibición que GSK-3 ejerce sobre la translocación de la β -catenina al núcleo, y por lo tanto, está claro el efecto beneficioso de este aumento ejercido por la fluoxetina sobre la actividad de la misma.

4.3 ERK/pERK

Nuestros resultados indican un descenso en la expresión de las proteínas ERK/pERK en el hipocampo tras la bulbectomía olfatoria, en particular de la forma activada (pERK). Un descenso que, al igual que el de las otras proteínas estudiadas, se recupera con el tiempo, si bien de manera más precoz ya que a los cuarenta y cinco días se vuelven a alcanzar valores como los del grupo de los animales control, y a los noventa días los superarían con creces. La forma inactiva de la proteína (ERK) prácticamente no muestra cambios salvo un aumento a los noventa días con respecto a los animales control.

En la literatura previa existen muy pocos estudios sobre cambios en la expresión de ERK/pERK tras la bulbectomía. Se ha descrito un descenso en los niveles de expresión de ERK en varias áreas cerebrales en el ratón bulbectomizado (Moriguchi et al., 2006; Han et al., 2009) y un aumento de los mismos tras el tratamiento crónico con antidepresivos en la rata normal o *naive* (Hetman et al., 1999; Popoli et al., 2000; Tiraboschi et al., 2004), datos que irían en consonancia con los estudios que han demostrado que los niveles cerebrales de estas proteínas están muy disminuidos en los pacientes deprimidos (Hsiung et al., 2003). Las enzimas ERK/pERK, forman parte de la cadena de las MAP quinasas (entre otras), elementos intermediarios en la respuesta ejercida por el BDNF y su receptor TrkB, y que concluye con un incremento final de CREB (Finkbeiner, 2000). Podemos hipotetizar que la rata bulbectomizada tiene alterada toda esta cascada de señalización, ya que presenta un descenso en la expresión del receptor TrkB y de las formas activas de las proteínas de dicha cascada. Los datos que hemos obtenido de ERK apoyarían esta hipótesis.

En lo que concierne al efecto de los antidepresivos sobre los niveles de expresión de ERK/pERK, y en concreto tras el tratamiento crónico con fluoxetina, hay datos bastante contradictorios, habiéndose descrito tanto incrementos como descensos en animales control o *naive* (Tiraboschi et al., 2004; Fumagalli et al., 2005). En otro estudio, Mostany et al. (2008) encontraron un aumento de los niveles de expresión de ERK/pERK en homogeneizados de hipocampo tras el tratamiento crónico con venlafaxina. Nuestros resultados indican el tratamiento crónico con fluoxetina induce un aumento en la expresión de pERK tanto en la rata control como en la bulbectomizada, un dato concordante con los resultados de los estudios a los que antes se hacía referencia.

Podemos concluir que existe una activación de la vía ERK/pERK tras el tratamiento crónico con fluoxetina, activación que supondría una mejoría en la cascada de señalización de las MAPquinasas, que se reflejaría en un incremento de los niveles de expresión del producto final, CREB/pCREB, como demostramos a continuación.

4.4 CREB/pCREB

Varios autores han sugerido que CREB juega un papel crítico en la patología de la depresión (Duman et al., 1997). Existen estudios que demuestran un descenso de los niveles de CREB en varias regiones cerebrales de pacientes deprimidos (Dowlatshahi et al., 1998; Yamada et al., 2003) así como en el cerebro de la rata bulbectomizada (Wang et al., 2007) y el ratón bulbectomizado (Han et al., 2009). En este sentido, nuestros resultados van en la misma dirección, ya que la expresión de la forma activa de CREB se encuentra muy reducida en el síndrome de bulbectomía olfatoria, aunque esta reducción, al igual que sucede con otros marcadores de señalización, desaparece transcurridos noventa días desde la cirugía, volviendo a observarse unos niveles de expresión similares a los observados en el grupo de los animales control.

Una gran variedad de cascadas de señalización intracelulares implicadas en plasticidad neuronal están íntimamente relacionadas con el factor CREB (Shaywitz et al., 1999), y la fosforilación de esta proteína (pCREB) está considerada como un

marcador molecular de la respuesta al tratamiento con antidepresivos en pacientes con depresión mayor (Koch et al., 2002). La regulación a la alta en la expresión de CREB en regiones del cerebro implicadas en la conducta y los procesos cognitivos formaría parte de la respuesta molecular al tratamiento crónico con antidepresivos; de esta manera CREB aparecería como punto convergente que integraría las respuestas provenientes de las múltiples señales de transducción que son moduladas por los fármacos antidepresivos.

Nuestros estudios aportan la novedad del efecto que el tratamiento de fluoxetina crónica induce sobre la expresión de CREB en los animales bulbectomizados, observándose un incremento tanto en la expresión CREB como de pCREB; esta respuesta aparece tanto en los animales control como bulbectomizados, si bien en estos últimos es más acusada; además, estos hallazgos son muy similares a los descritos por otros autores en la rata bulbectomizada tras el tratamiento con otros antidepresivos como la imipramina y la desipramina en varias regiones cerebrales (Wang et al., 2007), y estarían en buena concordancia con los datos provenientes de los estudios con pacientes deprimidos (Duman et al., 1997, 2000; Thome et al., 2000).

En conclusión, la fluoxetina produce un aumento significativo en la expresión de CREB/pCREB, muy disminuida en los animales sometidos a bulbectomía (al igual que se observa en el cerebro de los enfermos deprimidos) y muy relacionada con la neurogénesis en hipocampo (al igual que veremos con la expresión de β -catenina).

Todos estos aumentos en los marcadores moleculares que hasta ahora hemos descrito (BDNF y TrkB, AKT, ERK/pERK y CREB/pCREB) e inducidos por el tratamiento crónico con fluoxetina coinciden con el efecto modulador del antidepresivo sobre los sistemas serotoninérgico y endocannabinoide, y con la mejora conductual del animal bulbectomizado en el test del campo abierto. En base a esto, podríamos especular sobre la existencia de una neurogénesis hipocampal deficitaria en las ratas bulbectomizadas (como pasaría en los enfermos deprimidos) que se recuperaría con el tratamiento antidepresivo, reforzando la interrelación entre neurogénesis hipocampal y mecanismo de acción de los antidepresivos. Los datos que se discuten a continuación

sobre la expresión de β -catenina y la proliferación celular en el hipocampo apoyarían esta interrelación.

4.5. β -catenina

Nuestros hallazgos demuestran un descenso en los niveles de expresión de la proteína β -catenina tras treinta días postbulbectomía en los estudios de western-blot en homogenizado de hipocampo. En nuestro seguimiento temporal de esta proteína durante tres meses, hemos observado cómo sus niveles se van recuperando paulatinamente hasta llegar a un rango equivalente al mostrado por las ratas control.

El hallazgo totalmente novedoso es que los niveles de expresión de esta proteína en el hipocampo se vieron incrementados significativamente tras el tratamiento crónico con fluoxetina, tanto en el grupo de las ratas control como el de las bulbectomizadas, en éstas últimas recuperándose su expresión hasta alcanzar unos niveles de expresión equivalentes a los mostrados por las ratas control. Es la primera vez que se estudia esta proteína y este hallazgo molecular tiene una relevancia especial, puesto que esta proteína ha sido recientemente relacionada con el efecto terapéutico de los antidepresivos, a través de la proliferación celular en hipocampo (Mostany et al., 2008).

Los estudios relativos a β -catenina y su modulación por el tratamiento crónico con fluoxetina en el modelo de la rata bulbectomizada son absolutamente novedosos. No hay tampoco estudios previos sobre la modulación de la expresión de β -catenina por el antidepresivo fluoxetina en animales de experimentación *naive* o control a pesar de que haya sido el fármaco más utilizado en estos últimos años en los estudios sobre la neurogénesis hipocampal (Malberg et al., 2000; Sairanen et al., 2005; Santarelli et al., 2003). Mostany et al. (2008) han demostrado que el tratamiento crónico con venlafaxina, un inhibidor dual de la recaptación de serotonina y noradrenalina, también aumenta los niveles de neurogénesis en el hipocampo de la rata *naive* e induce translocación nuclear de la β -catenina a través de la activación de las vías de señalización ya revisadas (AKT y Wnt), sugiriendo que este aumento de β -catenina

podría mediar la neurogénesis inducida por los antidepresivos. Nuestros resultados apuntan en la misma dirección, con un aumento significativo de su expresión en los animales control y esa recuperación en los animales bulbectomizados, en ambos casos tras el tratamiento crónico con fluoxetina, coincidiendo con la respuesta conductual de tipo antidepresivo en los animales bulbectomizados.

La expresión de β -catenina también fue analizada a nivel morfológico, mediante técnicas inmunohistoquímicas: los resultados que obtuvimos fueron los esperables y confirmatorios de los obtenidos en los ensayos de “western-blot” anteriores puesto que la expresión de β -catenina (número de células que lo expresan) están muy disminuida en el hipocampo (giro dentado) de las ratas bulbectomizadas; además también comprobamos cómo tras el tratamiento crónico con fluoxetina esa expresión se normaliza llegando a equipararse con la de las ratas control. En el grupo de las ratas control, el tratamiento crónico con fluoxetina también indujo un incremento sustancial de la expresión de β -catenina, reforzando la hipótesis ya expuesta, aunque debe subrayarse el hecho de que este aumento en la expresión de β -catenina no conlleva una respuesta conductual diferente de los animales control no tratados, a diferencia de lo observado con el grupo de los animales bulbectomizados.

4.6. BrdU como marcador de proliferación celular

Por último, decidimos realizar un estudio de proliferación celular en el hipocampo mediante el marcaje inmunohistoquímico fluorescente de la molécula BrdU, un indicador de la neurogénesis hipocampal.

En nuestro estudio podemos ver cómo la proliferación celular en el hipocampo de las ratas bulbectomizadas está muy disminuida con respecto a las ratas control y en línea con lo publicado en un único estudio anterior (Jaako-Movits y Zharkovsky, 2005). Además, en nuestro caso el tratamiento crónico con fluoxetina “normaliza” la neurogénesis hipocampal de los animales “deprimidos” (bulbectomizados) hasta un nivel equivalente a observado en el hipocampo de los animales control; en las ratas

control, el tratamiento crónico con fluoxetina también indujo ese incremento. Hay trabajos previos describiendo la deficiencia de neurogénesis en animales bulbectomizados y su reversión con otro tipo de antidepresivos no ISRS como la imipramina (Keilhoff et al., 2006) y el citalopram (Jaako-Movits et al., 2006). Sin embargo, no hay ningún estudio previo sobre la relación entre el efecto del tratamiento crónico con fluoxetina y las alteraciones en la proliferación celular en el modelo de la rata bulbectomizada, por lo que nuestro resultado es totalmente novedoso en lo que respecta a este antidepresivo y reforzaría la hipótesis de las acciones proneurogenéticas de los antidepresivos a nivel del hipocampo.

Todos estos hallazgos deben interpretarse bajo la hipótesis neurogénica de la depresión que proviene de la idea de que una neurogénesis hipocampal deficitaria está relacionada con su fisiopatología, y apoyada por los estudios que demuestran que la administración crónica, que no aguda, de antidepresivos parece oponerse a la pérdida de plasticidad neuronal inducida por la depresión a través del incremento en la proliferación celular y la supervivencia neuronal, aunque es algo que todavía estaría en discusión para algunos. El hipocampo es parte integral del sistema límbico y está involucrado en el procesamiento de la memoria emocional. Estudios recientes demuestran que la neurogénesis en los ratones puede representar un poderoso mecanismo para el proceso de borrado de eventos perjudiciales o recuerdos nocivos, lo que permitiría al hipocampo procesar nuevos eventos en la memoria (Feng et al., 2001). Puede ser que la reducción en la neurogénesis dificulte este proceso de borrado, lo que facilitaría la explicación de esos recuerdos negativos exacerbados en enfermos deprimidos (Leppanen, 2006). Si la neurogénesis en el hipocampo adulto juega un papel importante en la fisiopatología de la depresión, entonces un estado depresivo debería estar asociado con una neurogénesis reducida, si bien todavía debe estudiarse a fondo la relación entre el estado depresivo y una disfunción neurogénica (Duman et al., 1999; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003).

4.7. Correlación entre los cambios conductuales y los marcadores de neuroplasticidad en la bulbectomía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina

Como comentábamos al comienzo de esta discusión, hemos observado un descenso en los niveles de expresión de varias moléculas de señalización celular implicadas en neurogénesis y plasticidad neuronal: ese descenso llega a revertirse y alcanzar valores “normales” transcurridos 45-90 días desde la cirugía. Este dato contrasta con la presencia, durante todo este período de tiempo, de la típica hiperactividad mostrada por la rata bulbectomizada en el test del campo abierto. Aunque futuros estudios permitirán ahondar en este aspecto, una posible explicación sería que la recuperación de la expresión de todos estos marcadores moleculares implicados en neurogénesis obedece o es consecuencia de mecanismos compensatorios en el animal bulbectomizado pero que no parecen ser suficientes como para traducirse en efectos conductuales positivos y/o medibles en un test de conducta tan determinado como es el campo abierto; quizás otros paradigmas conductuales puedan reflejar respuestas que se correlacionen con ese patrón temporal de expresión de esos marcadores. En este sentido, los cambios conductuales mostrados por las ratas bulbectomizadas no sólo se restringen a la existencia de una hiperactividad en el campo abierto, que es lo hemos valorado en este estudio, también exhiben déficits en la memoria y el aprendizaje, descenso de la libido y una anhedonia en general; además presentan una conducta de ansiedad medible en los test de interacción social y el laberinto en “T” junto con manifestaciones fisiológicas como el aumento de la temperatura corporal y un ritmo cardiaco alterado. De hecho, el modelo de la rata bulbectomizada es considerado un modelo de depresión con ansiedad comórbida. Un hecho relevante es que el antidepresivo fluoxetina es capaz de revertir todas estas alteraciones conductuales y fisiológicas (Roche et al., 2008).

Como ya se ha discutido, toda una serie de marcadores moleculares de diversas cascadas de señalización intracelular juegan un papel crítico en la patología de la depresión, y parece que subyacen o al menos intervienen en el efecto terapéutico de los antidepresivos, tendiendo un puente hacia varios sistemas de neurotransmisión como los aquí estudiados, el serotoninérgico y el endocannabinoide. Hemos visto como el

tratamiento crónico con fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, modula la densidad/funcionalidad de los receptores serotoninérgicos y cannabinoides, y cómo, de manera concomitante, regula la expresión de esos marcadores moleculares implicados en neurogénesis, ayudando a la “normalización” de todas esas cascadas de señalización en las que están implicados, todas ellas evidencias experimentales que reforzarían la existencia de dicho puente o interrelación. Como hemos discutido, casi todos estos marcadores de fenómenos neurogenéticos parecen volver a la normalidad en la rata bulbectomizada tras noventa días sin tratamiento alguno, producto de mecanismos de compensación puestos en marcha para devolver la homeostasis en esos animales, y el hecho de que la fluoxetina acelere dicho proceso es otro dato más a favor de la relación entre todos estos mecanismos. Además es importante recordar que la mejoría conductual en el test del campo abierto a los 30 días de la cirugía y tras el tratamiento crónico con fluoxetina durante las dos últimas semanas coincide con la recuperación o “normalización” en la expresión de estos marcadores moleculares. La fluoxetina controlaría todos estos mecanismos de compensación, afectando además a los sistemas de neurotransmisión serotoninérgica y endocannabinoide, apoyando la posible existencia de una interrelación que, como antes apuntábamos, merece ser investigada en futuros y apasionantes estudios

Los datos obtenidos demuestran que el modelo de bulbectomía está asociado con una neurogénesis hipocampal reducida. Además, demostramos que esta reducción de la neurogénesis se revierte tras el tratamiento crónico con fluoxetina. Así pues, el incremento en la neurogénesis inducido por el tratamiento crónico con antidepresivos podría ser uno de los mecanismos por el cuál los antidepresivos revierten la conducta depresiva mostrada por las ratas bulbectomizadas.

En conclusión, todos estos hallazgos celulares, moleculares, neuroquímicos y conductuales así como el efecto ejercido por el antidepresivo fluoxetina en el animal bulbectomizado sugieren una posible validez etiológica, indican una cierta validez constructiva y confirman la clara validez predictiva de este modelo animal que manifiesta esa validez aparente con la enfermedad depresiva en el humano.

CONCLUSIONES

1. La bulbectomía olfatoria bilateral en la rata induce unas alteraciones conductuales estables y permanentes que se manifiestan en el test del campo abierto como una hiperactividad locomotora (deambulaciones) y un aumento en la actividad exploratoria (alzamientos). Estas alteraciones conductuales se revierten totalmente y de forma significativa tras el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina administrado durante 2 semanas a la dosis de 10 mg/kg/día.

2. La bulbectomía olfatoria bilateral y el tratamiento crónico con fluoxetina inducen cambios adaptativos en los siguientes marcadores de la neurotransmisión serotoninérgica:

a) En la densidad del transportador de 5-HT, la bulbectomía induce una regulación a la alta en la amígdala basolateral así como una regulación a la baja en la sustancia gris periacueductal y en el núcleo del rafe mediano. El tratamiento crónico con fluoxetina produce una acentuada y generalizada regulación a la baja en la densidad del transportador de serotonina tanto en el cerebro de los animales bulbectomizados como de los animales control.

b) Con respecto al receptor 5-HT_{1A}, la bulbectomía induce cambios diferenciales según las áreas cerebrales analizadas, apreciándose una menor señalización (hipofuncionalidad) a nivel de la corteza entorrinal, la amígdala y los núcleos del tronco cerebral, pero una clara hiperfuncionalidad en la corteza frontoparietal y en el septo laterodorsal. El tratamiento crónico con fluoxetina revierte la hiperseñalización en la corteza frontoparietal del animal bulbectomizado. Además, en general, el tratamiento crónico con el antidepresivo desensibiliza el receptor 5-HT_{1A} en la mayoría de las áreas cerebrales y, en especial a nivel de los núcleos del rafe y del hipocampo tanto el animal bulbectomizado como control.

c) Con respecto al receptor 5-HT_{1B}, no se aprecian cambios relevantes en su densidad y funcionalidad tras la bulbectomía. Sin embargo, el tratamiento crónico con fluoxetina induce en este modelo animal de depresión cambios diferenciales en la funcionalidad

del receptor de una forma región-dependiente: hipersensibilidad y “normalización” de la funcionalidad en ciertas áreas límbicas (septo, hipocampo, hipotálamo) y un claro efecto desensibilizador en núcleos del tronco cerebral.

d) Con respecto al receptor 5-HT_{2A}, la bulbectomía olfatoria bilateral y el tratamiento con fluoxetina en la rata producen cambios significativos sobre todo en su densidad en forma de regulación a la alta del receptor en la corteza frontoparietal interna y en la corteza entorrinal que son revertidas por el tratamiento crónico con fluoxetina, mientras que se observa una reducción en su densidad en el hipotálamo ventromedial y en el rafe magnus. En el animal control, la fluoxetina no produce cambios en la densidad del receptor a nivel cortical pero induce una regulación a la baja a nivel del rafe mediano y rafe dorsal así como en el hipotálamo ventromedial.

3. La bulbectomía olfatoria bilateral en la rata induce cambios adaptativos en la neurotransmisión endocannabinoide, en particular sobre la densidad y funcionalidad del receptor CB₁ que son modulados por el tratamiento crónico con fluoxetina. El hallazgo más llamativo es el aumento en la funcionalidad del receptor CB₁ en prácticamente todo el cerebro, y el hecho de que el tratamiento crónico con fluoxetina “normaliza” esta hiperseñalización endocannabinoide en ciertas áreas como la corteza entorrinal y los núcleos septales y muy especialmente en la corteza prefrontal. En el animal control, cambio, prácticamente no se observa cambio alguno en la densidad y funcionalidad del receptor CB₁ tras el tratamiento crónico con fluoxetina

4. La bulbectomía olfatoria bilateral en la rata induce una reducción significativa en los niveles de expresión de diversos marcadores moleculares de neuroplasticidad y neurogénesis hipocampal (AKT, ERK/pERK, CREB/pCREB, β-catenina) así como en la expresión del factor neurotrófico BDNF, de su receptor TrkB y en el ARNm de los mismos. El tratamiento crónico con fluoxetina produce aumentos significativos en la expresión de AKT, pERK y β-catenina hasta lograr niveles similares a los mostrados

por el animal control. El tratamiento crónico con fluoxetina también aumenta la expresión de estos últimos marcadores en el animal control.

5. La bulbectomía olfatoria bilateral en la rata induce una reducción significativa en la neurogénesis hipocampal, efecto revertido de forma significativa tras el tratamiento crónico con fluoxetina. El antidepresivo también incrementa la neurogénesis hipocampal en el animal control.

6. Todos estos hallazgos celulares, moleculares, neuroquímicos y conductuales así como el efecto ejercido por el antidepresivo fluoxetina en el animal bulbectomizado sugieren una posible validez etiológica, apoyan una cierta validez constructiva y confirman la clara validez predictiva de este modelo animal que manifiesta esa llamativa validez aparente con la enfermedad depresiva en el humano. Nuestro estudio demuestra por tanto la utilidad de este modelo animal de depresión en el estudio de la neurobiología y el tratamiento de la depresión.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Baset H, Bozovic V, Szyf M, Albert PR: Conditional transformation mediated via a pertussis toxin-sensitive receptor signalling pathway. *Mol Endocrinol.* 6:730-740, 1992
- Adayev T, El-Sherif Y, Barua M, Penington NJ, Banerjee P: Agonist stimulation of the serotonin_{1A} receptor causes suppression of anoxia-induced apoptosis via mitogen-activated protein kinase in neuronal HN2-5 cells. *J Neurochem.* 72:1489-1496, 1999
- Adell A, Castro E, Celada P, Bortolozzi A, Pazos A, Artigas F: Strategies for producing faster acting antidepressants. *Drug Discov Today.* 10:578-585, 2005
- Agren H, Koulu M, Saavedra JM, Potter WZ, Linnoila M: Circadian covariation of norepinephrine and serotonin in the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.* 397:353-358, 1986
- Albert PR, Lembo P, Storrington JM, Charest A, Saucier C: The 5-HT_{1A} receptor: Signaling, desensitization, and gene transcription. *Neuropsychopharmacology.* 14:19-25, 1996
- Albert PR, Morris SJ, Ghahremani MH, Storrington JM, Lembo PM: A putative α -helical G $\beta\gamma$ -coupling domain in the second intracellular loop of the 5-HT_{1A} receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 861:146-161, 1998
- Albert PR, Sajedi N, Lemonde S, Ghahremani MH: Constitutive G_{i2}-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT_{1A} receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem.* 274:35469-35474, 1999
- Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O: Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J Biol Chem.* 265:5825-5832, 1990
- Alheid GF, Beltramino CA, De Olmos JS, Forbes MS, Swanson DJ, Heimer L: The neuronal organization of the supracapsular part of the stria terminalis in the rat: The dorsal component of the extended amygdala. *Neuroscience.* 84:967-996, 1998
- Amaral DG, Insausti R: Retrograde transport of D-[³H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. *Exp Brain Res.* 88:375-388, 1992
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA: A G protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science.* 234:1261-1265, 1986
- Anisman H, Merali Z: Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions. *Ann Med.* 35:2-11, 2003
- Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G: A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Mol Psychiatry.* 8:646-53, 2003
- Arango V, Ernsberger P, Marzuk PM, Chen JS, Tierney H, Stanley M, Reis DJ, Mann JJ: Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT₂ and β -adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry.* 47:1038-1047, 1990
- Arango V, Huang YY, Underwood MD, Mann JJ: Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psychiatr Res.* 37:375-386, 2003
- Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ: Serotonin_{1A} receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology.* 25:892-903, 2001
- Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Mann JJ: Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res.* 688:121-133, 1995
- Artigas F, Adell A, Celada P: Pindolol augmentation of antidepressant response. *Curr Drug Targets.* 7:139-147, 2006
- Artigas F, Celada P, Laruelle M, Adell A: How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci.* 22:224-228, 2001

- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P: Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.* 19:378-383, 1996
- Auerbach SB, Hjorth S: Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 352:597-606, 1995
- Austin MC, Whitehead RE, Edgar CL, Janosky JE, Lewis DA: Localized decrease in serotonin transporter-immunoreactive axons in the prefrontal cortex of depressed subjects committing suicide. *Neuroscience.* 114:807-815, 2002
- Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM: Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology.* 14:35-46, 1996
- Backstrom I, Bergstrom M, Marcusson J: High affinity [³H]paroxetine binding to serotonin uptake sites in human brain tissue. *Brain Res.* 486:261-268, 1989
- Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K: Depression and pain comorbidity: A literature review. *Arch Intern Med.* 163:2433-2445, 2003
- Baker SP, Greenshaw AJ: Effects of long-term administration of antidepressants and neuroleptics on receptors in the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol.* 9:1-44, 1989
- Bambico FR, Katz N, Debonnel G, Gobbi G: Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci.* 27:11700-11711, 2007
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A: Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 29:450-460, 2004
- Banasr M, Duman RS: Keeping 'trk' of antidepressant actions. *Neuron.* 59:349-351, 2008
- Banerjee SP, Snyder SH, Mechoulam R: Cannabinoids: Influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 194:74-81, 1975
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T: 5-HT₂ receptor subtypes: A family re-united? *Trends Pharmacol Sci.* 16:105-110, 1995
- Bechara A, Tranel D, Damasio H: Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain.* 123:2189-2202, 2000
- Beitz AJ: The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci.* 2:829-842, 1982
- Bellivier F, Henry C, Szoke A, Schurhoff F, Nosten-Bertrand M, Feingold J, Launay JM, Leboyer M, Laplanche JL: Serotonin transporter gene polymorphisms in patients with unipolar or bipolar depression. *Neurosci Lett.* 255:143-146, 1998
- Benmansour S, Cecchi M, Morilak DA, Gerhardt GA, Javors MA, Gould GG, Frazer A: Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci.* 19:10494-10501, 1999
- Benmansour S, Owens WA, Cecchi M, Morilak DA, Frazer A: Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter. *J Neurosci.* 22:6766-6772, 2002
- Berg KA, Clarke WP, Sailstad C, Saltzman A, Maayani S: Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2_A and type 2_C receptor systems. *Mol Pharmacol.* 46:477-484, 1994
- Berrendero F, Maldonado R: Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl).* 163:111-117, 2002

- Bhagwagar Z, Hinz R, Taylor M, Fancy S, Cowen P, Grasby P: Increased 5-HT_{2A} receptor binding in euthymic, medication-free patients recovered from depression: A positron emission study with [¹¹C]MDL 100,907. *Am J Psychiatry*. 163:1580-1587, 2006
- Bhagwagar Z, Murthy N, Selvaraj S, Hinz R, Taylor M, Fancy S, Grasby P, Cowen P: 5-HTT binding in recovered depressed patients and healthy volunteers: A positron emission tomography study with [¹¹C]DASB. *Am J Psychiatry*. 164:1858-1865, 2007
- Bhagwagar Z, Rabiner EA, Sargent PA, Grasby PM, Cowen PJ: Persistent reduction in brain serotonin_{1A} receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635. *Mol Psychiatry*. 9:386-392, 2004
- Bidaut-Russell M, Devane WA, Howlett AC: Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem*. 55:21-26, 1990
- Blier P, Bouchard C: Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs. *Br J Pharmacol*. 113:485-495, 1994
- Blier P, de Montigny C: Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*. 15:220-226, 1994
- Blier P, de Montigny C: Electrophysiological investigation of the adaptive response of the 5-HT system to the administration of 5-HT_{1A} receptor agonists. *J Cardiovasc Pharmacol*. 15 Suppl 7:S42-8, 1990
- Bligh-Glover W, Kolli TN, Shapiro-Kulnane L, Dille GE, Friedman L, Balraj E, Rajkowska G, Stockmeier CA: The serotonin transporter in the midbrain of suicide victims with major depression. *Biol Psychiatry*. 47:1015-1024, 2000
- Blue ME, Yagaloff KA, Mamounas LA, Hartig PR, Molliver ME: Correspondence between 5-HT₂ receptors and serotonergic axons in rat neocortex. *Brain Res*. 453:315-328, 1988
- Boddeke HW, Fargin A, Raymond JR, Schoeffter P, Hoyer D: Agonist/antagonist interactions with cloned human 5-HT_{1A} receptors: Variations in intrinsic activity studied in transfected HeLa cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 345:257-263, 1992
- Boess FG, Martin IL: Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*. 33:275-317, 1994
- Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V: Serotonin_{1A} autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res*. 42:433-442, 2008
- Borella A, Bindra M, Whitaker-Azmitia PM: Role of the 5-HT_{1A} receptor in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. *Neuropharmacology*. 36:445-450, 1997
- Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D: Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry*. 62:1103-1110, 2007
- Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R: The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience*. 58:167-182, 1994
- Bosker FJ, Klompmakers AA, Westenberg HG: Effects of single and repeated oral administration of fluvoxamine on extracellular serotonin in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus of the rat. *Neuropharmacology*. 34:501-508, 1995
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P: Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem J*. 312:637-641, 1995
- Bowker RM, Abbott LC: Quantitative re-evaluation of descending serotonergic and non-serotonergic projections from the medulla of the rodent: Evidence for extensive co-existence of serotonin and peptides in the same spinally projecting neurons, but not from the nucleus raphe magnus. *Brain Res*. 512:15-25, 1990

- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS: Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 157:115-118, 2000
- Breuer ME, Groenink L, Oosting RS, Westenberg HG, Olivier B: Long-term behavioral changes after cessation of chronic antidepressant treatment in olfactory bulbectomized rats. *Biol Psychiatry*. 61:990-995, 2007
- Brezun JM, Daszuta A: Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. *Hippocampus*. 10:37-46, 2000
- Brodie MS, Proudfit HK: Antinociception induced by local injections of carbachol into the nucleus raphe magnus in rats: Alteration by intrathecal injection of monoaminergic antagonists. *Brain Res*. 371:70-79, 1986
- Broekkamp CL, O'Connor WT, Tonnaer JA, Rijk HW, Van Delft AM: Corticosterone, choline acetyltransferase and noradrenaline levels in olfactory bulbectomized rats in relation to changes in passive avoidance acquisition and open field activity. *Physiol Behav*. 37:429-434, 1986
- Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, Durkin MM, Mengod G, Branchek TA, Hoyer D, Palacios JM: Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} α , 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology*. 33:367-386, 1994
- Brunjes PC, Jazaeri A, Sutherland MJ: Olfactory bulb organization and development in *monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). *J Comp Neurol*. 320:544-554, 1992
- Buckland ME, Cunningham AM: Alterations in the neurotrophic factors BDNF, GDNF and CNTF in the regenerating olfactory system. *Ann NY Acad Sci*. 855:260-265, 1998
- Bunney WE Jr, Davis JM: Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry*. 13:483-494, 1965
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ: The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res*. 676:157-168, 1995
- Busch L, Sterin-Borda L, Borda E: Expression and biological effects of CB₁ cannabinoid receptor in rat parotid gland. *Biochem Pharmacol*. 68:1767-1774, 2004
- Butler J, Leonard BE: Clinical and experimental studies on fluoxetine: Effects on serotonin uptake. *Int Clin Psychopharmacol*. 5:41-48, 1990
- Butler J, Tannian M, Leonard BE: The chronic effects of desipramine and sertraline on platelet and synaptosomal 5HT uptake in olfactory bulbectomised rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 12:585-594, 1988
- Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, Phebus L, Wong DT, Perry KW: Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. 160:353-361, 2002
- Byrne SE, Rothschild AJ: Loss of antidepressant efficacy during maintenance therapy: Possible mechanisms and treatments. *J Clin Psychiatry*. 59:279-288, 1998
- Cadogan AK, Marsden CA, Tulloch I, Kendall DA: Evidence that chronic administration of paroxetine or fluoxetine enhances 5-HT₂ receptor function in the brain of the guinea pig. *Neuropharmacology*. 32:249-256, 1993
- Cain DP: The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychol Bull*. 81:654-671, 1974
- Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF: Olfactory projection systems, drugs and behaviour: A review. *Psychoneuroendocrinology*. 4:253-272, 1979
- Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF: The olfactory bulbectomized rat: a simple model for detecting drugs with antidepressant potential. *Br J Pharmacol*. 61: 497P, 1977

- Calogero AE, Bernardini R, Margioris AN, Bagdy G, Gallucci WT, Munson PJ, Tamarkin L, Tomai TP, Brady L, Gold PW: Effects of serotonergic agonists and antagonists on corticotropin-releasing hormone secretion by explanted rat hypothalami. *Peptides*. 10:189-200, 1989
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD: Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol*. 36:287-306, 1998
- Cameron HA, McKay RD: Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 435:406-417, 2001
- Castro ME, Díaz A, del Olmo E, Pazos A: Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Neuropharmacology*. 44:93-101, 2003
- Castro E, Díaz A, Rodríguez-Gaztelumendi A, del Olmo E, Pazos A: WAY100635 prevents the changes induced by fluoxetine upon the 5-HT_{1A} receptor functionality. *Neuropharmacology*. 55:1391-1396, 2008
- Castro ME, Harrison PJ, Pazos A, Sharp T: Affinity of (+/-)-pindolol, (-)-penbutolol, and (-)-tertatolol for pre- and postsynaptic serotonin 5-HT_{1A} receptors in human and rat brain. *J Neurochem*. 75:755-762, 2000
- Chemin J, Monteil A, Pérez-Reyes E, Nargeot J, Lory P: Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J*. 20:7033-7040, 2001
- Chen C, Bazan NG: Lipid signaling: Sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 77:65-76, 2005
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK: Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem*. 75:1729-1734, 2000
- Chiaravello S, Dalmasso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S: BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci*. 26:1780-1790, 2007
- Childers SR, Sexton T, Roy MB: Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem Pharmacol*. 47:711-715, 1994
- Clark MS, Neumaier JF: The 5-HT_{1B} receptor: Behavioral implications. *Psychopharmacol Bull*. 35:170-185, 2001
- Clarke WP, Yocca FD, Maayani S: Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 277:1259-1266, 1996
- Clifford EM, Gartside SE, Umbers V, Cowen PJ, Hajos M, Sharp T: Electrophysiological and neurochemical evidence that pindolol has agonist properties at the 5-HT_{1A} autoreceptor in vivo. *Br J Pharmacol*. 124:206-212, 1998
- Colgin LL, Kramar EA, Gall CM, Lynch G: Septal modulation of excitatory transmission in hippocampus. *J Neurophysiol*. 90:2358-2366, 2003
- Colino A, Halliwell JV: Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA₁ neurons by serotonin. *Nature*. 328:73-77, 1987
- Collins GG: Amino acid transmitter candidates in various regions of the primary olfactory cortex following bulbectomy. *Brain Res*. 296:145-147, 1984
- Connor TJ, Song C, Leonard BE, Anisman H, Merali Z: Stressor-induced alterations in serotonergic activity in an animal model of depression. *Neuroreport*. 10:523-528, 1999
- Coppen A: Defects in monoamine metabolism and their possible importance in the pathogenesis of depressive syndromes. *Psychiatr Neurol Neurochir*. 72:173-180, 1969

- Cortés R, Soriano E, Pazos A, Probst A, Palacios JM: Autoradiography of antidepressant binding sites in the human brain: Localization using [³H]imipramine and [³H]paroxetine. *Neuroscience*. 27:473-496, 1988
- Cowen DS, Molinoff PB, Manning DR: 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated increases in receptor expression and activation of nuclear factor-kappaB in transfected chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol*. 52:221-226, 1997
- Cowen DS, Sowers RS, Manning DR: Activation of a mitogen-activated protein kinase (ERK2) by the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor is sensitive not only to inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, but to an inhibitor of phosphatidylcholine hydrolysis. *J Biol Chem*. 271:22297-22300, 1996
- Cowen PJ, Charig EM, Fraser S, Elliott JM: Platelet 5-HT receptor binding during depressive illness and tricyclic antidepressant treatment. *J Affect Disord*. 13:45-50, 1987
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378:785-789, 1995
- Cryan JF, McGrath C, Leonard BE, Norman TR: Onset of the effects of the 5-HT_{1A} antagonist, WAY-100635, alone, and in combination with paroxetine, on olfactory bulbectomy and 8-OH-DPAT-induced changes in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 63:333-338, 1999
- Cryan JF, McGrath C, Leonard BE, Norman TR: Combining pindolol and paroxetine in an animal model of chronic antidepressant action--can early onset of action be detected? *Eur J Pharmacol*. 352:23-28, 1998
- Cryan JF, Mombereau C: In search of a depressed mouse: Utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*. 9:326-357, 2004
- Cryan JF, Page ME, Lucki I: Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 182:335-344, 2005
- D'Amato RJ, Largent BL, Snowman AM, Snyder SH: Selective labeling of serotonin uptake sites in rat brain by [³H]citalopram contrasted to labeling of multiple sites by [³H]imipramine. *J Pharmacol Exp Ther*. 242:364-371, 1987
- Davidson C, Ho M, Price GW, Jones BJ, Stamford JA: (+)-WAY 100135, a partial agonist, at native and recombinant 5-HT_{1B/1D} receptors. *Br J Pharmacol*. 121:737-742, 1997
- Davidson C, Stamford JA: Effect of chronic paroxetine treatment on 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} autoreceptors in rat dorsal raphe nucleus. *Neurochem Int*. 36:91-96, 2000
- Dawson LA, Nguyen HQ, Geiger A: Effects of venlafaxine on extracellular concentrations of 5-HT and noradrenaline in the rat frontal cortex: Augmentation via 5-HT_{1A} receptor antagonism. *Neuropharmacology*. 38:1153-1163, 1999
- De La Garza R, 2nd, Asnis GM: The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium attenuates IFN-alpha induced alterations to monoamine turnover in prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Res*. 977:70-79, 2003
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S: Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther*. 273:734-743, 1995
- Del Olmo E, López-Giménez JF, Vilaró MT, Mengod G, Palacios JM, Pazos A: Early localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptors in human brain during development. *Brain Res Mol Brain Res*. 60:123-126, 1998
- Delgado PL: Depression: The case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry*. 61 Suppl 6:7-11, 2000

- Delgado PL, Miller HL, Salomon RM, Licinio J, Heninger GR, Gelenberg AJ, Charney DS: Monoamines and the mechanism of antidepressant action: Effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. *Psychopharmacol Bull.* 29:389-396, 1993
- Delgado PL, Moreno FA: Role of norepinephrine in depression. *J Clin Psychiatry.* 61 Suppl 1:5-12, 2000
- Dennis T, Beauchemin V, Lavoie N: Antidepressant-induced modulation of GABA_A receptors and β -adrenoceptors but not GABA_B receptors in the frontal cortex of olfactory bulbectomised rats. *Eur J Pharmacol.* 262:143-148, 1994
- Dennis T, Beauchemin V, Lavoie N: Differential effects of olfactory bulbectomy on GABA_A and GABA_B receptors in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 46:77-82, 1993
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA: Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB₁ receptors in hippocampus. *J Neurochem.* 77:957-960, 2001
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA: Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci.* 23:2371-2382, 2003
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC: Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34:605-613, 1988
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor *Science.* 258:1946-1949, 1992
- Devlin MG, Christopoulos A: Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *J Neurochem.* 80:1095-1102, 2002
- Dewar KM, Grondin L, Nenonen EK, Ohayon M, Reader TA: [³H]paroxetine binding and serotonin content of rat brain: Absence of changes following antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 235:137-142, 1993
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR: Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice: Evidence for non-CB₁ non-CB₂ receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem.* 75:2434-2444, 2000
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D: Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 372:686-691, 1994
- Dickenson JM, Hill SJ: Human 5-HT_{1B} receptor stimulated inositol phospholipid hydrolysis in CHO cells: Synergy with Gq-coupled receptors. *Eur J Pharmacol.* 348:279-285, 1998
- Dickenson JM, Hill SJ: Coupling of an endogenous 5-HT_{1B}-like receptor to increases in intracellular calcium through a pertussis toxin-sensitive mechanism in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol.* 116:2889-2896, 1995
- Dillon KA, Gross-Isseroff R, Israeli M, Biegon A: Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the human brain postmortem: Effects of age and alcohol. *Brain Res.* 554:56-64, 1991
- Dohlman JG, De Loof H, Segrest JP: Charge distributions and amphipathicity of receptor-binding alpha-helices. *Mol Immunol.* 27:1009-1020, 1990
- Doménech T, Beleta J, Palacios JM: Characterization of human serotonin 1D and 1B receptors using [³H]-GR-125743, a novel radiolabelled serotonin 5HT_{1D/1B} receptor antagonist. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 356:328-334, 1997
- Doucet E, Pohl M, Fattaccini CM, Adrien J, Mestikawy SE, Hamon M: In situ hybridization evidence for the synthesis of 5-HT_{1B} receptor in serotonergic neurons of anterior raphe nuclei in the rat brain. *Synapse.* 19:18-28, 1995

- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P: RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of gbetagamma-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:10461-10466, 1997
- Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT: Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet*. 352:1754-1755, 1998
- Dremencov E, Gur E, Lerer B, Newman ME: Subchronic fluoxetine administration to rats: Effects on 5-HT autoreceptor activity as measured by in vivo microdialysis. *Eur Neuropsychopharmacol*. 10:229-236, 2000
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C: PET imaging of serotonin_{1A} receptor binding in depression. *Biol Psychiatry*. 46:1375-1387, 1999
- Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, Mathis C: Serotonin_{1A} receptor imaging in recurrent depression: Replication and literature review. *Nucl Med Biol*. 34:865-877, 2007
- Du L, Faludi G, Palkovits M, Demeter E, Bakish D, Lapierre YD, Sótónyi P, Hrdina PD: Frequency of long allele in serotonin transporter gene is increased in depressed suicide victims. *Biol Psychiatry*. 46:196-201, 1999
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ: A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*. 54:597-606, 1997
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C: Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry*. 48:732-739, 2000
- Duman RS, Malberg J, Thome J: Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*. 46:1181-1191, 1999
- Duman RS, Nakagawa S, Malberg J: Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*. 25:836-844, 2001
- Dumbrille-Ross A, Tang SW: Manipulations of synaptic serotonin: Discrepancy of effects on serotonin S1 and S2 sites. *Life Sci*. 32:2677-2684, 1983
- Dunn AJ: Footshock-induced changes in brain catecholamines and indoleamines are not mediated by CRF or ACTH. *Neurochem Int*. 37:61-69, 2000
- Edwards E, Harkins K, Wright G, Henn F: Modulation of [³H]paroxetine binding to the 5-hydroxytryptamine uptake site in an animal model of depression. *J Neurochem*. 56:1581-1586, 1991
- Edwards E, Kornrich W, Houtten PV, Henn FA: Presynaptic serotonin mechanisms in rats subjected to inescapable shock. *Neuropharmacology*. 31:323-330, 1992
- Egerton A, Allison C, Brett RR, Pratt JA: Cannabinoids and prefrontal cortical function: Insights from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 30:680-695, 2006
- Egertová M, Cravatt BF, Elphick MR: Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB₁ cannabinoid receptor expression in the mouse brain: Evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*. 119:481-496, 2003
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ: Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7579-7584, 2000
- Eison AS, Yocca FD, Gianutsos G: Effect of chronic administration of antidepressant drugs on 5-HT₂-mediated behavior in the rat following noradrenergic or serotonergic denervation. *J Neural Transm Gen Sect*. 84:19-32, 1991
- El Mansari M, Bouchard C, Blier P: Alteration of serotonin release in the guinea pig orbito-frontal cortex by selective serotonin reuptake inhibitors. relevance to treatment of obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 13:117-127, 1995
- Elphick MR, Egertová M: The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 356:381-408, 2001

- Ereshefsky L: Drug-drug interactions involving antidepressants: Focus on venlafaxine. *J Clin Psychopharmacol.* 16:37S-50S, 1996
- Evrard A, Laporte AM, Chastanet M, Hen R, Hamon M, Adrien J: 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors control the firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the mouse: Studies in 5-HT_{1B} knock-out mice. *Eur J Neurosci.* 11:3823-3831, 1999
- Fargin A, Raymond JR, Regan JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG: Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. *J Biol Chem.* 264:14848-14852, 1989
- Farvolden P, Kennedy SH, Lam RW: Recent developments in the psychobiology and pharmacotherapy of depression: Optimising existing treatments and novel approaches for the future. *Expert Opin Investig Drugs.* 12:65-86, 2003
- Feighner JP: Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry.* 60:4-11, 1999
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA: Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7656-7660, 1993
- Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ: Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron.* 32:911-926, 2001
- File SE, González LE, Andrews N: Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic₁ receptors. *Behav Neurosci.* 112:352-359, 1998
- Finkbeiner S: CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron.* 25:11-14, 2000
- Flórez J y Pazos A: Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: Flórez J, Armijo JA y Mediavilla A, editores, Farmacología Humana, 5ª edición. Elsevier España, Barcelona 2008
- Fletcher A, Cliffe IA, Dourish CT: Silent 5-HT_{1A} receptor antagonists: Utility as research tools and therapeutic agents. *Trends Pharmacol Sci.* 14:41-48, 1993
- Foguet M, Nguyen H, Le H, Lubbert H: Structure of the mouse 5-HT_{1C}, 5-HT₂ and stomach fundus serotonin receptor genes. *Neuroreport.* 3:345-348, 1992
- Francis PT, Pangalos MN, Pearson RC, Middlemiss DN, Stratmann GC, Bowen DM: 5-Hydroxytryptamine_{1A} but not 5-hydroxytryptamine₂ receptors are enriched on neocortical pyramidal neurones destroyed by intrastriatal volkensin. *J Pharmacol Exp Ther.* 261:1273-1281, 1992
- Fujiwara Y, Tomita H, Hikiji M, Kashihara K, Otsuki S, Ohnuki T, Hamagishi Y, Oki T, Sora I, Roeske WR: Characterization of a cloned rat serotonin 5-HT_{1A} receptor expressed in the HeLa cell line. *Life Sci.* 52:949-958, 1993
- Fumagalli F, Bedogni F, Slotkin TA, Racagni G, Riva MA: Prenatal stress elicits regionally selective changes in basal FGF-2 gene expression in adulthood and alters the adult response to acute or chronic stress. *Neurobiol Dis.* 20:731-737, 2005
- Fuxe K, Ogren SO, Agnati LF, Benfenati F, Fredholm B, Andersson K, Zini I, Eneroth P: Chronic antidepressant treatment and central 5-HT synapses. *Neuropharmacology.* 22:389-400, 1983
- Gaddum JH, Picarelli ZP: Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother.* 12:323-328, 1957
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J: Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol.* 36:249-266, 1998
- Galvao RP, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A: Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci.* 28:13368-13383, 2008

- Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M: Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB₁ cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 62:1385-1392, 2002
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M: Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med.* 6:313-319, 2000
- García DE, Brown S, Hille B, Mackie K: Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB₁ cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 18:2834-2841, 1998
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F: Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: Recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 10:16-27, 1996
- Garnovskaya MN, Mukhin Y, Raymond JR: Rapid activation of sodium-proton exchange and extracellular signal-regulated protein kinase in fibroblasts by G protein-coupled 5-HT_{1A} receptor involves distinct signalling cascades. *Biochem J.* 330:489-495, 1998
- Garnovskaya MN, Nebigil CG, Arthur JM, Spurney RF, Raymond JR: 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. *Mol Pharmacol.* 48:230-237, 1995
- Garnovskaya MN, van Biesen T, Hawe B, Casanas Ramos S, Lefkowitz RJ, Raymond JR: Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT_{1A} receptor via a G protein $\beta\gamma$ -subunit-initiated pathway. *Biochemistry.* 35:13716-13722, 1996
- Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A: ¹²³I-labeled AM251: A radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB₁ receptors. *Eur J Pharmacol.* 307:331-338, 1996
- Geranton SM, Fratto V, Tochiki KK, Hunt SP: Descending serotonergic controls regulate inflammation-induced mechanical sensitivity and methyl-CpG-binding protein 2 phosphorylation in the rat superficial dorsal horn. *Mol Pain.* 4:35, 2008
- Giardina WJ, Radek RJ: Effects of imipramine on the nocturnal behavior of bilateral olfactory bulbectomized rats. *Biol Psychiatry.* 29:1200-1208, 1991
- Giles H, Lansdell SJ, Bolofo ML, Wilson HL, Martin GR: Characterization of a 5-HT_{1B} receptor on CHO cells: Functional responses in the absence of radioligand binding. *Br J Pharmacol.* 117:1119-1126, 1996
- Gingrich JA, Hen R: Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* 155:1-10, 2001
- Glass M, Dragunow M, Faull RL: Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77: 299-318, 1997
- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D: Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18620-18625, 2005
- Gobbi M, Crespi D, Foddi MC, Fracasso C, Mancini L, Parotti L, Mennini T: Effects of chronic treatment with fluoxetine and citalopram on 5-HT uptake, 5-HT_{1B} autoreceptors, 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356:22-28, 1997
- Godbout R, Mantz J, Glowinski J, Thierry AM: The novel 5-HT₂ receptor antagonist, RP 62203, selectively blocks serotonergic but not dopaminergic-induced inhibition in the rat prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol.* 204:97-100, 1991

- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M: The CB₁ cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J.* 347:369-373, 2000
- González S, Fernández-Ruiz J, Di Marzo V, Hernández M, Arévalo C, Nicanor C, Cascio MG, Ambrosio E, Ramos JA: Behavioral and molecular changes elicited by acute administration of SR141716 to Delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats: An experimental model of cannabinoid abstinence. *Drug Alcohol Depend.* 74:159-170, 2004
- González-Maeso J, Rodríguez-Puertas R, Gabilondo AM, Meana JJ: Characterization of receptor-mediated [³⁵S]GTPgammaS binding to cortical membranes from postmortem human brain. *Eur J Pharmacol.* 390:25-36, 2000
- González-Maeso J, Rodríguez-Puertas R, Meana JJ, García-Sevilla JA, Guimón J: Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: Selective supersensitivity of α_{2A} -adrenoceptors. *Mol Psychiatry.* 7:755-767, 2002
- Goodwin GM, Green AR, Johnson P: 5-HT₂ receptor characteristics in frontal cortex and 5-HT₂ receptor-mediated head-twitch behaviour following antidepressant treatment to mice. *Br J Pharmacol.* 83:235-242, 1984
- Gorman JM, Sullivan G: Noradrenergic approaches to antidepressant therapy. *J Clin Psychiatry.* 61:13-16, 2000
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ: Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 2:260-265, 1999a
- Gould E, Tanapat P: Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry.* 46:1472-1479, 1999b
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS: Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol.* 313:479-485, 1991
- Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M: Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: ³H-PAT. *Nature.* 305:140-142, 1983
- Gray J.A and Lalljee B: Sex differences in emotional behaviour in the rat: correlation between open-field defecation and active avoidance. *Anim. Behav.* 22: 856-861, 1974
- Gram LF; Danish University Antidepressant Group (DUAG): Acute and continuation therapy in unipolar depression: observations from the run-in phase of a maintenance trial. *Acta Psychiatr Scand.* 118:123-9, 2008
- Grecksch G, Zhou D, Franke C, Schroder U, Sabel B, Becker A, Huether G: Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on 5-hydroxytryptaminergic presynapses in the rat frontal cortex: Behavioural correlates. *Br J Pharmacol.* 122:1725-1731, 1997
- Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR: Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol.* 276:H2085-2093, 1999
- Griebel G, Stemmelin J, Scatton B: Effects of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry.* 57:261-267, 2005
- Gross CG: Neurogenesis in the adult brain: Death of a dogma. *Nat Rev Neurosci.* 1:67-73, 2000
- Grotewiel MS, Sanders-Bush E: Regulation of serotonin_{2A} receptors in heterologous expression systems. *J Neurochem.* 63:1255-1260, 1994
- Gruber SA, Yurgelun-Todd DA: Neuroimaging of marijuana smokers during inhibitory processing: A pilot investigation. *Brain Res Cogn Brain Res.* 23:107-118, 2005
- Gu H, Wall SC, Rudnick G: Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem.* 269:7124-7130, 1994

- Guan XM, Peroutka SJ, Kobilka BK: Identification of a single amino acid residue responsible for the binding of a class of β -adrenergic receptor antagonists to 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors. *Mol Pharmacol.* 41:695-698, 1992
- Guillet-Deniau I, Burnol AF, Girard J: Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem.* 272:14825-14829, 1997
- Gurevich EV, Aleksandrova IA, Otmakhova NA, Katkov YA, Nesterova IV, Bobkova NV: Effects of bulbectomy and subsequent antidepressant treatment on brain 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 45:65-70, 1993
- Haberly LB, Price JL: The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 129:152-157, 1977
- Halasz N, Shepherd GM: Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience.* 10:579-619, 1983
- Hall RD, Macrides F: Olfactory bulbectomy impairs the rat's radial-maze behavior. *Physiol Behav.* 30:797-803, 1983
- Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF: The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB₁ cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci.* 16:1395-1398, 2002
- Hamalainen MM, Lovick TA: Involvement of nitric oxide and serotonin in modulation of antinociception and pressor responses evoked by stimulation in the dorsolateral region of the periaqueductal gray matter in the rat. *Neuroscience.* 80:821-827, 1997
- Han F, Nakano T, Yamamoto Y, Shioda N, Lu YM, Fukunaga K: Improvement of depressive behaviors by nefiracetam is associated with activation of CaM kinases in olfactory bulbectomized mice. *Brain Res.* 1265:205-214, 2009
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R: 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3662-3665, 2001
- Harrington MA, Shaw K, Zhong P, Ciaranello RD: Agonist-induced desensitization and loss of high-affinity binding sites of stably expressed human 5-HT_{1A} receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 268:1098-1106, 1994
- Hartig PR, Hoyer D, Humphrey PP, Martin GR: Alignment of receptor nomenclature with the human genome: Classification of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 17:103-105, 1996
- Harvey JA, Scholfield CN, Graham LT, Jr, Aprison MH: Putative transmitters in denervated olfactory complex. *J Neurochem.* 24:445-449, 1975
- Hasegawa S, Nishi K, Watanabe A, Overstreet DH, Diksic M: Brain 5-HT synthesis in the flinders sensitive line rat model of depression: An autoradiographic study. *Neurochem Int.* 48:358-366, 2006
- Hasegawa S, Watanabe A, Nguyen KQ, Debonnel G, Diksic M: Chronic administration of citalopram in olfactory bulbectomy rats restores brain 5-HT synthesis rates: An autoradiographic study. *Psychopharmacology (Berl).* 179:781-790, 2005
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB: Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science.* 226:561-564, 1984
- Hebert C, Habimana A, Elie R, Reader TA: Effects of chronic antidepressant treatments on 5-HT and NA transporters in rat brain: An autoradiographic study. *Neurochem Int.* 38:63-74, 2001
- Hellweg R, Zueger M, Fink K, Hortnagl H, Gass P: Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiol Dis.* 25:1-7, 2007

- Hensler JG: Differential regulation of 5-HT_{1A} receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology*. 26:565-573, 2002
- Hentall ID, Kurle PJ, White TR: Correlations between serotonin level and single-cell firing in the rat's nucleus raphe magnus. *Neuroscience*. 95:1081-1088, 2000
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC: Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 11:563-583, 1991
- Herold N, Uebelhack K, Franke L, Amthauer H, Luedemann L, Bruhn H, Felix R, Uebelhack R, Plotkin M: Imaging of serotonin transporters and its blockade by citalopram in patients with major depression using a novel SPECT ligand [¹²³I]-ADAM. *J Neural Transm*. 113:659-670, 2006
- Hervás I, Artigas F: Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. role of 5-HT autoreceptors. *Eur J Pharmacol*. 358:9-18, 1998
- Hesketh SA, Brennan AK, Jessop DS, Finn DP: Effects of chronic treatment with citalopram on cannabinoid and opioid receptor-mediated G-protein coupling in discrete rat brain regions. *Psychopharmacology (Berl)*. 198:29-36, 2008
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z: Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 274:22569-22580, 1999
- Hill MN, Barr AM, Ho WS, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ: Electroconvulsive shock treatment differentially modulates cortical and subcortical endocannabinoid activity. *J Neurochem*. 103:47-56, 2007
- Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB: Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: Effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem*. 106:2322-2336, 2008
- Hill MN, Hillard CJ, Bambico FR, Patel S, Gorzalka BB, Gobbi G: The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends Pharmacol Sci*. 30:484-493, 2009
- Hill MN, Ho WS, Sinopoli KJ, Viau V, Hillard CJ, Gorzalka BB: Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*. 31:2591-2599, 2006a
- Hill MN, Sun JC, Tse MT, Gorzalka BB: Altered responsiveness of serotonin receptor subtypes following long-term cannabinoid treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*. 9:277-286, 2006b
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB: Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor CB₁. *J Pharmacol Exp Ther*. 289:1427-1433, 1999
- Hillver SE, Bjork L, Li YL, Svensson B, Ross S, Anden NE, Hacksell U: (S)-5-fluoro-8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin: A putative 5-HT_{1A}-receptor antagonist. *J Med Chem*. 33:1541-1544, 1990
- Hinton JM, Adams D, Garland CJ: 5-hydroxytryptamine stimulation of phospholipase D activity in the rabbit isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 126:1601-1608, 1999
- Hipolide DC, Moreira KM, Barlow KB, Wilson AA, Nobrega JN, Tufik S: Distinct effects of sleep deprivation on binding to norepinephrine and serotonin transporters in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29:297-303, 2005
- Hjorth S, Sharp T: In vivo microdialysis evidence for central serotonin_{1A} and serotonin_{1B} autoreceptor blocking properties of the beta adrenoceptor antagonist (-)penbutolol. *J Pharmacol Exp Ther*. 265:707-712, 1993

- Hjorth S, Sharp T: Mixed agonist/antagonist properties of NAN-190 at 5-HT_{1A} receptors: Behavioural and in vivo brain microdialysis studies. *Life Sci.* 46:955-963, 1990
- Hoffman BJ, Hansson SR, Mezey E, Palkovits M: Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 19:187-231, 1998
- Holmes PV, Masini CV, Primeaux SD, Garrett JL, Zellner A, Stogner KS, Duncan AA, Crystal JD: Intravenous self-administration of amphetamine is increased in a rat model of depression. *Synapse.* 46:4-10, 2002
- Hong KW, Lee WS, Rhim BY: Role of central α_2 -adrenoceptors on the development of muricidal behavior in olfactory bulbectomized rats: Effect of α_2 -adrenoceptor antagonists. *Physiol Behav.* 39:535-539, 1987
- Howlett AC: Efficacy in CB₁ receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol.* 142:1209-1218, 2004
- Howlett AC, Fleming RM: Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* 26:532-538, 1984
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatryan LL: Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol.* 29:307-313, 1986
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP: International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev.* 46:157-203, 1994
- Hozumi S, Nakagawasai O, Tan-No K, Nijima F, Yamadera F, Murata A, Arai Y, Yasuhara H, Tadano T: Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy. *Behav Brain Res.* 138:9-15, 2003
- Hrdina PD, Vu TB: Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT₂ receptors in rat brain: An autoradiographic study. *Synapse.* 14:324-331, 1993
- Hsiung SC, Adlersberg M, Arango V, Mann JJ, Tamir H, Liu KP: Attenuated 5-HT_{1A} receptor signaling in brains of suicide victims: Involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, akt and mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem.* 87:182-194, 2003
- Huether G, Zhou D, Ruther E: Long-term modulation of presynaptic 5-HT-output: Experimentally induced changes in cortical 5-HT-transporter density, tryptophan hydroxylase content and 5-HT innervation density. *J Neural Transm.* 104:993-1004, 1997
- Hungund BL, Vinod KY, Kassir SA, Basavarajappa BS, Yalamanchili R, Cooper TB, Mann JJ, Arango V: Upregulation of CB₁ receptors and agonist-stimulated [³⁵S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Mol Psychiatry.* 9:184-190, 2004
- Hurley JH, Bloem LJ, Pavalko F, Liu J, Tian M, Simon JR, Yu L: Structure-function studies of the eighth hydrophobic domain of a serotonin receptor. *J Neurochem.* 72:413-421, 1999
- Ichimiya T, Suhara T, Sudo Y, Okubo Y, Nakayama K, Nankai M, Inoue M, Yasuno F, Takano A, Maeda J, Shibuya H: Serotonin transporter binding in patients with mood disorders: A PET study with [¹¹C](+)McN5652. *Biol Psychiatry.* 51:715-722, 2002
- Iken K, Chheng S, Fargin A, Goulet AC, Kouassi E: Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. *Cell Immunol.* 163:1-9, 1995
- Invernizzi RW, Parini S, Sacchetti G, Fracasso C, Caccia S, Annoni K, Samanin R: Chronic treatment with reboxetine by osmotic pumps facilitates its effect on extracellular noradrenaline and may desensitize α_2 -adrenoceptors in the prefrontal cortex. *Br J Pharmacol.* 132:183-188, 2001

- Jaako-Movits K, Zharkovsky A: Impaired fear memory and decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats. *Eur J Neurosci.* 22:2871-2878, 2005
- Jaako-Movits K, Zharkovsky T, Pedersen M, Zharkovsky A: Decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy is reversed by repeated citalopram administration. *Cell Mol Neurobiol.* 26:1559-1570, 2006
- Jacobs BL, Praag H, Gage FH: Adult brain neurogenesis and psychiatry: A novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 5:262-269, 2000
- James AN, Ryan JP, Parkman HP: Effects of the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, on regional gastric contractility. *Neurogastroenterol Motil.* 17:76-82, 2005
- Jancsar SM, Leonard BE: Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 8:263-269, 1984
- Jarosik J, Legutko B, Unsicker K, von Bohlen Und Halbach O: Antidepressant-mediated reversal of abnormal behavior and neurodegeneration in mice following olfactory bulbectomy. *Exp Neurol.* 204:20-28, 2007
- Jesberger JA, Richardson JS: Effects of antidepressant drugs on the behavior of olfactory bulbectomized and sham-operated rats. *Behav Neurosci.* 100:256-274, 1986
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X: Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest.* 115:3104-3116, 2005
- Jin H, Oksenberg D, Ashkenazi A, Peroutka SJ, Duncan AM, Rozmahel R, Yang Y, Mengod G, Palacios JM, O'Dowd BF: Characterization of the human 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor. *J Biol Chem.* 267:5735-5738, 1992
- Johanning H, Plenge P, Mellerup E: Serotonin receptors in the brain of rats treated chronically with imipramine or RU24969: Support for the 5-HT_{1B} receptor being a 5-HT autoreceptor. *Pharmacol Toxicol.* 70:131-134, 1992
- Johansson L, Sohn D, Thorberg SO, Jackson DM, Kelder D, Larsson LG, Renyi L, Ross SB, Wallsten C, Eriksson H, Hu PS, Jerning E, Mohell N, Westlind-Danielsson A: The pharmacological characterization of a novel selective 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor antagonist, NAD-299. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:216-225, 1997
- Katon W, Roy-Byrne PP: Mixed anxiety and depression. *J Abnorm Psychol.* 100:337-345, 1991
- Kehne JH, Baron BM, Carr AA, Chaney SF, Elands J, Feldman DJ, Frank RA, van Giersbergen PL, McCloskey TC, Johnson MP, McCarty DR, Poirot M, Senyah Y, Siegel BW, Widmaier C: Preclinical characterization of the potential of the putative atypical antipsychotic MDL 100,907 as a potent 5-HT_{2A} antagonist with a favorable CNS safety profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 277:968-981, 1996
- Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Bernstein HG, Wolf G: Cell proliferation is influenced by bulbectomy and normalized by imipramine treatment in a region-specific manner. *Neuropsychopharmacology.* 31:1165-1176, 2006
- Kelly JP, Leonard BE: The effect of tianeptine and sertraline in three animal models of depression. *Neuropharmacology.* 33:1011-1016, 1994
- Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE: The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacol Ther.* 74:299-316, 1997
- Kelsey JE: Dose-response relationship with venlafaxine. *J Clin Psychopharmacol.* 16:21S-26S; discussion 26S-28S, 1996
- Kent JM: SNARIs, NaSSAs, and NaRIs: New agents for the treatment of depression. *Lancet.* 355:911-918, 2000

- Khawaja X: Quantitative autoradiographic characterisation of the binding of [³H]WAY-100635, a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Brain Res.* 673:217-225, 1995
- Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Verge D: Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain. *J Neurosci Res.* 46:697-708, 1996
- Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ: Serotonin receptor subtype antagonists in the medial ventral medulla inhibit mesencephalic opiate analgesia. *Brain Res.* 597:331-338, 1992
- Kim J, Lu J, Quinn PG: Distinct cAMP response element-binding protein (CREB) domains stimulate different steps in a concerted mechanism of transcription activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11292-11296, 2000
- King MG, Cairncross KD: Effects of olfactory bulb section on brain noradrenaline, corticosterone and conditioning in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 2:347-353, 1974
- Klimek V, Roberson G, Stockmeier CA, Ordway GA: Serotonin transporter and MAO-B levels in monoamine nuclei of the human brainstem are normal in major depression. *J Psychiatr Res.* 37:387-397, 2003
- Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U, Lefkowitz RJ, Caron MG: An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature.* 329:75-79, 1987
- Koch JM, Kell S, Hinze-Selch D, Aldenhoff JB: Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression. *J Psychiatr Res.* 36:369-375, 2002
- Kornetsky C, Huston-Lyons D, Porrino LJ: The role of the olfactory tubercle in the effects of cocaine, morphine and brain-stimulation reward. *Brain Res.* 541:75-81, 1991
- Kovachich GB, Aronson CE, Brunswick DJ, Frazer A: Quantitative autoradiography of serotonin uptake sites in rat brain using [³H]cyanoimipramine. *Brain Res.* 454:78-88, 1988
- Krueger JM, Fang J, Hansen MK, Zhang J, Obal F, Jr: Humoral regulation of sleep. *News Physiol Sci.* 13:189-194, 1998
- Kulkarni SK, Dhir A: Current investigational drugs for major depression. *Expert Opin Investig Drugs.* 18:767-788, 2009
- Kung MP, Frederick D, Mu M, Zhuang ZP, Kung HF: 4-(2'-methoxy-phenyl)-1-[2'-(n-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl- piperazine ([¹²⁵I]p-MPPI) as a new selective radioligand of serotonin-_{1A} sites in rat brain: In vitro binding and autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 272:429-437, 1995
- Lacroix D, Blier P, Curet O, de Montigny C: Effects of long-term desipramine administration on noradrenergic neurotransmission: electrophysiological studies in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 257:1081-1090, 1991.
- Lahmame A, del Arco C, Pazos A, Yritia M, Armario A: Are wistar-kyoto rats a genetic animal model of depression resistant to antidepressants? *Eur J Pharmacol.* 337:115-123, 1997
- Lapierre YD, Butter HJ: Agitated and retarded depression. A clinical psychophysiological evaluation. *Neuropsychobiology.* 6:217-223, 1980
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M, Lanfumey L: Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology.* 39:110-122, 2000
- Lembo PM, Albert PR: Multiple phosphorylation sites are required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor by protein kinase C. *Mol Pharmacol.* 48:1024-1029, 1995
- Lembo PM, Ghahremani MH, Morris SJ, Albert PR: A conserved threonine residue in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor directs signaling specificity. *Mol Pharmacol.* 52:164-171, 1997

- Leonard BE: The comparative pharmacology of new antidepressants. *J Clin Psychiatry*. 54 Suppl:3-15; discussion 16-7, 1993
- Leonard BE, Tuite M: Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int Rev Neurobiol*. 22:251-286, 1981
- Leone AM, Errico M, Lin SL, Cowen DS: Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and akt by human serotonin 5-HT_{1B} receptors in transfected BE(2)-C neuroblastoma cells is inhibited by RGS4. *J Neurochem*. 75:934-938, 2000
- Leppanen JM: Emotional information processing in mood disorders: A review of behavioral and neuroimaging findings. *Curr Opin Psychiatry*. 19:34-39, 2006
- Lesch KP, Aulakh CS, WOLOZIN BL, Tolliver TJ, Hill JL, Murphy DL: Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Brain Res Mol Brain Res*. 17:31-35, 1993
- Li Q, Muma NA, van de Kar LD: Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT_{1A} receptors: Reductions in hypothalamic and midbrain G_i and G_o proteins and in neuroendocrine responses to a 5-HT_{1A} agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 279:1035-1042, 1996
- Li YW, Bayliss DA: Electrophysiological properties, synaptic transmission and neuromodulation in serotonergic caudal raphe neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 25:468-473, 1998
- Liu YF, Albert PR: Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J Biol Chem*. 266:23689-23697, 1991
- Llewellyn MB, Azami J, Roberts MH: The effect of modification of 5-hydroxytryptamine function in nucleus raphe magnus on nociceptive threshold. *Brain Res*. 306:165-170, 1984
- Logan CY, Nusse R: The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:781-810, 2004
- López-Rubalcava C, Lucki I: Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*. 22:191-199, 2000
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275, 1951
- Lowther S, De Paermentier F, Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW: 5-HT_{1A} receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls. *J Affect Disord*. 42:199-207, 1997
- Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Piñeyro G, Sadikot AF, Debonnel G: Serotonin₄ (5-HT₄) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*. 55:712-725, 2007
- Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B: Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res*. 587:181-185, 1992
- Mackie K, Hille B: Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:3825-3829, 1992
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R: Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 15:6552-6561, 1995
- Maes M: Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol*. 461:25-46, 1999
- Maj J, Moryl E: Effects of fluoxetine given chronically on the responsiveness of 5-HT receptor subpopulations to their agonists. *Eur Neuropsychopharmacol*. 3:85-94, 1993
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 20:9104-9110, 2000

- Malison RT, Price LH, Berman R, van Dyck CH, Pelton GH, Carpenter L, Sanacora G, Owens MJ, Nemeroff CB, Rajeevan N, Baldwin RM, Seibyl JP, Innis RB, Charney DS: Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [¹²³I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*. 44:1090-1098, 1998
- Malone DT, Taylor DA: Involvement of somatodendritic 5-HT_{1A} receptors in Δ⁹-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 69:595-601, 2001
- Malone DT, Taylor DA: Modulation of Δ⁹-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia by fluoxetine in the rat. *Br J Pharmacol*. 124:1419-1424, 1998
- Mangel AW, Raymond JR, Fitz JG: Regulation of high-conductance anion channels by G proteins and 5-HT_{1A} receptors in CHO cells. *Am J Physiol*. 264:490-495, 1993
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS: The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 7:541-547, 2001
- Manji HK, Lenox RH: The nature of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 61:42-57, 2000
- Mann JJ, Huang YY, Underwood MD, Kassir SA, Oppenheim S, Kelly TM, Dwork AJ, Arango V: A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch Gen Psychiatry*. 57:729-738, 2000
- Manzanas J, Julian M, Carrascosa A: Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol*. 4:239-257, 2006
- Mar A, Spreekmeester E, Rochford J: Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 150:52-60, 2000
- Mar A, Spreekmeester E, Rochford J: Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 73:703-712, 2002
- Marshall CJ: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80:179-185, 1995
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O: Involvement of CB₁ cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)*. 159:379-387, 2002
- Maswood S, Andrade M, Caldarola-Pastuszka M, Uphouse L: Protective actions of the 5-HT_{2A/2C} receptor agonist, DOI, on 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of lordosis behavior. *Neuropharmacology*. 35:497-501, 1996
- Mathew SJ: Treatment-resistant depression: recent developments and future directions. *Depress Anxiety*. 25:989-992, 2008
- Mato S, Aso E, Castro E, Martin M, Valverde O, Maldonado R, Pazos A: CB₁ knockout mice display impaired functionality of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors. *J Neurochem*. 103:2111-2120, 2007
- Mato S, Pazos A: Influence of age, postmortem delay and freezing storage period on cannabinoid receptor density and functionality in human brain. *Neuropharmacology*. 46:716-726, 2004
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ: Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*. 327:535-550, 1993
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI: Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-564, 1990
- McDonald AJ: Projection neurons of the basolateral amygdala: A correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull*. 28:179-185, 1992

- McDuffie JE, Motley ED, Limbird LE, Maleque MA: 5-hydroxytryptamine stimulates phosphorylation of P44/p42 mitogen-activated protein kinase activation in bovine aortic endothelial cell cultures. *J Cardiovasc Pharmacol.* 35:398-402, 2000
- McEwen BS: Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22:105-122, 1999
- McGrath C, Norman TR: The effect of venlafaxine treatment on the behavioural and neurochemical changes in the olfactory bulbectomised rat. *Psychopharmacology (Berl).* 136:394-401, 1998
- McKinney WT Jr, Bunney WE Jr: Animal model of depression. I. Review of evidence: Implications for research. *Arch Gen Psychiatry.* 21:240-248, 1969
- McLean S: Do substance P and the NK1 receptor have a role in depression and anxiety?. *Curr Pharm Des.* 11:1529-1547, 2005
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR: Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50:83-90, 1995
- Mechoulam R, Gaoni Y: Hashish. IV. the isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron.* 21:1223-1229, 1965
- Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Butters MA, Ziolkowski SK, Moses-Kolko E, Mazumdar S, Mulsant BH, Houck PR, Lopresti BJ, Weissfeld LA, Reynolds CF: Serotonin_{1A} receptor binding and treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology.* 29:2258-2265, 2004
- Mengod G, Pompeiano M, Martinez-Mir MI, Palacios JM: Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. correlation with the distribution of receptor sites. *Brain Res.* 524:139-143, 1990
- Meyer JH: Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment. *J Psychiatry Neurosci.* 32:86-102, 2007
- Meyer JH, Houle S, Sagrati S, Carella A, Hussey DF, Ginovart N, Goulding V, Kennedy J, Wilson AA: Brain serotonin transporter binding potential measured with carbon 11-labeled DASB positron emission tomography: Effects of major depressive episodes and severity of dysfunctional attitudes. *Arch Gen Psychiatry.* 61:1271-1279, 2004
- Meyer JH, Kapur S, Houle S, DaSilva J, Owczarek B, Brown GM, Wilson AA, Kennedy SH: Prefrontal cortex 5-HT₂ receptors in depression: An [¹⁸F]setoperone PET imaging study. *Am J Psychiatry.* 156:1029-1034, 1999
- Meyerson LR, Wennogle LP, Abel MS, Coupet J, Lippa AS, Rauh CE, Beer B: Human brain receptor alterations in suicide victims. *Pharmacol Biochem Behav.* 17:159-163, 1982
- Middlemiss DN, Fozard JR: 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur J Pharmacol.* 90:151-153, 1983
- Middlemiss DN, Hutson PH: The 5-HT_{1B} receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 600:132-47; discussion 347-48, 1990
- Middleton JP, Raymond JR, Whorton AR, Dennis VW: Short-term regulation of Na⁺/K⁺ adenosine triphosphatase by recombinant human serotonin 5-HT_{1A} receptor expressed in HeLa cells. *J Clin Invest.* 86:1799-1805, 1990
- Millan MJ, Girardon S, Bervoets K: 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail-flicks in the rat are facilitated by the selective serotonin (5-HT)_{2C} agonist, RO 60-0175: Blockade of its actions by the novel 5-HT_{2C} receptor antagonist SB 206,553. *Neuropharmacology.* 36:743-745, 1997
- Millhouse OE: A Golgi study of the descending medial forebrain bundle. *Brain Res.* 15:341-363, 1969
- Min W, Li T, Ma X, Li Z, Yu T, Gao D, Zhang B, Yun Y, Sun X: Monoamine transporter gene polymorphisms affect susceptibility to depression and predict antidepressant response. *Psychopharmacology (Berl).* 205:409-417, 2009

- Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Verge D, Hamon M: Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 14:357-362, 1992
- Mizuta T, Segawa T: Chronic effects of imipramine and lithium on postsynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} sites and on presynaptic 5-HT₃ sites in rat brain. *Jpn J Pharmacol.* 47:107-113, 1988
- Moiseiwitsch JR, Raymond JR, Tamir H, Lauder JM: Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch Oral Biol.* 43:789-800, 1998
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C: The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: Their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev.* 23:145-195, 1997
- Montero D, De Felipe MC, Del Rio J: Acute or chronic antidepressants do not modify [¹²⁵I]cyanopindolol binding to 5-HT_{1B} receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 196:327-329, 1991
- Montgomery SA: Rapid onset of action of venlafaxine. *Int Clin Psychopharmacol.* 10 Suppl 2:21-27, 1995
- Moret C, Briley M: The possible role of 5-HT_{1B/D} receptors in psychiatric disorders and their potential as a target for therapy. *Eur J Pharmacol.* 404:1-12, 2000
- Moriguchi S, Han F, Nakagawasai O, Tadano T, Fukunaga K: Decreased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activities mediate impairment of hippocampal long-term potentiation in the olfactory bulbectomized mice. *J Neurochem.* 97:22-29, 2006
- Morilak DA, Garlow SJ, Ciaranello RD: Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin₂ receptors in the rat brain. *Neuroscience.* 54:701-717, 1993
- Morris R: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47-60, 1984
- Moses-Kolko EL, Price JC, Thase ME, Meltzer CC, Kupfer DJ, Mathis CA, Bogers WD, Berman SR, Houck PR, Schneider TN, Drevets WC: Measurement of 5-HT_{1A} receptor binding in depressed adults before and after antidepressant drug treatment using positron emission tomography and [¹¹C]WAY-100635. *Synapse.* 61:523-530, 2007
- Mostany R, Valdizan EM, Pazos A: A role for nuclear β -catenin in SNRI antidepressant-induced hippocampal cell proliferation. *Neuropharmacology.* 55:18-26, 2008
- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA: Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 291:893-902, 1999
- Mucignat-Caretta C, Bondi M, Caretta A: Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. *Physiol Behav.* 89:637-643, 2006
- Mudunkotuwa NT, Horton RW: Desipramine administration in the olfactory bulbectomized rat: Changes in brain β -adrenoceptor and 5-HT_{2A} binding sites and their relationship to behaviour. *Br J Pharmacol.* 117:1481-1486, 1996
- Muigg P, Hoelzl U, Palfrader K, Neumann I, Wigger A, Landgraf R, Singewald N: Altered brain activation pattern associated with drug-induced attenuation of enhanced depression-like behavior in rats bred for high anxiety. *Biol Psychiatry.* 61:782-796, 2007
- Mukhopadhyay S, Shim JY, Assi AA, Norford D, Howlett AC: CB₁ cannabinoid receptor-G protein association: A possible mechanism for differential signaling. *Chem Phys Lipids.* 121:91-109, 2002
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61-65, 1993

- Nakagawasai O, Tadano T, Arai Y, Hozumi S, Oba A, Tan-No K, Yasuhara H, Kisara K, Orelan L: Enhancement of 5-hydroxytryptamine-induced head-twitch response after olfactory bulbectomy. *Neuroscience*. 117:1017-1023, 2003
- Nakanishi H, Ukai K, Nakagawa T, Watanabe S, Kamata O, Yamamoto K: Enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential evoked in rat medial-amygdala neuron following olfactory bulbectomy. *Brain Res*. 532:69-75, 1990
- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schlicker E: Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 361:19-24, 2000
- Naudon L, El Yacoubi M, Vaugois JM, Leroux-Nicollet I, Costentin J: A chronic treatment with fluoxetine decreases 5-HT_{1A} receptors labeling in mice selected as a genetic model of helplessness. *Brain Res*. 936:68-75, 2002
- Nayebi AR, Charkhpour M: Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of dorsal and median raphe nucleus in tolerance to morphine analgesia in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 83:203-207, 2006
- Nelson JC, Mazure CM, Bowers MB, Jr, Jatlow PI: A preliminary, open study of the combination of fluoxetine and desipramine for rapid treatment of major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 48:303-307, 1991
- Nemeroff CB: New directions in the development of antidepressants: The interface of neurobiology and psychiatry. *Hum Psychopharmacol*. 17:S13-6, 2002
- Nemeroff CB, Owens MJ: Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci*. 5 Suppl:1068-1070, 2002
- Nemeroff CB, Vale WW: The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiatry*. 66:5-13, 2005
- Nesterova IV, Bobkova NV, Medvinskaya NI, Samokhin AN, Aleksandrova IY: Morphofunctional state of neurons in the temporal cortex and hippocampus in relation to the level of spatial memory in rats after ablation of the olfactory bulbs. *Neurosci Behav Physiol*. 38:349-353, 2008
- Nesterova IV, Gurevich EV, Nesterov VI, Otmakhova NA, Bobkova NV: Bulbectomy-induced loss of raphe neurons is counteracted by antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 21:127-140, 1997
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM: Neurobiology of depression. *Neuron*. 34:13-25, 2002
- Neumaier JF, Edwards E, Plotsky PM: 5-HT_{1B} RNA regulation in two animal models of altered stress reactivity. *Biol Psychiatry*. 51:902-908, 2002
- Neumaier JF, Petty F, Kramer GL, Szot P, Hamblin MW: Learned helplessness increases 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor mRNA levels in the rat dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*. 41:668-674, 1997
- Neumaier JF, Root DC, Hamblin MW: Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT_{1B} mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*. 15:515-522, 1996
- Newberg AB, Amsterdam JD, Wintering N, Ploessl K, Swanson RL, Shults J, Alavi A: ¹²³I-ADAM binding to serotonin transporters in patients with major depression and healthy controls: A preliminary study. *J Nucl Med*. 46:973-977, 2005
- Nguyen KQ, Tohyama Y, Watanabe A, Hasegawa S, Skelin I, Diksic M: Acute effects of combining citalopram and pindolol on regional brain serotonin synthesis in sham operated and olfactory bulbectomized rats. *Neurochem Int*. 54:161-171, 2009
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS: Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 15:7539-7547, 1995

- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS: Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci.* 16:2365-2372, 1996
- Nicholson RA, Liao C, Zheng J, David LS, Coyne L, Errington AC, Singh G, Lees G: Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Res.* 978:194-204, 2003
- Nie J, Lewis DL: The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB₁ cannabinoid receptor mediate G protein coupling. *Neuroscience.* 107:161-167, 2001
- Nishi K, Kanemaru K, Diksic M: A genetic rat model of depression, Flinders sensitive line, has a lower density of 5-HT_{1A} receptors, but a higher density of 5-HT_{1B} receptors, compared to control rats. *Neurochem Int.* 54:299-307, 2009a
- Nutt DJ: The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol.* 17 Suppl 1:S1-12, 2002
- Oliva JM, Uriguen L, Pérez-Rial S, Manzanares J: Time course of opioid and cannabinoid gene transcription alterations induced by repeated administration with fluoxetine in the rat brain. *Neuropharmacology.* 49:618-626, 2005
- Oliveras JL, Redjemi F, Guilbaud G, Besson JM: Analgesia induced by electrical stimulation of the inferior centralis nucleus of the raphe in the cat. *Pain.* 1:139-145, 1975
- Olton DS: Spatial memory. *Sci Am.* 236:82-4, 89-94, 96, 98, 1977
- Otmakhova NA, Gurevich EV, Katkov YA, Nesterova IV, Bobkova NV: Dissociation of multiple behavioral effects between olfactory bulbectomized C57Bl/6J and DBA/2J mice. *Physiol Behav.* 52:441-448, 1992
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH: The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 8:389-404, 1997
- Pan ZZ, Wessendorf MW, Williams JT: Modulation by serotonin of the neurons in rat nucleus raphe magnus in vitro. *Neuroscience.* 54:421-429, 1993
- Parsey RV, Hastings RS, Oquendo MA, Huang YY, Simpson N, Arcement J, Huang Y, Ogden RT, Van Heertum RL, Arango V, Mann JJ: Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. *Am J Psychiatry.* 163:52-58, 2006
- Paul IA, Layer RT, Skolnick P, Nowak G: Adaptation of the NMDA receptor in rat cortex following chronic electroconvulsive shock or imipramine. *Eur J Pharmacol.* 247:305-311, 1993
- Paul SM, Purdy RH: Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6:2311-2322, 1992
- Paxinos G y Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* New York: Academic Press, 1982
- Pazos A, Cortés R, Palacios JM: Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. serotonin-₂ receptors. *Brain Res.* 346:231-249, 1985
- Pazos A, Palacios JM: Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. serotonin-₁ receptors. *Brain Res.* 346:205-3, 1985
- Pazos MR, Nuñez E, Benito C, Tolon RM, Romero J: Role of the endocannabinoid system in alzheimer's disease: New perspectives. *Life Sci.* 75:1907-1915, 2004
- Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL: Discrimination of multiple [³H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem.* 36:220-226, 1981
- Peretti S, Judge R, Hindmarch I: Safety and tolerability considerations: Tricyclic antidepressants vs. selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 403:17-25, 2000
- Peroutka SJ: 5-HT receptors: Past, present and future. *Trends Neurosci.* 18:68-69, 1995
- Peroutka SJ, Snyder SH: Long-term antidepressant treatment decreases spiperidol-labeled serotonin receptor binding. *Science.* 210:88-90, 1980

- Peroutka SJ, Snyder SH: Multiple serotonin receptors: Differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid diethylamide and [³H]spiroperidol. *Mol Pharmacol.* 16:687-699, 1979
- Perry EK, Marshall EF, Blessed G, Tomlinson BE, Perry RH: Decreased imipramine binding in the brains of patients with depressive illness. *Br J Psychiatry.* 142:188-192, 1983
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA: Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res.* 51:391-402, 1998
- Petty F, Kramer G, Wilson L: Prevention of learned helplessness: In vivo correlation with cortical serotonin. *Pharmacol Biochem Behav.* 43:361-367, 1992
- Pike VW, McCarron JA, Lammerstma AA, Hume SP, Poole K, Grasby PM, Malizia A, Cliffe IA, Fletcher A, Bench CJ: First delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [¹¹C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 283:R1-3, 1995
- Piñeyro G, Blier P, Dennis T, de Montigny C: Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade. *J Neurosci.* 14:3036-3047, 1994
- Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N: Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis.* 5:462-473, 1998
- Plata-Salaman C, Turrin N: Cytokine interactions and cytokine balance in the brain: Relevance to neurology and psychiatry. *Mol Psychiatry.* 4:302-306, 1999
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G: Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: Comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 23:163-178, 1994
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G: Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: Correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 12:440-453, 1992
- Popoli M, Brunello N, Pérez J, Racagni G: Second messenger-regulated protein kinases in the brain: Their functional role and the action of antidepressant drugs. *J Neurochem.* 74:21-33, 2000
- Porter AC, Felder CC: The endocannabinoid nervous system: Unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* 90:45-60, 2001
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC: Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 301:1020-1024, 2002
- Possidente B, Lumia AR, McGinnis MY, Rapp M, McEldowney S: Effects of fluoxetine and olfactory bulbectomy on mouse circadian activity rhythms. *Brain Res.* 713:108-113, 1996
- Potrebic SB, Mason P: Three-dimensional analysis of the dendritic domains of on- and off-cells in the rostral ventromedial medulla. *J Comp Neurol.* 337:83-93, 1993
- Potter WZ: Adrenoceptors and serotonin receptor function: Relevance to antidepressant mechanisms of action. *J Clin Psychiatry.* 57:4-8, 1996
- Powell TP, Cowan WM, Raisman G: The central olfactory connexions. *J Anat.* 99:791-813, 1965
- Price GW, Burton MJ, Collin LJ, Duckworth M, Gaster L, Göthert M, Jones BJ, Roberts C, Watson JM, Middlemiss DN: SB-216641 and BRL-15572--compounds to pharmacologically discriminate h5-HT_{1B} and h5-HT_{1D} receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356:312-320, 1997
- Prisco S, Cagnotto A, Talone D, De Blasi A, Mennini T, Esposito E: Tertatolol, a new β-blocker, is a serotonin (5-hydroxytryptamine_{1A}) receptor antagonist in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 265:739-744, 1993
- Puig MV, Artigas F, Celada P: Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: Involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex.* 15:1-14, 2005
- Pujol JF, Keane P, Bobillier P, Renaud B, Jouvet M: 5-6-dihydroxytryptamine as a tool for studying sleep mechanisms and interactions between monoaminergic systems. *Ann N Y Acad Sci.* 305:576-589, 1978

- Pullarkat SR, Mysels DJ, Tan M, Cowen DS: Coupling of serotonin 5-HT_{1B} receptors to activation of mitogen-activated protein kinase (ERK-2) and p70 S6 kinase signaling systems. *J Neurochem.* 71:1059-1067, 1998
- Radja F, Daval G, Hamon M, Verge D: Pharmacological and physicochemical properties of pre-versus postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor binding sites in the rat brain: A quantitative autoradiographic study. *J Neurochem.* 58:1338-1346, 1992
- Rapport MM, Green AA, Page IH: Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem.* 176:1243-1251, 1984
- Rapport MM, Virno M: Metabolic effect of serotonin in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 81:203-205, 1952
- Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN: The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol.* 127:1751-1764, 1999
- Redmond AM, Kelly JP, Leonard BE: Behavioural and neurochemical effects of dizocilpine in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 58:355-359, 1997
- Rex A, Voigt JP, Gustedt C, Beckett S, Fink H: Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology (Berl).* 177:23-34, 2004
- Rhee MH, Vogel Z, Barg J, Bayewitch M, Levy R, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R: Cannabinol derivatives: Binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylyl cyclase. *J Med Chem.* 40:3228-3233, 1997
- Richardson JS: Animal models of depression reflect changing views on the essence and etiology of depressive disorders in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 15:199-204, 1991
- Richelson E: Pharmacokinetic drug interactions of new antidepressants: A review of the effects on the metabolism of other drugs. *Mayo Clin Proc.* 72:835-847, 1997
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D: SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350:240-244, 1994
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC, Le Fur GL: SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 284:644-650, 1998
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ: Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci.* 21:109-116, 2001
- Roberts C, Price GW, Gaster L, Jones BJ, Middlemiss DN, Routledge C: Importance of h5-HT_{1B} receptor selectivity for 5-HT terminal autoreceptor activity: An in vivo microdialysis study in the freely-moving guinea-pig. *Neuropharmacology.* 36:549-557, 1997a
- Roberts C, Price GW, Jones BJ: The role of 5-HT_{1B/1D} receptors in the modulation of 5-hydroxytryptamine levels in the frontal cortex of the conscious guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 326:23-30, 1997b
- Robinson DS, Rickels K, Feighner J, Fabre LF, Jr, Gammans RE, Shrotriya RC, Alms DR, Andary JJ, Messina ME: Clinical effects of the 5-HT_{1A} partial agonists in depression: A composite analysis of buspirone in the treatment of depression. *J Clin Psychopharmacol.* 10:67S-76S, 1990
- Roche M, Harkin A, Kelly JP: Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat. *Neuropsychopharmacology.* 32:1312-1320, 2007
- Roche M, Shanahan E, Harkin A, Kelly JP: Trans-species assessment of antidepressant activity in a rodent model of depression. *Pharmacol Rep.* 60:404-408, 2008

- Rodríguez de Fonseca FR, Villanua MA, Muñoz RM, San-Martin-Clark O, Navarro M: Differential effects of chronic treatment with either dopamine D₁ or D₂ receptor agonists on the acute neuroendocrine actions of the highly potent synthetic cannabinoid HU-210 in male rats. *Neuroendocrinology*. 61:714-721, 1995
- Rodríguez-Gaztelumendi A, Rojo ML, Pazos A, Díaz A: Altered CB₁ receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *J Neurochem*. 108:1423-1433, 2009
- Rodríguez-Gaztelumendi A, Rojo ML, Herrera A, Pazos A, Díaz A: Evaluation of pain sensitivity to thermal and mechanical stimuli in an animal model of chronic depression: the bilateral olfactory bulbectomized rat. 5th Forum of European Neuroscience. *FENS Abstr*. 3: A166.13, 2005a
- Rodríguez-Gaztelumendi A, Rojo ML, Pazos A, Díaz A: Cambios en la sensibilidad dolorosa tras bulbectomía olfatoria bilateral en rata y su reversión por fluoxetina. XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. *Revista de Neurología*. 41 Separata: 121, 2005b
- Romero L, Artigas F: Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT_{1A} receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: Role of somatodendritic autoreceptors. *J Neurochem*. 68:2593-2603, 1997
- Rubino T, Forlani G, Vigano D, Zippel R, Parolaro D: Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol Cell Neurosci*. 25:355-362, 2004
- Rudnick G, Clark J: From synapse to vesicle: The reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta*. 1144:249-263, 1993
- Ruf BM, Bhagwagar Z: The 5-HT_{1B} receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. *Current Drug Targets*, 10:1116-1136, 2009
- Rutter JJ, Gundlach C, Auerbach SB: Increase in extracellular serotonin produced by uptake inhibitors is enhanced after chronic treatment with fluoxetine. *Neurosci Lett*. 171:183-186, 1994
- Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E: Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 25:1089-1094, 2005
- Sanders-Bush E: Adaptive regulation of central serotonin receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharmacology*. 3:411-416, 1990
- Sanchez C, Arnt J, Moltzen E: Assessment of relative efficacies of 5-HT_{1A} receptor ligands by means of in vivo animal models. *Eur J Pharmacol*. 315:245-254, 1996
- Sanchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M: Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Δ⁹-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*. 54:834-843, 1998
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301:805-809, 2003
- Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ: Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: Effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 57:174-180, 2000
- Sato H, Skelin I, Debonnel G, Diksic M: Chronic bupropion treatment normalizes open field behavior in olfactory bulbectomized rats: assessment with a quantitative autoradiographic evaluation of the 5-HT_{1A} binding sites. *Brain Res Bull*. 75:545-555, 2008
- Saudou F, Hen R: 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem Int*. 25:503-532, 1994

- Sayer TJ, Hannon SD, Redfern PH, Martin KF: Diurnal variation in 5-HT_{1B} autoreceptor function in the anterior hypothalamus in vivo: Effect of chronic antidepressant drug treatment. *Br J Pharmacol.* 126:1777-1784, 1999
- Schildkraut JJ: The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. 1965. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 7:524-533, 1995
- Schoeffter P, Hoyer D: 5-Hydroxytryptamine 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors mediating inhibition of adenylate cyclase activity. Pharmacological comparison with special reference to the effects of yohimbine, rauwolscine and some β -adrenoceptor antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 340:285-292, 1989
- Schoenfeld TA, Hamilton LW: Secondary brain changes following lesions: A new paradigm for lesion experimentation. *Physiol Behav.* 18:951-967, 1977
- Schweitzer P: Cannabinoids decrease the K⁺ M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* 20:51-58, 2000
- Seuven K, Magnaldo I, Pouyssegur J: Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT_{1B} receptors coupled to a Gi-protein. *Nature.* 335:254-256, 1988
- Sharp T, Hjorth S: Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT_{1A} autoreceptor. *J Neurosci Methods.* 34:83-90, 1990
- Sharp T, McQuade R, Bramwell S, Hjorth S: Effect of acute and repeated administration of 5-HT_{1A} receptor agonists on 5-HT release in rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 348:339-346, 1993
- Shaywitz AJ, Greenberg ME: CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 68:821-861, 1999
- Shearman LP, Rosko KM, Fleischer R, Wang J, Xu S, Tong XS, Rocha BA: Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB₁ receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behav Pharmacol.* 14:573-582, 2003
- Sheehan TP, Neve RL, Duman RS, Russell DS: Antidepressant effect of the calcium-activated tyrosine kinase Pyk2 in the lateral septum. *Biol Psychiatry.* 54:540-551, 2003
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH: Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci.* 19:5034-5043, 1999
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW: Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3908-3913, 1996
- Shenker A, Maayani S, Weinstein H, Green JP: Enhanced serotonin-stimulated adenylate cyclase activity in membranes from adult guinea pig hippocampus. *Life Sci.* 32:2335-2342, 1983
- Shibley MT, Halloran FJ, de la Torre J: Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 329:294-299, 1985
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E: Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 410:372-376, 2001
- Sim LJ, Selley DE, Childers SR: Autoradiographic visualization in brain of receptor-G protein coupling using [³⁵S]GTP gamma S binding. *Methods Mol Biol.* 83:117-32, 1997
- Skingle M, Sleight AJ, Feniuk W: Effects of the 5-HT_{1D} receptor antagonist GR127935 on extracellular levels of 5-HT in the guinea-pig frontal cortex as measured by microdialysis. *Neuropharmacology.* 34:377-382, 1995
- Slotkin TA, Cousins MM, Tate CA, Seidler FJ: Serotonergic cell signaling in an animal model of aging and depression: Olfactory bulbectomy elicits different adaptations in brain regions of young adult vs aging rats. *Neuropsychopharmacology.* 30:52-57, 2005

- Slotkin TA, Miller DB, Fumagalli F, McCook EC, Zhang J, Bissette G, Seidler FJ: Modeling geriatric depression in animals: Biochemical and behavioral effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 289:334-345, 1999
- Slotkin TA, Seidler FJ, Ritchie JC: Regional differences in brain monoamine oxidase subtypes in an animal model of geriatric depression: Effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats. *Brain Res.* 882:149-154, 2000
- Smith RA, Fathi Z: Recent advances in the research and development of CB₁ antagonists. *IDrugs.* 8:53-66, 2005
- Smith RS: The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses.* 35:298-306, 1991
- Song C, Leonard BE: The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:627-647, 2005
- Song C, Leonard BE: Interleukin-2-induced changes in behavioural, neurotransmitter, and immunological parameters in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroimmunomodulation.* 2:263-273, 1995
- Sprouse JS, Aghajanian GK: Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse.* 1:3-9, 1987
- Stahl SM: Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord.* 51:215-235, 1998
- Stam NJ, Van Huizen F, Van Alebeek C, Brands J, Dijkema R, Tonnaer JA, Olijve W: Genomic organization, coding sequence and functional expression of human 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor genes. *Eur J Pharmacol.* 227:153-162, 1992
- Stanley M, Mann JJ: Increased serotonin₂ binding sites in frontal cortex of suicide victims. *Lancet.* 1:214-216, 1983
- Steffens DC, Byrum CE, McQuoid DR, Greenberg DL, Payne ME, Blitchington TF, MacFall JR, Krishnan KR: Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry.* 48:301-309, 2000
- Stock HS, Ford K, Wilson MA: Gender and gonadal hormone effects in the olfactory bulbectomy animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 67:183-191, 2000
- Stockert M, Serra J, De Robertis E: Effect of olfactory bulbectomy and chronic amitriptyline treatment in rats. ³H-imipramine binding and behavioral analysis by swimming and open field tests. *Pharmacol Biochem Behav.* 29:681-686, 1988
- Stockmeier CA, Dilley GE, Shapiro LA, Overholser JC, Thompson PA, Meltzer HY: Serotonin receptors in suicide victims with major depression. *Neuropsychopharmacology.* 16:162-173, 1997
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G: Increase in serotonin_{1A} autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci.* 18:7394-7401, 1998
- Stolz JF, Marsden CA: Behavioural effects of long term inhibition of 5-hydroxytryptamine receptors using metergoline. *J Physiol (Paris).* 77:385-388, 1981
- Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P: Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science.* 311:77-80, 2006
- Tamir H, Hsiung SC, Yu PY, Liu KP, Adlersberg M, Nunez EA, Gershon MD: Serotonergic signalling between thyroid cells: Protein kinase C and 5-HT₂ receptors in the secretion and action of serotonin. *Synapse.* 12:155-168, 1992
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E: Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci.* 19:5792-5801, 1999

- Tatarczynska E, Klodzinska A, Stachowicz K, Chojnacka-Wojcik E: Effects of a selective 5-HT_{1B} receptor agonist and antagonists in animal models of anxiety and depression. *Behav Pharmacol.* 15:523-534, 2004
- Tejani-Butt S, Kluczynski J, Pare WP: Strain-dependent modification of behavior following antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27:7-14, 2003
- Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey S, Storm D, Duman RS: cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci.* 20:4030-4036, 2000
- Tiraboschi E, Tardito D, Kasahara J, Moraschi S, Pruneri P, Gennarelli M, Racagni G, Popoli M: Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology.* 29:1831-1840, 2004
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM: Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 83:393-411, 1998
- Turner JH, Raymond JR: Interaction of calmodulin with the serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem.* 280:30741-30750, 2005
- Twitchell W, Brown S, Mackie K: Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 78:43-50, 1997
- Tzavara ET, Davis RJ, Perry KW, Li X, Salhoff C, Bymaster FP, Witkin JM, Nomikos GG: The CB₁ receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: Implications for therapeutic actions. *Br J Pharmacol.* 138:544-553, 2003a
- Tzavara ET, Perry KW, Rodríguez DE, Bymaster FP, Nomikos GG: The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716A increases norepinephrine outflow in the rat anterior hypothalamus. *Eur J Pharmacol.* 426:R3-4, 2001
- Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG: Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: Site and mechanism of action. *J Neurosci.* 23:9374-9384, 2003b
- Urigüen L, Arteta D, Díez-Alarcia R, Ferrer-Alcón M, Díaz A, Pazos A, Meana JJ: Gene expression patterns in brain cortex of three different animal models of depression. *Genes Brain Behav.* 7:649-658, 2008
- Urigüen L, Pérez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J: Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB₁ receptors. *Neuropharmacology.* 46:966-973, 2004
- Uzunova V, Wrynn AS, Kinnunen A, Ceci M, Kohler C, Uzunov DP: Chronic antidepressants reverse cerebrocortical allopregnanolone decline in the olfactory-bulbectomized rat. *Eur J Pharmacol.* 486:31-34, 2004
- Van der Stelt HM, Breuer ME, Olivier B, Westenberg HG: Permanent deficits in serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: An in vivo microdialysis study. *Biol Psychiatry.* 57:1061-1067, 2005
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S, RIO-Europe Study Group: Effects of the cannabinoid-₁ receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-europe study. *Lancet.* 365:1389-1397, 2005
- Van Hooymissen JD, Chambliss HO, Holmes PV, Dishman RK: Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain Res.* 974:228-235, 2003
- Van Praag H, Frenk H: The role of glutamate in opiate descending inhibition of nociceptive spinal reflexes. *Brain Res.* 524:101-105, 1990
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH: Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 1:191-198, 2000

- Van Riezen H, Leonard BE: Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther.* 47:21-34, 1990
- Van Riezen H, Schnieden H, Wren A: Behavioural changes following olfactory bulbectomy in rats: A possible model for the detection of antidepressant drugs. *Br J Pharmacol.* 57:426P-427P, 1976
- Varrault A, Bockaert J, Waeber C: Activation of 5-HT_{1A} receptors expressed in NIH-3T3 cells induces focus formation and potentiates EGF effect on DNA synthesis. *Mol Biol Cell.* 3:961-969, 1992
- Vergaño-Vera E, Yusta-Boyo MJ, de Castro F, Bernad A, de Pablo F, Vicario-Abejón C: Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. *Development.* 133:4367-4379, 2006
- Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M: Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci.* 6:3474-3482, 1986
- Vestergaard P, Gram LF, Kragh-Sørensen P, Bech P, Reisby N, Bolwig TG: Therapeutic potentials of recently introduced antidepressants. Danish University Antidepressant Group. *Psychopharmacol Ser.* 10:190-198, 1993
- Vetulani J, Nalepa I: Antidepressants: Past, present and future. *Eur J Pharmacol.* 405:351-363, 2000
- Vinod KY, Hungund BL: Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. *Trends Pharmacol Sci.* 27:539-545, 2006
- Wamsley JK, Byerley WF, McCabe RT, McConnell EJ, Dawson TM, Grosser BI: Receptor alterations associated with serotonergic agents: An autoradiographic analysis. *J Clin Psychiatry.* 48 Suppl:19-25, 1987
- Wang D, Noda Y, Tsunekawa H, Zhou Y, Miyazaki M, Senzaki K, Nabeshima T: Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behav Brain Res.* 178:262-273, 2007
- Watanabe A, Hasegawa S, Nishi K, Nguyen KQ, Diksic M: Chronic buspirone treatment normalizes regional serotonin synthesis in the olfactory bulbectomized rat brain: An autoradiographic study. *Brain Res Bull.* 69:101-108, 2006
- Watanabe A, Tohyama Y, Nguyen KQ, Hasegawa S, Debonnel G, Diksic M: Regional brain serotonin synthesis is increased in the olfactory bulbectomy rat model of depression: An autoradiographic study. *J Neurochem.* 85:469-475, 2003
- Watts SW: Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway via the 5-HT_{2A} receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 861:162-168, 1998
- Weizman A, Burgin R, Harel Y, Karp L, Gavish M: Platelet peripheral-type benzodiazepine receptor in major depression. *J Affect Disord.* 33:257-261, 1995
- Willner P: Animal models of depression: An overview. *Pharmacol Ther.* 45:425-455, 1990
- Witkin JM, Tzavara ET, Davis RJ, Li X, Nomikos GG: A therapeutic role for cannabinoid CB₁ receptor antagonists in major depressive disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 26:609-617, 2005
- Wong DT, Robertson DW, Bymaster FP, Krushinski JH, Reid LR: LY227942, an inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake: Biochemical pharmacology of a potential antidepressant drug. *Life Sci.* 43:2049-2057, 1988
- Wrynn AS, Sebens JB, Koch T, Leonard BE, Korf J: Prolonged c-jun expression in the basolateral amygdala following bulbectomy: Possible implications for antidepressant activity and time of onset. *Brain Res Mol Brain Res.* 76:7-17, 2000
- Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, Riederer P, Saito T: Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm.* 110:671-680, 2003

- Yau JL, Kelly PA, Olsson T, Noble J, Seckl JR: Chronic amitriptyline administration increases serotonin transporter binding sites in the hippocampus of aged rats. *Neurosci Lett.* 261:183-185, 1999
- Ylidy A, Sachs GS: Administration of antidepressants. single versus split dosing: A meta-analysis. *J Affect Disord.* 66:199-206, 2001
- Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, Onaivi ES, Arinami T, Uhl GR: Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry.* 9:916-931, 2004
- Zhang Y, Raap DK, García F, Serres F, Ma Q, Battaglia G, Van de Kar LD: Long-term fluoxetine produces behavioral anxiolytic effects without inhibiting neuroendocrine responses to conditioned stress in rats. *Brain Res.* 855:58-66, 2000
- Zhou D, Grecksch G, Becker A, Frank C, Pilz J, Huether G: Serotonergic hyperinnervation of the frontal cortex in an animal model of depression, the bulbectomized rat. *J Neurosci Res.* 54:109-116, 1998
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB: Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.* 11:234-245, 1998
- Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16:109-110, 1983
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI: Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5780-5785, 1999