

**DIFERENCIAS INDIVIDUALES
EN RATONES DERROTADOS CRÓNICAMENTE:
CAMBIOS CONDUCTUALES, NEUROENDOCRINOS,
INMUNITARIOS Y NEUROTRÓFICOS
COMO MARCADORES DE VULNERABILIDAD
A LOS EFECTOS DEL ESTRÉS**

Eneritz Gómez Lázaro

Mayo de 2011

Directoras de Tesis

Dra. Larraitz Garmendia Rezola

Dra. Amaia Arregi Agirre

Facultad de Psicología-Psikologia Fakultatea
Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea

Dpto. de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo
Oinarrizko Prozesu Psikologikoen eta euren Garapenaren Saila

Esta Tesis ha sido realizada gracias a la ayuda económica de la Beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2006-12847 otorgada por el Ministerio de ciencia e innovación, disfrutada desde septiembre de 2006 hasta agosto de 2010.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis directoras, Amaia y Larraitz, además de transmitirles mi gratitud por su total confianza y flexibilidad, también me gustaría expresarles mi admiración por su capacidad de trabajo y su forma de trabajar. Esta ha sido una tesis con una supervisión constante, diaria diría yo, en la que siempre he podido contar con vosotras, en cualquier momento, y en la que siempre he sentido que mi opinión era valorada. A pesar de los agobios puntuales, sobre todo en esta última fase, me gustaría que supierais que he valorado mucho las intensas reuniones que hemos tenido, así como el tiempo que me habéis dedicado y el provecho que he obtenido de ello. A Arantza le quiero decir, que para mí fue muy emocionante que me permitiera formar parte de su grupo de investigación cuando apenas me había licenciado. Ya han pasado unos años desde entonces y todavía no te había dado las gracias por ello. Gracias, a las tres, por vuestra asertividad y por hacer que las cosas siempre terminaran resultando sencillas.

El trabajo de laboratorio es una parte fundamental de estas tesis y por ello quiero destacar a aquellas personas que han trabajado conmigo en él en diferentes momentos. A mí coetánea Zuriñe, que empezamos juntas a explorar el laboratorio y creo que para las dos fue un alivio no estar solas. A Oscar, que me ha enseñado casi todo, transmitiéndome en pocos meses el conocimiento que él había acumulado en años. Gracias por el tiempo ahorrado y tu absoluta disposición a pesar del tiempo que te quitaba de tu trabajo. A Gari, que me enseñó a hacer la proliferación celular en un momento en el que estaba a punto de depositar su tesis. Ahora soy consciente del precioso tiempo que te robé, muchas gracias. A Joana decirle, que lo que para ella fue un proceso de aprendizaje en el laboratorio para mí ha sido una ayuda inestimable, la cual me ha ahorrado algún que otro esfuerzo. Desde aquí te animo a que vivas el proceso de la tesis con el humor y la risa que te caracteriza. Por supuesto, no me puedo olvidar de Juancar, sin su magnífico trabajo en el estabulario esta tesis no hubiera sido lo mismo. Sabiendo que estabas pendiente de todo, yo he tenido la absoluta confianza y tranquilidad de que nunca iba a surgir el más mínimo problema.

Uno de los atractivos de la tesis son los congresos, así que aprovecho para dar las gracias también a mis compañeras de congresos, Aitziber Azurmendi, Eider y Yayone, sobre todo por echarme una mano con el inglés. Cuando una está haciendo la tesis también se comporte mucho

tiempo con las compañeras de despacho, gracias a Aitziber Pascual y a Elena por sus ánimos y su amistad. También resulta importante el apoyo constante de los compañeros de pasillo, gracias a Ainara, Ainhitze, Aritz, Edu, Idoia y especialmente a Joserra por su disposición para lo que hiciera falta. Por último, les agradezco a Carlota y a Maite su cooperación desinteresada ayudándome con las referencias.

Fuera del ámbito académico agradezco los ánimos de mis amigos y amigas, a pesar de que no entienden muy bien que es esto de hacer una tesis. Finalmente, no puedo menos que mencionar a mi familia. Gracias, aita y ama, por el esfuerzo que habéis hecho para que yo tuviera esta educación, sé que siempre os ha parecido muy importante que estudiara, pero creo que os he sorprendido. A mí hermano Imanol, que aunque me toma el pelo por gustarme estudiar, sé que está orgulloso de mí. Y a mi marido, Isaak, gracias por tu paciencia, por hacer de esta tesis una prioridad y relegar a un segundo plano otros aspectos importantes de la vida.

ABREVIATURAS

5HIAA	5-hidroxi-indolacético
5-HT_{1A}-R	Receptor serotoninérgico
5-HT₄-R	Receptor serotoninérgico
ACTH	Hormona adrenocorticotropina (del inglés, <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNasa	Desoxiribonucleasa
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés, <i>bovine serum albumin</i>)
CA3	Región hipocampal
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CON A	Concavalina A
CD3	Célula T
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPFm	Corteza prefrontal medial
CREB	Factor de transcripción celular (del inglés, <i>cAMP responsive element binding</i>)
CRH	Hormona liberadora de corticotropina (del inglés, <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
Ct	Ciclo umbral (del inglés, <i>cycle threshold</i>)
DO	Densidad óptica
DDT	Ditiotreitól

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E.E.M	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés, <i>enzyme linked immunoabsorbent assay</i>)
FRL	Ratas seleccionadas genéticamente por su resistencia a desarrollar características depresivas (del inglés, <i>Flinders Resistant Line</i>)
FSL	Ratas seleccionados genéticamente como modelo de depresión (del inglés, <i>Flinders Sensitive Line</i>)
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GR	Receptor glucocorticoideo
HPA	Eje hipotalámico pituitario adrenal
HPG	Eje hipotalámico pituitario gonadal
HR	Ratones seleccionados por su alta reactividad al estrés (del inglés, <i>high reactivity</i>)
IDO	Enzima indolamina 2,3-oxigenasa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Índice de proliferación
KYN	Kinurenina
LAL	Ratones con alta latencia de ataque (del inglés, <i>low attack latency</i>)
LPS	Liposacarido
LR	Ratones seleccionados por su baja reactividad al estrés (del inglés, <i>low reactivity</i>)
mAb	Anticuerpo monoclonal anti-BDNF (del inglés, <i>anti-BDNF monoclonal antibody</i>)
MR	Receptor mineralocorticoideo
NGF	Factor de crecimiento nervioso (del inglés, <i>nerve growth factor</i>)
NK	Células asesinas naturales (del inglés, <i>natural killer</i>)

NPV	Núcleo paraventricular
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
p75NTR	Receptor neurotrófico p75
pAb	Anticuerpo policlonal anti-BDNF (del inglés, <i>anti-BDNF polyclonal antibody</i>)
PHA	Fitohematoglutinina
PNF	Prueba de natación forzada
Pro-BDNF	Precursor del factor neurotrófico derivado del cerebro
rpm	Revoluciones por minuto
RS 67333	Fármaco agonista parcial de los receptores 5-HT ₄
RT-PCR	Reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa
SBF	Suero bovino fetal
SERT	Transportador de serotonina (del inglés, <i>serotonin transporter</i>)
SAL	Ratones con baja latencia de ataque (del inglés, <i>short attack latency</i>)
SAM	Eje simpático adrenomedular
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
TBST	Tampón de lavado (del inglés, <i>tris-buffered saline tween-20</i>)
Tc	Célula T citotóxica
TCR	Receptor de célula T
Th	Célula T cooperadora (del inglés, <i>T helper</i>)
TMB	Solución de sustrato (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina)
TrkB	Tropomiosina quinasa B
TRP	Triptófano
Ts	Célula T supresora
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>tumor necrosis factor</i>)

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	1
1. LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL ESTRÉS	7
1.1. Eje Hipotalámico Pituitario Adrenal (HPA).....	12
1.2. Eje Simpático adrenomedular (SAM).....	14
2. ESTRÉS Y SISTEMA INMUNITARIO	15
2.1. La respuesta inmunitaria innata y las citocinas proinflamatorias.....	19
2.2. La respuesta inmunitaria adquirida.....	22
2.3. Efectos del estrés sobre el sistema inmunitario.....	23
2.4. Relaciones entre glucocorticoides y respuesta inmunitaria.....	28
2.5. Relaciones entre catecolaminas y respuesta inmunitaria.....	29
3. ESTRÉS Y SISTEMA SEROTONINÉRGICO	33
3.1. Receptores 5-HT _{1A}	37
3.2. Receptores 5-HT ₄	38
3.3. Relaciones entre el eje HPA y serotonina.....	39
3.4. Relaciones entre citocinas proinflamatorias y serotonina.....	41
4. ESTRÉS Y FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO	43
4.1. Relaciones entre el eje HPA y el BDNF.....	47
4.2. Relaciones entre citocinas proinflamatorias y el BDNF.....	49
4.3. Relaciones entre serotonina y el BDNF.....	50
5. ESTRÉS SOCIAL, DEPRESIÓN Y DIFERENCIAS INDIVIDUALES	53
5.1. Estrés social y depresión.....	55
5.2. Diferencias individuales y vulnerabilidad a la depresión.....	62
6. RS 67333: AGONISTA PARCIAL DE LOS RECEPTORES 5-HT₄	69
II.OBJETIVOS E HIPÓTESIS	75
III.MATERIAL Y MÉTODOS	81
1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO	83
2. PROCEDIMIENTO GENERAL	84
2.1. EXPERIMENTO 1: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los niveles de corticosterona, BDNF y sistema inmunitario.....	84

2.2. EXPERIMENTO 2: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los receptores de glucocorticoides (MR y GR) y en los receptores serotoninérgicos postsinápticos (5-HT _{1A} y 5-HT ₄). Efectos del tratamiento a corto plazo con el RS 67333.....	87
2.3. Extracción de muestras biológicas.....	89
3. EVALUACIÓN CONDUCTUAL Y ESTABLECIMIENTO DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO	90
3.1. Experimento 1.....	90
3.2. Experimento 2.....	91
4. PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA (PNF)	92
5. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	93
6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA EN PLASMA	94
7. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO	96
8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 Y TNF-α EN BAZO	99
8.1. Determinación de los niveles de IL-6 en el bazo.....	99
8.2. Determinación de los niveles de TNF- α en el bazo.....	101
9. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE BDNF EN EL HIPOCAMPO	103
9.1. Determinación de los niveles de BDNF.....	103
9.2. Determinación de la cantidad de proteína (mg/ml).....	105
10. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES GLUCOCORTICOIDEOS (GR Y MR) HIPOTALÁMICOS E HIPOCAMPALES Y DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS EN EL HIPOCAMPO (5-HT_{1A} Y 5-HT₄)	107
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	111
IV.RESULTADOS	113
1. RESULTADOS EXPERIMENTO 1: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los niveles de corticosterona, BDNF y sistema inmunitario	115
1.1. Análisis de las diferencias individuales en el afrontamiento conductual al estrés social crónico por derrota	117
1.2. Estudio de la estabilidad de las estrategias de afrontamiento.....	119

1.3. Efecto de las estrategia de afrontamiento del estrés social crónico por derrota sobre el sistema neuroendocrino	120
1.3.1. Niveles de corticosterona en plasma 40 minutos después de la derrota de los días 3, 11 y 21	120
1.3.2. Niveles de corticosterona en plasma 3 días después de la última Derrota	121
1.4. Efecto de las estrategias de afrontamiento del estrés social crónico por derrota sobre el sistema inmunitario.....	121
1.4.1. Capacidad proliferativa de las células mononucleares del bazo.....	121
1.4.2. Niveles de IL-6 y TNF- α en bazo	122
1.5. Efecto de las estrategias de afrontamiento del estrés crónico por derrota sobre los niveles de proteína BDNF hipocampales.....	123
1.6. Efecto de las estrategias de afrontamiento sobre la conducta en la prueba de natación forzada.....	124
1.7. Relaciones entre las variables conductuales y fisiológicas.....	125

2. RESULTADOS EXPERIMENTO 2: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los receptores de glucocorticoides (MR y GR) y en los receptores serotoninérgicos postsinápticos (5-HT_{1A} y 5-HT₄).

Efectos del tratamiento a corto plazo con el RS 67333.	127
2.1. Análisis de las diferencias individuales en el afrontamiento conductual del estrés social crónico por derrota y el efecto de la administración del RS 67333.....	129
2.2. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre el sistema neuroendocrino.....	130
2.2.1. Niveles de corticosterona en plasma 40 minutos después de la última derrota (día 21).....	130
2.2.2. Medidas repetidas de los niveles de corticosterona previos y tres días posteriores a la terminación del estrés.....	131
2.2.3. Expresión de ARNm de GR y MR y balance MR/GR en el hipotálamo.....	132
2.2.4. Expresión ARNm de GR y MR y balance MR/GR en el hipocampo.....	134
2.3. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en bazo.....	136
2.4. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre los niveles de BDNF hipocampales.....	137
2.5. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre la expresión de receptores serotoninérgicos hipocampales: 5-HT _{1A} y 5-HT ₄	137
2.6. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 en la prueba de natación forzada.....	139
2.7. Correlaciones entre las variables conductuales y fisiológicas.....	140

V.DISCUSIÓN	143
1. Discusión Experimento 1: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los niveles de corticosterona, BDNF y sistema inmunitario	145
2. Discusión Experimento 2: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los receptores de glucocorticoides (MR y GR) y en los receptores serotoninérgicos postsinápticos (5-HT _{1A} y 5-HT ₄). Efectos del tratamiento a corto plazo con el RS 67333.	153
VI.CONCLUSIONES	163
VII.REFERENCIAS	167
VIII.ANEXO	231

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1. Representación esquemática de las principales vías de comunicación entre el SNC y el sistema inmunitario, incluyendo el eje HPA, el SNS y el circuito de retroalimentación al cerebro, a través de citocinas.....	31
Figura M1. Representación del diseño experimental del experimento 1.....	86
Figura M2. Representación del diseño experimental del experimento 2.....	88
Figura M3. Ilustración de la vena submandibular en ratón.....	89
Figura R1. Clasificación de los sujetos en función del porcentaje de tiempo dedicada a cada una de la variables conductuales analizadas el día 21 de estrés social crónico en el experimento 1.....	119
Figura R2. Niveles medios de corticosterona en plasma obtenidos por punción submandibular 40 minutos después de las derrotas, de los días 3, 11 y 21.....	120
Figura R3. Niveles medios de corticosterona en plasma tres días después de la última derrota.....	121
Figura R4. Índices medios de proliferación celular de linfocitos T y B en el bazo.....	122
Figura R5. Niveles medios de IL-6 y TNF- α en el bazo del experimento 1.....	123
Figura R6. Niveles medios de proteína BDNF en el hipocampo del experimento 1.....	123
Figura R7. Media de la latencia de inmovilidad en la prueba de natación forzada.	124
Figura R8. Clasificación de los sujetos en función del porcentaje de tiempo dedicada a cada una de la variables conductuales analizadas el día 18 de estrés social crónico en el experimento 2.....	129
Figura R9. Niveles medios de corticosterona en plasma tras la última derrota.....	131
Figura R10. Niveles medios de corticosterona en plasma, previos y posteriores a la aplicación del estrés crónico.....	131
Figura R11. Niveles medios de la expresión génica de GR en el hipotálamo en función del estrés y del tratamiento con RS 67333.....	132

Figura R12. Niveles medios de la expresión génica de MR en el hipotálamo en función del estrés y del tratamiento con RS 67333.....	133
Figura R13. Niveles medios del balance MR/GR en el hipotálamo en función del estrés y del tratamiento con RS 67333.....	134
Figura R14. Niveles medios de la expresión génica de GR en el hipocampo.....	135
Figura R15. Niveles medios de la expresión génica de MR en el hipocampo.....	135
Figura R16. Niveles medios del balance MR/GR en el hipocampo.....	135
Figura R17. Niveles medios de IL-6 y TNF- α en el bazo en el experimento 2.....	136
Figura R18. Niveles medios de proteína BDNF en el hipocampo en el experimento 2.....	137
Figura R19. Niveles medios de la expresión génica de los receptores 5-HT _{1A} en el hipocampo.....	138
Figura R20. Tiempo medio dedicado a la conducta de escalada en la prueba de natación forzada.....	139
Figura R21. Tiempo medio dedicado a las conductas de inmovilidad y natación en la prueba de natación forzada, efecto del tratamiento con RS 67333.....	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla M1. Secuencia de los cebadores, directos e inversos, utilizados para la amplificación de los genes.....	111
Tabla R1. Porcentaje medio de tiempo dedicado en el experimento 1 a cada una de las conductas analizadas en función del cluster de pertenencia.....	117
Tabla R2. Resumen del análisis discriminante.....	118
Tabla R3. Matriz de clasificación para el análisis discriminante de los grupos.....	118
Tabla R4. Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 1.....	126
Tabla R5. Correlaciones bivariadas entre las variables fisiológicas del experimento 1.....	126
Tabla R6. Porcentaje medio de tiempo dedicado en el experimento 2 a cada una de las conductas analizadas en función del cluster de pertenencia los día 18 y 21 de estrés social crónico.....	130
Tabla R7. Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas, experimento 2.....	142
Tabla R8. Correlaciones bivariadas entre las variables fisiológicas, experimento 2.....	142

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución los organismos han adquirido un sistema de respuesta eficaz para poder hacer frente a las situaciones adversas a las que están constantemente sometidos. La respuesta fisiológica de estrés está enfocada a cubrir las necesidades de un organismo que debe hacer frente a un evento estresante e implica cambios en el sistema neuroendocrino y en la conducta que permite al organismo mantener la homeostasis. Pero esta respuesta puede suponer un coste para el organismo, particularmente cuando las demandas se dan repetidamente, en un largo periodo de tiempo, o cuando se manejan ineficazmente (McEwen, 1998; McEwen, 2003) y puede producir una reducción de la capacidad de resistencia del individuo haciéndole más susceptible a padecer enfermedades o provocar alteraciones emocionales como la depresión o la ansiedad. Estas alteraciones están estrechamente relacionadas con un desequilibrio neuroquímico y suponen importantes cambios en el sistema neuroendocrino y en el sistema inmunitario. Desde los trabajos pioneros de Walter Cannon (Cannon, 1915) y Hans Selye (Selye, 1936a) son muchos los trabajos que se han realizado en torno a las implicaciones del estrés sobre el sistema neuroendocrino y sus consecuencias negativas. Más recientemente, se ha puesto en evidencia la interacción bidireccional del sistema nervioso-sistema inmunitario (Banks y Kastin, 1991; Banks y cols., 1995; Bellinger y cols., 2001; Carr y Blalock, 1991; Maier y Watkins, 1998; Plotkin y cols., 1996; Rivest y cols., 2000; Schobitz y cols., 1984) y la relación entre el estrés y la susceptibilidad a la enfermedad, dentro del marco de la Psiconeuroinmunología. La importancia de los factores psicológicos en la modulación de la actividad inmunitaria quedó establecida a partir de los trabajos de condicionamiento de la respuesta inmunitaria (Ader y Cohen, 1975) y la capacidad de modificar el impacto del estrés sobre el sistema inmunitario mediante la manipulación de variables de tipo conductual (Laudenslager y cols., 1983). Sin embargo, el estrés no sólo puede comprometer la salud a través de modificaciones de la actividad de sistemas como el inmunitario. El estrés también puede producir alteraciones en el funcionamiento cerebral (Jöels y cols., 2007) que dificultan una adaptación psicológica y disminuyen la capacidad de afrontamiento del individuo ante el mismo y resulta perjudicial tanto a nivel físico como emocional (Korte y cols., 2005; McEwen, 2000; McEwen, 2003). A este respecto, podemos mencionar que los cambios bioquímicos, tales como los implicados en el aumento de la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Buwalda y cols., 1999; Froger y cols., 2004; Grippo y cols., 2005; Heuser y cols., 1994; Holsboer y Barden, 1996; Nemeroff, 1996; Owens y Nemeroff, 1993) y los cambios en monoaminas cerebrales (Buwalda y cols., 2001b; Flugge, 1995; Flugge, 1996; Korte y cols., 1995; Mckittrick y cols., 1995;

Veenema y cols., 2003b), citocinas inflamatorias (Anisman y cols., 2008; Blandino y cols., 2006; Blandino y cols., 2009; Dantzer y cols., 2008b; Deak y cols., 2005; Maes y cols., 1995) y factores neurotróficos como el BDNF (Barrientos y cols., 2003; Pizarro y cols., 2004; Malberg y Duman, 2003) producidos por el estrés crónico se han equiparado a los encontrados en trastornos como la depresión.

Diferentes investigaciones que estudian los efectos del estrés sobre la salud han puesto en evidencia la importancia del entorno social como generador de estrés (Blanchard y cols., 2002; Sapolsky, 2005). En los seres humanos, la mayor fuente de estimulación estresante aversiva es de naturaleza social, contribuyendo en gran medida al desarrollo y expresión de diversas enfermedades sistémicas y trastornos mentales (Cherry y cols., 2006; Kar y Bastia, 2006; Matheson y cols., 2006; Pflanz y Ogle, 2006). Los estudios con animales también destacan la pérdida del control social como uno de los estímulos de mayor potencia estresante (Koolhaas y cols., 1997a). Sin embargo, no todos los individuos responden de la misma forma ante el estrés y el estudio de las diferencias individuales en los efectos que éste produce, muestra que las respuestas psicológicas y fisiológicas varían en gran medida de unos sujetos a otros. Hoy en día se acepta que la variabilidad interindividual ante el estrés depende de los estilos de afrontamiento y no tanto de las características físicas de los estresores. Es decir, que el impacto de los estresores está determinado en gran medida por la habilidad del organismo para afrontar la situación. El desarrollo de modelos animales de estrés social permite estudiar las consecuencias del estrés en función de cómo los sujetos afrontan esas situaciones y a su vez analizar la similitud de los signos conductuales y fisiológicos con los que acontecen en las patologías relacionadas con el estrés en humanos.

Por otro lado, el tratamiento con fármacos antidepresivos revierte o mejora la sintomatología inducida por el estrés (Lerer y cols., 1999; López y cols., 1998; Pittenger y Duman, 2008; Tsankova y cols., 2006), aunque la aparición del efecto tarda varias semanas y no es eficaz en todos los sujetos. El estudio de los efectos del estrés social en modelos animales nos da también la posibilidad de investigar fármacos con nuevos mecanismos de acción que sean más eficaces atendiendo a las características individuales, y que tengan un inicio de acción terapéutica más rápida que los actualmente utilizados.

El trabajo que aquí se presenta, en su conjunto, aporta una serie de datos que consideramos de interés y que contribuyen a un mejor conocimiento del fenómeno del estrés social y de sus efectos en función de la estrategia de afrontamiento utilizada por los sujetos, así

como de los mecanismos biológicos implicados y de sus consecuencias sobre la salud. Este conocimiento puede ser de utilidad para el desarrollo de tratamientos farmacológicos cada vez más específicos, así como para el estudio de aquellas estrategias conductuales y cognitivas que sean más eficaces para reducir el impacto de los efectos del estrés.

LA RESPUESTA FISIOLÓGICA
DEL ESTRÉS

“todos los organismos vitales, por variados que sean, tienen un solo objeto: mantener la constancia de las condiciones de la vida en el medio interno” (Haldane)

Los conceptos de estrés y de homeostasis se remontan a la antigua historia griega pero la integración y el estudio de ambos en relación a mecanismos fisiológicos asociados ha sido más cercana a nuestros tiempos. Se podría decir que la fisiología del estrés emergió como una disciplina real de la mano del fisiólogo Walter Cannon (1871-1945), cuando introdujo en la literatura científica el término “homeostasis” refiriéndose a la regulación y conservación del equilibrio interno. Este autor, que nunca utilizó el término estrés, postuló que en situaciones de adversidad el equilibrio homeostático resulta amenazado, y en respuesta al desafío que esto supone, se produce una reacción de emergencia que ayuda al organismo a movilizar energía para preparar una respuesta de lucha o huida (Cannon, 1929a; Cannon, 1929b; Cannon, 1939). Esta reacción de emergencia, es en realidad, una respuesta adaptativa sistematizada del organismo en la que participan una serie de procesos fisiológicos y cuya finalidad es conservar la homeostasis. En cuanto a la participación de procesos fisiológicos Cannon enfatizó la importancia del sistema nervioso simpático tras demostrar que ante situaciones de adversidad la médula adrenal segregaba dos hormonas, adrenalina y noradrenalina.

El científico canadiense de origen eslovaco Hans Selye (1907-1982) fue el que acuñó el término estrés y popularizó la teoría del estrés como una idea científico-médica (Selye, 1936a; Selye, 1950; Selye, 1974). De acuerdo con esta teoría “el estrés es una respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda” e introdujo el término “síndrome general de adaptación” con sus tres sucesivas fases (la reacción de alarma, el estado de resistencia y el estado de agotamiento), refiriéndose a los cambios causados por el estrés crónico (Selye, 1946). Es decir, ante una situación de estrés, sea de la naturaleza que sea, los individuos generan la misma respuesta adaptativa estereotipada. Las respuestas de estrés excesivas, repetidas o inapropiadas se consideraban no adaptativas y se refería a ellas como “enfermedades de adaptación”. En 1936 Selye describió los efectos de los estresores con el sobrenombre de triada patológica: agrandamiento adrenal, ulceración gastrointestinal e involución del timo (Selye, 1936b). A diferencia de Cannon, que se centró sobre la médula adrenal, Selye se interesó por el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) considerándolo el principal efector de la respuesta de estrés (Selye, 1950).

En 1971 Mason ya criticó la doctrina de la no especificidad de la respuesta de estrés desarrollada en la teoría de Selye. Sin embargo, sería años más tarde cuando Chrousos y Gold (1992) modificarían la doctrina de Selye sobre la no especificidad de la respuesta de estrés. Estos autores propusieron que la respuesta adaptativa de estrés sí muestra cierta especificidad hacia el tipo de estresor que la genera, pero que esta especificidad se pierde cuando la severidad del estresor aumenta. Así, redefinieron el estrés como un estado de desarmonía o de homeostasis amenazada que evocaría tanto respuestas específicas como no específicas. Una aportación de estos autores fue la inclusión de los factores genéticos, en interacción con el ambiente y las experiencias previas, como importantes moduladores de la respuesta individual al estrés (Chrousos y Gold, 1992).

Más recientemente se ha introducido un concepto clave en el campo de la investigación del estrés, la "alostasis" (McEwen, 1998; McEwen, 2004). La alostasis es el proceso de adaptación y reajuste fisiológico del organismo en exposición a diferentes estresores con el objetivo de retornar a la homeostasis. Cuando los mediadores de la alostasis, el cortisol o la adrenalina, son liberados en respuesta a los estresores, estos promueven la adaptación y por lo general, resultan beneficiosos. Sin embargo, cuando estos mediadores del estrés no se activan adecuadamente durante los episodios estresantes, cuando no cesan una vez terminados o cuando son utilizados en exceso, se produce un desajuste en el organismo del individuo que conduce a una "carga alostática" (McEwen, 2004; McEwen, 2007). De esta manera, se produce una reducción de la capacidad de resistencia del individuo, haciéndole más susceptible a padecer enfermedades. Estas enfermedades pueden ser de diferente índole e implicar alteraciones metabólicas, cardiovasculares, digestivas, inmunológicas y cerebrales, entre otras.

Hoy en día tanto la teoría de Cannon como la de Selye han sido desarrolladas y las actuales teorías modernas entienden el estrés como una amenaza a la homeostasis (Goldstein y McEwen, 2002; Goncalvesova y cols., 2004; Gorbunova, 1998) cuya respuesta tiene un grado de especificidad que depende, entre otras cosas, del desafío particular a la homeostasis, la percepción que el organismo hace de la situación de estrés y su habilidad para afrontarlo (Goldstein, 2001; Goldstein y McEwen, 2002). Aunque existe una gran variedad de estresores, estudios recientes indican que es más probable desarrollar un estado de carga alostática cuando el estresor es de naturaleza social y crónica (Blanchard y cols., 2002; Koolhaas y cols., 1997a). Por ello, en los últimos años el estresor de tipo psicosocial ha acaparado una especial atención no sólo en el área científica sino también a nivel divulgativo, ya que ha emergido un gran interés en

conocer los efectos que producen las experiencias vitales adversas sobre la salud mental, particularmente en relación a la depresión y los trastornos de ansiedad.

La respuesta neurofisiológica de estrés está enfocada a cubrir las necesidades de un organismo que debe hacer frente a un evento estresante y el principal requerimiento es, desde luego, energético. Cuando un animal ve su vida amenazada, por ejemplo, por el ataque de un depredador, el orden de prioridades de su organismo es claro: primero la supervivencia inmediata. Así, una vez que el cerebro ha recibido la información sensorial, si ésta es evaluada como una situación amenazante, o estresante, se desencadena una respuesta neuroquímica, fisiológica y conductual que es modulada por el sistema límbico, principalmente por el hipotálamo. En primer lugar, y con el objetivo de mantener la homeostasis, el organismo responde al estrés mediante la activación del sistema nervioso autónomo y el eje HPA, facilitando las adaptaciones conductuales, fisiológicas y neurobiológicas necesarias. Inicialmente la respuesta de estrés dará lugar a un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático. Esta actividad simpática incrementará la liberación de adrenalina y noradrenalina por parte de la medula adrenal en el torrente sanguíneo. Estas catecolaminas estimulan el corazón y aumentan el flujo sanguíneo en el sistema nervioso central y en los músculos en cuestión de segundos, permitiendo al organismo responder directamente al estresor. Seguidamente la activación del eje HPA aumentará la secreción de hormonas glucocorticoides por parte de la corteza adrenal. Los niveles máximos de estas hormonas se alcanzan habitualmente 10 ó 30 minutos después del inicio de la respuesta de estrés. La acción principal de los glucocorticoides es elevar los niveles de glucosa en sangre. Además, los glucocorticoides también son muy importantes para suprimir la respuesta de estrés, mediar en la recuperación de la misma y prepararse para el próximo reto. Ambos sistemas, considerados los primeros efectores de la respuesta de estrés, interactúan a diferentes niveles y su buen funcionamiento es esencial para la adaptación normal al estrés, sin embargo, no son los únicos sistemas implicados. Existe un tercer eje denominado hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG) cuya activación contribuye a la conservación energética inhibiendo los mecanismos relacionados con la conducta sexual y la reproducción en general. El sistema monoaminérgico central también es crucial en la respuesta de estrés ya que facilita al cerebro la interpretación de los estímulos estresantes. Las situaciones de amenaza activan el sistema noradrenérgico aumentando la atención, la vigilancia y la reactividad a los estímulos ambientales, así como el procesamiento de la información sensorial y de la respuesta motora. La activación del sistema dopaminérgico contribuye a la planificación de las respuestas conductuales y a la

focalización de la atención. Por último, el sistema serotoninérgico se relaciona con conductas de ansiedad anticipada, las cuales tienen una función adaptativa en situaciones de alarma.

1.1. El eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA)

El eje HPA además de activarse durante el estrés también es el responsable de coordinar eventos circadianos como la ingesta de alimentos o los ciclos de sueño-vigilia. Esta actividad diurna del eje HPA (periodo de oscuridad en el caso de roedores nocturnos) es el resultado de la secreción regular de hormonas glucocorticoideas al inicio del periodo de actividad. Cuando el eje HPA es activado durante el estrés o alrededor del pico circadiano, comienza a producirse la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y ésta a su vez estimula la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) en el torrente sanguíneo por parte de la pituitaria anterior. En la corteza adrenal, la ACTH se une a sus receptores y estimula la síntesis de glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en roedores) a partir del colesterol e incrementa la subsecuente liberación de estos esteroides en la circulación sistémica. Durante muchos años, se ha creído que estas hormonas glucocorticoideas actuaban principalmente a nivel del sistema nervioso periférico a través de la unión con receptores glucocorticoideos (GR) intracelulares que se encuentran en la mayoría de los órganos periféricos. Sin embargo, esta idea cambió por completo desde que se descubrió que también existían receptores para estas hormonas en el cerebro (McEwen y cols., 1968). Los glucocorticoides entran fácilmente en el cerebro debido a su naturaleza lipofílica pudiendo unirse también a receptores mineralocorticoideos (MR) además de a los GR (De Kloet y Reul, 1987). Estos dos tipos de receptores difieren en su distribución a lo largo de todo el cerebro y en su afinidad a los corticosteroides. Los MR predominan en estructuras cerebrales límbicas (hipocampo, hipotálamo, amígdala y septum), mientras que los GR tienen una distribución más amplia (Chao y cols., 1989; Van Eekelen y cols., 1988). Los MR tienen una gran afinidad por la corticosterona, aproximadamente 10 veces superior a la que tienen los GR (Reul y De Kloet, 1985). Como consecuencia, cuando los niveles de corticosterona son bajos (en condiciones basales) los receptores mayoritariamente ocupados serán los MR, mientras que los GR serán ocupados adicionalmente cuando los niveles de corticosterona aumenten, bien alrededor del pico circadiano o bien durante la respuesta de estrés (Reul y De Kloet, 1985; Reul y cols., 1987). La afinidad diferenciada de estos dos receptores por la corticosterona, además de la diferente distribución

cerebral, podría indicar que la corticosterona también tiene funciones diferenciadas después de su unión con uno u otro receptor. Los MR determinan la sensibilidad de la respuesta del eje HPA y se piensa que están involucrados en la evaluación de los estímulos ambientales, preparando al organismo para respuestas conductuales que eviten perturbar la homeostasis (De Kloet y cols., 1993; De Kloet y cols., 1998). La activación de los GR (además de los MR ya activados) es necesaria para dar terminación a la repuesta del eje HPA, para mediar en la recuperación del estrés, para facilitar la adaptación conductual y para preparar al organismo ante un nuevo estrés (De Kloet y cols., 1993; De Kloet y cols., 1998).

La mayor densidad de MRs y GRs se encuentra en el hipocampo, una estructura implicada en funciones tan importantes como son el estado de ánimo, la cognición y la conducta (Isaacson, 1974), por ello se piensa que ambos receptores desarrollan un papel fundamental en dichas funciones. De hecho, los resultados derivados de diversos trabajos confirman que la acción de los GR y MR en el hipocampo tienen un gran impacto sobre la regulación neuroendocrina (Dallman y cols., 1992; Jacobson y Sapolsky, 1991), la función neuronal (Jöels y De Kloet, 1992; Jöels y De Kloet, 1994), la plasticidad neuronal (Magariños y cols., 1996; McEween, 1994), la cognición (De Kloet y cols., 1999; Oitzl y De Kloet, 1992) y la neurogénesis del hipocampo (Gass y cols., 2000; Gould y cols., 1997). Así, las acciones mediadas por los MR y GR en las neuronas hipocampales aparentemente son críticas para el correcto funcionamiento neuronal. Esta creencia ha llevado a la hipótesis de que el equilibrio entre los MR y GR hipocampales es crítico para el mantenimiento de la homeostasis (De Kloet, 1991; De Kloet y cols., 1998).

La existencia de un feedback negativo ejercido a través de la activación de los MR y GR a distintos niveles del eje HPA impide su excesiva activación. Así, en respuesta a niveles elevados de glucocorticoides (alrededor del pico circadiano y durante el estrés) la activación sinérgica de ambos receptores conduce a una supresión del eje HPA (Bradbury y cols., 1994; Ratka y cols., 1989). La ocupación de los GR hipotalámicos e hipofisarios conduce a la inhibición de la actividad del eje HPA mediante la supresión de la transcripción de genes que codifican CRH y ACTH, respectivamente (De Kloet y Reul, 1987; De Kloet y cols., 1998; Meaney y cols., 1991). Por otra parte, la activación de los MR en el hipocampo ejerce un control inhibitorio tónico sobre el eje HPA cuando los niveles de glucocorticoides son bajos (Dallman y cols., 1989; Ratka y cols., 1989).

1.2. El eje Simpático adrenomedular (SAM)

El sistema nervioso autónomo, formado por el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático, responde inmediatamente al estrés controlando una amplia gama de funciones vegetativas (cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, renal, endocrina, etc.). En respuesta a un estresor se activa la rama simpática del sistema nervioso autónomo desencadenando la respuesta del sistema adrenomedular. En la respuesta del sistema simpático participa el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, bien directamente o bien a través del núcleo del tracto solitario y del núcleo del *locus coeruleus*, ambos situados en el tronco cerebral. Estos núcleos modulan, mediante sus conexiones descendentes, la actividad de las células nerviosas de la cadena simpática liberando noradrenalina sobre las células diana. Además, cuando la rama simpática activa la médula adrenal ésta libera adrenalina y noradrenalina al torrente sanguíneo. Estas catecolaminas se unen a receptores adrenérgicos localizados en diversos tejidos e intensifican la acción simpática, facilitando así reacciones rápidas de “lucha o huida”. De esta manera, por ejemplo, la activación de los receptores adrenérgicos del corazón producirá un aumento de la frecuencia cardíaca y del volumen sistólico, una vasodilatación en los músculos y la constricción de vasos sanguíneos epidérmicos e intestinales, garantizando un mayor aporte sanguíneo al cerebro y a los músculos y disminuyéndolo a órganos cuya función no es imprescindible en la respuesta inmediata de estrés. La activación simpática también causa la relajación de la musculatura bronquial en los pulmones, así como un incremento de la frecuencia respiratoria permitiendo una mejor ventilación pulmonar y, por lo tanto, un mayor aporte de oxígeno a la sangre. Además, la adrenalina estimula la glicogénesis en el hígado incrementando los niveles séricos de glucosa, provocando la rápida movilización de recursos energéticos almacenados. En conjunto, estos procesos permiten una redistribución del flujo sanguíneo, además de nutrientes, en órganos que precisan mayor actividad o aporte energético en respuesta a un esfuerzo físico y también en el cerebro, facilitando una mayor atención y capacidad de respuestas rápidas y flexibles.

2

ESTRÉS Y
SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario ha sido considerado un sistema de defensa, en cierta forma autónoma, con capacidad de autorregulación e independiente del sistema nervioso, cuya función era defender al organismo ante la invasión de cualquier agente extraño. Sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo en los últimos 30 años en el campo de la psiconeuroinmunología han puesto de manifiesto que los procesos inmunitarios están regulados por el cerebro, y que a su vez, las funciones neurales y endocrinas, al igual que la conducta, están reguladas por el sistema inmunitario. La psiconeuroinmunología, el área interdisciplinar de investigación que examina estas relaciones entre el cerebro, la conducta y el sistema inmunitario, ha desempeñado un papel clave en la exploración de los mecanismos conductuales y biológicos que relacionan entre sí los factores psicosociales, la salud y la enfermedad (Zachariae, 1996).

El primer estudio que podríamos denominar “psiconeuroinmunológico” fue publicado en 1919 y sugería que las emociones negativas podrían influir en el sistema inmunitario de los pacientes con tuberculosis (Ishigami, 1919). En la década de 1920, el equipo de Pavlov (1849-1936) llevó a cabo una serie de experimentos animales estudiando las interacciones entre el cerebro y el sistema inmunitario que indicaron que las respuestas inmunitarias eran susceptibles de ser condicionadas. En esta misma línea, otros estudios encontraron que la asociación repetida de un estímulo neutro (calor) con un antígeno estimulante del sistema inmunitario (bacteria inactivada) resultaba en una activación de la respuesta inmunitaria cuando el estímulo neutro era presentado solo (Metal’nicov y Chorine, 1926). Posteriormente, en la década de 1950 y 1960, algunos estudios sugerían que el estrés psicológico podía incrementar la susceptibilidad a las infecciones (Rasmussen y cols., 1957), y exacerbar enfermedades autoinmunitarias como el lupus (Fessel y Solomon, 1960) y la artritis reumatoide (Solomon y cols., 1964). El término “psiconeuroinmunología” apareció por primera vez en 1981 cuando el psicólogo Robert Ader publicó una revisión antológica con el mismo nombre, donde presentaba las evidencias disponibles hasta el momento a favor de la existencia de asociaciones entre la conducta y procesos neurales, endocrinos e inmunitarios (Ader, 1981). El primer encuentro oficial de la psiconeuroinmunología tuvo lugar en el año 1986 y se abordaron las siguientes preguntas fundamentales: ¿hay alguna evidencia de la existencia de una interacción específica entre el cerebro y el sistema inmunitario?, ¿sí es así, estas interacciones son importantes o triviales?, ¿cómo son mediadas estas interacciones, humoralmente o mediante la inervación de órganos linfoides?, ¿son bidireccionales? Así, surgieron nuevas preguntas sobre los mejores métodos a utilizar en este nuevo campo interdisciplinario (Cohen, 1987).

Han pasado tres décadas desde entonces y la investigación en el campo de la psiconeuroinmunología ha dado respuesta a esas preguntas mostrando evidencias de una extensa comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema inmunitario. Se sabe que tanto el sistema nervioso simpático como el sistema nervioso parasimpático inervan órganos y tejidos que están asociados al sistema inmunitario (ganglios linfáticos, timo, bazo y médula ósea). También se han hallado asociaciones celulares neurales e inmunitarias en tejidos cutáneos, gastrointestinales y en la mucosa (Bellinger y cols., 2001). Finalmente, se ha reconocido que el sistema nervioso y el inmunitario se comunican a través de un lenguaje bioquímico común que consiste en hormonas, neurotransmisores, citocinas y sus respectivos receptores (Carr y Blalock, 1991). Todas estas evidencias han confirmado la existencia de una red compleja bidireccional cerebro-inmunitaria, y han proporcionado una base biológica para la antigua creencia de que la mente puede jugar un papel importante en la salud y en la enfermedad.

Para entender las relaciones entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso central y la influencia del estrés en esta relación es necesario analizar los componentes de la función inmunitaria. El sistema inmunitario está compuesto por células específicas y órganos linfoides que protegen al organismo de la invasión de cuerpos extraños, tales como virus, bacterias, hongos, parásitos o procesos neoplásicos, mientras que reconoce y respeta los tejidos propios sanos.

Las células inmunocompetentes, que en su mayoría son leucocitos, están distribuidas por todo el organismo incluyendo fluidos (sangre y linfa), tejidos (piel, mucosa, etc.) y órganos linfoides. Los leucocitos forman un grupo heterogéneo de células que se forman a partir de células madre, que principalmente se encuentran en la médula ósea y el timo, mediante un proceso denominado hematopoyesis. En una primera fase se produce un proceso de diferenciación que da lugar a la formación de dos líneas celulares diferentes, la mielomonocítica y la linfocítica. Las células progenitoras mieloides se diferencian a su vez en siete líneas celulares que tras un proceso de maduración se convertirán en basófilos y mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos, células dendríticas mielomonocíticas, eritrocitos y plaquetas, siendo los dos últimos no-leucocitarios. Las células progenitoras linfoides producen linfocitos T (timo), linfocitos B (médula ósea), células asesinas naturales, conocidas como "natural killer" o NK (timo y médula ósea) y células dendríticas linfocíticas (médula ósea).

Los órganos linfoides contienen linfocitos en diferentes estados de maduración y se clasifican en primarios y secundarios. Entre los primarios tenemos la médula ósea, zona de

linfopoyesis y maduración de linfocitos B, y el timo, donde maduran los linfocitos T. Una vez que los linfocitos B y T abandonan los órganos primarios donde han madurado se dirigen al torrente sanguíneo alcanzando los órganos secundarios que son el bazo, los ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas en las amígdalas, intestino y tracto urogenital. Estos órganos secundarios proporcionan el medio idóneo en el que las células del sistema inmunitario pueden interactuar entre sí y con el antígeno, desarrollando así la defensa del organismo.

El cuerpo también dispone de barreras naturales de defensa tales como la piel, que por su contenido en ácidos grasos dificulta la proliferación bacteriana, o como las mucosas que revisten superficies internas del organismo (tracto respiratorio e intestinal), que actúan bloqueando la adherencia de sustancias extrañas para eliminarlas posteriormente mediante diferentes mecanismos. Por otro lado, fluidos corporales como la orina, la saliva y las lágrimas contienen sustancias bactericidas capaces de producir la lisis de numerosos microorganismos.

2.1. La respuesta inmunitaria innata y las citocinas proinflamatorias

Sí algún microorganismo o sustancia susceptible de provocar daño supera las barreras naturales arriba mencionadas el sistema inmunitario desplegará su primera línea de defensa mediante la intervención de *la inmunidad innata*, también denominada natural o inespecífica. Las características que definen la inmunidad innata son: su acción de tipo local, la celeridad de la respuesta, la no especificidad ante los antígenos y no poseer memoria inmunológica. Este tipo de respuesta inmunitaria se limita a actuar allí donde se ha producido la infección mediante un proceso de inflamación en el que intervienen varios tipos celulares. La inflamación fundamentalmente es impulsada por unas proteínas llamadas citocinas proinflamatorias que ante la detección de un agente invasor provocan la migración y la infiltración de leucocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos y monocitos, en los tejidos dañados o infectados, que eliminan de forma fagocitaria microorganismos y células alteradas. En este tipo de respuesta también participan las células NK.

Las citocinas son moléculas mensajeras secretadas por varios tipos celulares tanto a nivel periférico como a nivel central. Aunque sus actividades biológicas son diversas, en general se distinguen dos grandes grupos de citocinas: las proinflamatorias y las antiinflamatorias. Las citocinas proinflamatorias están asociadas con la inflamación, la activación inmunitaria y la diferenciación o muerte celular. En el proceso de inflamación mediado por la inmunidad innata

las citocinas que están más directamente involucradas son la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6), el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). También hay otras citocinas proinflamatorias como la interleucina-2 (IL-2) y la interleucina-5 (IL-5) que están asociadas a la inmunidad celular. Por otro lado, las citocinas antiinflamatorias son las responsables de amortiguar la respuesta inmune, este último grupo incluye la interleucina-4 (IL-4), la interleucina-10 (IL-10) y la interleucina-3 (IL-3). Existen algunas citocinas, como la interleucina-8 (IL-8), que dependiendo de su concentración pueden ejercer ambas funciones (Janeway y Travers, 1997; Kronfol y Remick, 2000).

A nivel periférico, la cantidad de citocinas proinflamatorias depende directamente del estado de la activación inmunológica. En condiciones de inflamación, aguda o crónica, el sistema inmune incrementa la actividad de los macrófagos los cuales aumentan la producción y liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α . A pesar de la existencia de la barrera hematoencefálica y la naturaleza proteica de las citocinas, se ha demostrado que las citocinas de origen periférico pueden llegar al cerebro uniéndose a receptores específicos y que en consecuencia el sistema nervioso central responde con un proceso de inflamación local denominado neuroinflamación. Hasta el momento se han identificado cuatro vías principales de comunicación mediante las cuales las citocinas pueden comunicar con el cerebro:

1. Estimulación de las fibras nerviosas aferentes viscerales: Las citocinas proinflamatorias producidas localmente (periféricas) pueden estimular las fibras nerviosas aferentes viscerales que se comunican con el cerebro a través del nervio vago (Maier y Watkins, 1998).
2. Paso de las citocinas al cerebro a través de la circulación periférica por aquellas regiones donde está ausente la barrera hematoencefálica: Estas regiones permiten la difusión pasiva de las citocinas que están en el torrente sanguíneo dejándolas entrar en el cerebro donde irán a parar al líquido cefalorraquídeo (Rivest y cols., 2000; Schobitz y cols., 1994).
3. Activación inducida por las citocinas en células endoteliales cerebrales o del plexo coroideo: A través de este mecanismo las citocinas sin necesidad de entrar en el sistema nervioso central pueden activar células cerebrales que inducirán la secreción de un segundo mensajero (prostaglandinas y óxido nítrico) (Rivest y cols., 2000; Schobitz y cols., 1994).

4. Transporte activo de las citocinas proinflamatorias a través de la barrera hematoencefálica: a través de este mecanismo pequeñas cantidades de citocinas proinflamatorias pueden llegar a circuitos de regulación neuroendocrina (Banks y Kastin, 1991; Banks y cols., 1995; Plotkin y cols., 1996).

Una vez que la señal de citocinas proinflamatorias llega al cerebro por cualquiera de estas cuatro vías, esta señalización es transmitida y amplificada dentro de la red de citocinas que existe en el cerebro (Benveniste, 1998; Quan y cols., 1999; Rothwell y cols., 1996). Una forma de amplificar esta señalización es la de inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- α , por parte del hipotálamo y otras regiones cerebrales (Gatti y Bartfai, 1993; Laye y cols., 1994; Quan y cols., 1994; Spangelo y cols., 1990; Vam Dam y cols., 1992). Así, se ha demostrado que existe una producción a nivel central de citocinas proinflamatorias y receptores específicos para éstas principalmente por parte de astrocitos y la microglia, (Breder y cols., 1988, Breder y cols., 1993; McGeer y McGeer, 1995), aunque bajo ciertas circunstancias las neuronas también pueden asumir este cometido (Freidin y cols., 1992). Las zonas cerebrales encargadas de la producción de citocinas proinflamatorias son varias: regiones circunventriculares, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, ganglios basales y núcleos del tronco cerebral (Anisman y Merali, 2002; Breder y cols., 1988; Kronfol y Remick, 2000). La función exacta de las citocinas proinflamatorias centrales IL-1, IL-6 y TNF- α todavía no está muy clara pero se piensa que contribuyen al desarrollo y plasticidad neuronal, a la sinaptogénesis y a la reparación de tejidos (Aloisi y cols., 1995; Beattie y cols., 2002; Muñoz-Fernández y Fresno, 1998). Sin embargo, es sabido que las citocinas proinflamatorias también pueden tener efectos adversos sobre la función neuronal cuando son sintetizadas en altas concentraciones o el tiempo de exposición a éstas es prolongado (Allan y Rothwell, 2001; Anisman y Merali, 2002; Hayley y cols., 2005). Finalmente y en relación con esto, recientemente se ha observado que los estresores no inmunológicos pueden inducir la expresión de citocinas proinflamatorias en el cerebro y esto sugiere que la señalización de estas citocinas está involucrada en las respuestas neuroendocrinas y conductuales al estrés (Bierhaus y cols., 2003).

2.2. La respuesta inmunitaria adquirida

La respuesta inflamatoria es importante porque responde con gran celeridad ante la infección pero no es la respuesta más adecuada para contener la mayoría de las infecciones hasta el punto de suprimirlas. En estos casos se requiere la intermediación de la segunda línea de defensa de la que dispone el sistema inmunitario, *la inmunidad adquirida*, también denominada adaptativa o específica. Las características de la inmunidad adquirida son, por un lado, la proliferación y diferenciación de células inmunitarias específicas para antígenos concretos, y por otro lado, la memoria inmunológica. Las células inmunocompetentes que median en este tipo de inmunidad son los linfocitos B y los linfocitos T, y cada línea linfocítica está especializada en un tipo de inmunidad específica, la humoral y la celular, respectivamente.

La respuesta inmune humoral es mediada por los linfocitos B (células B) que reconocen el antígeno de manera específica a través de inmunoglobulinas de membrana (Ig), que tienen la capacidad de anteponerse al antígeno uniéndose a él. Tras la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) las inmunoglobulinas informan de la presencia del antígeno y se activan las células B que generan y liberan una gran cantidad de anticuerpos específicos para este antígeno y no para otro. Así, el antígeno resulta destruido a través de diferentes mecanismos que dependen del tipo de inmunoglobulina que participa. No obstante, en la destrucción del antígeno, además de los anticuerpos, también colaboran *macrófagos*, *células polimorfonucleares* y *células NK*. Algunas de las células B activadas se desarrollan para convertirse en “células memoria” que harán posible una respuesta inmunitaria más rápida ante ulteriores invasiones del mismo antígeno. Es decir, este mecanismo tiene “capacidad de aprendizaje” y es específico; no obstante, es muchísimo más lento que la inmunidad innata porque se estima que requiere de al menos 3 ó 5 días para que pueda darse la unión Ag-Ac una vez el antígeno haya penetrado en el organismo (Maier y Watkins, 1998).

Numerosos agentes patógenos que penetran en el organismo, como los virus, infectan y viven en el interior de células para poder replicarse. En estas circunstancias los anticuerpos liberados por los linfocitos B en plasma y otros fluidos no son eficaces porque no pueden introducirse en las células, por lo que es necesaria otro tipo de estrategia defensiva: la inmunidad celular. En esta respuesta participan los linfocitos T (células T), que a su vez, pueden ser *linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2)*, *linfocitos T citotóxicos (Tc)* y algunos autores también proponen los *linfocitos T supresores/reguladores (Ts)*. Los linfocitos T reconocen al antígeno mediante el

receptor de célula T (TCR) y lo hacen, solo, cuando el antígeno tras haber sido degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (CPA) estas lo expresan en la superficie de su membrana junto con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

Las CPA que tienen como misión captar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T, son células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, que tras fagocitar los antígenos los inactivan y los presentan en su superficie. Las moléculas CMH son una serie de glicoproteínas que se expresan en las membranas de todas las células del organismo mediante las cuales el sistema inmunitario es capaz de distinguir “lo propio” de “lo ajeno”. Estas moléculas pueden ser de dos tipos, de la clase I y de la clase II, y cada una de ellas está especializada en la presentación de un tipo de antígeno. Las moléculas CHM-I se asocian a antígenos peptídicos que son sintetizados dentro de las células y, por lo general, son derivados de virus. Las moléculas CHM-II se asocian a antígenos peptídicos derivados de la degradación de bacterias y grandes proteínas que han sido ingeridas por las CPA.

Una vez que el antígeno es reconocido mediante la intervención del TCR los linfocitos T se activan y comienzan a proliferar en todas sus variedades y a liberarse en la circulación sanguínea. Las células T cooperadoras liberan una gran cantidad de citocinas tales como la IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10, al espacio intracelular y éstas a su vez activan y dirigen otro tipo de células inmunitarias. Por un lado, regulan el crecimiento de los linfocitos B, con la consiguiente liberación de nuevas inmunoglobulinas. Por otro lado, potencian la acción de los macrófagos, la expansión clonal de los linfocitos T citotóxicos y la activación de células T supresoras. Por su parte, los linfocitos T citotóxicos atacan directamente al antígeno uniéndose él y liberando sustancias tóxicas responsables de su eliminación. Por último, la activación de las células T supresoras ayuda a regular la respuesta inmune celular para que ésta no sea desmedida y no produzca efectos nocivos contra el propio organismo. Al igual que ocurre con los linfocitos B, los linfocitos T también desarrollan memoria inmunológica.

2.3. Efectos del estrés sobre el sistema inmunitario

El conocimiento de la naturaleza de la relación entre el estrés y el sistema inmunitario han ido cambiando con el tiempo. En un inicio, a raíz de los resultados hallados por Selye (1975) quién observó una involución del timo producida por la exposición al estrés crónico, se propuso

un modelo en el cual el estrés tenía un efecto supresor global sobre la función inmunitaria. Los primeros estudios realizados en humanos obtuvieron resultados que apoyaban este modelo inicial, ya que mostraban que el estrés crónico, en general, cursaba junto con una reducción de la citotoxicidad de las células NK y de la respuesta proliferativa de linfocitos (Cohen y cols., 2001; Herbert y Cohen, 1993a; Kiecolt-Glaser y cols., 1996). Los estudios que examinaron el impacto del estrés sobre la respuesta de las células T en humanos mostraron una reducción de la proliferación de las células mononucleares sanguíneas en respuesta a mitógenos como la concavalina A (Con A) y la fitohematoglutinina (PHA) (Bartrop y cols., 1977; Schleifer y cols., 1983). Aunque no siempre se han replicado estos mismos resultados, los estudios de meta-análisis realizados en este área han llegado al consenso de que ocurre un decremento de la respuesta de las células T en sujetos tanto estresados como deprimidos (Irwin y Miller, 2007; Zorrilla y cols., 2001). La conclusión general fue que el estrés puede ser inmunosupresor y por lo tanto, perjudicial para la salud (Cohen y Herbert, 1996; Irwin y cols., 1990a; Khansari y cols., 1990; Kiecolt-Glaser y cols., 1996; Maier y cols., 1994; Marucha y cols., 1998; Padgett y cols., 1998; Sheridan, 1998), facilitando la adquisición de enfermedades infecciosas y neoplásicas que parecen contraer con mayor facilidad las personas que sufren de estrés crónico (Andersen y cols., 1994; Cohen y Williamson, 1991).

Aunque este modelo de inmunosupresión adquirió una gran popularidad y hoy en día sigue siendo muy influyente, hubo investigadores como Dhabhar y McEwen (1997, 2001) que ponían en duda que esta inmunosupresión fuera generalizada, puesto que desde una perspectiva evolucionista era muy poco adaptativo para la supervivencia. Estos autores realizaron una serie de experimentos con ratones y encontraron que en situaciones de estrés agudo las células T eran redistribuidas de forma selectiva contribuyendo así a la mejora de la respuesta inmunitaria (Dhabhar y McEwen, 1996; Dhabhar y McEwen, 1997; Dhabhar y McEwen, 1999). El estrés agudo, mediante la participación de hormonas y citocinas, aumenta la vigilancia inmunitaria redistribuyendo la circulación leucocitaria hacia órganos vasculares como la piel, el tracto gastrointestinal y urogenital. Así, en el caso de que el estrés venga acompañado de un desafío inmunológico, como una herida o como una infección, el organismo ya está preparado para dar una respuesta inmunitaria contundente (Dhabhar y cols., 2000). Así, fueron apareciendo trabajos que versaban sobre la capacidad inmunomoduladora del estrés (Spencer y cols., 2000; Wiegers y Reul, 1998; Wilckens y De Rijk, 1997), así como de la activación inmunitaria debida al estrés a nivel celular (Wood y cols., 1993), humoral (Persoons y cols., 1995; Cocke y cols., 1993) e innato

(Lyte y cols., 1990; Shurin y cols., 1994). A partir de estos trabajos se planteó la posibilidad de que el estrés podría equilibrar la respuesta inmunitaria activando procesos de la inmunidad innata y disminuyendo procesos de la inmunidad adquirida. La premisa en la que se basaba esta idea era que las respuestas inmunológicas innatas eran más adecuadas porque se desarrollaban más rápido, estaban sujetas a menos restricciones inhibitorias y requerían un menor gasto energético (Dopp y cols., 2000; Sapolsky, 1998).

La existencia de datos que relacionaban el estrés crónico con enfermedades asociadas a una inmunidad reducida (enfermedades infecciosas y neoplásicas) y por otro lado, con enfermedades asociadas a una actividad inmunológica excesiva (alergias y enfermedades autoinmunes) llevó a plantear que el estrés crónico podía provocar simultáneamente el aumento y la supresión de la respuesta inmunitaria mediante la alteración de los patrones de secreción de citocinas (Marshall y cols., 1998). La supresión de las citocinas liberadas por las células Th1, involucradas en la activación de la inmunidad celular, y especializadas en resolver procesos infecciosos y neoplásicos, haría que el organismo fuera más vulnerable. Esta supresión a su vez ejercería efectos permisivos sobre la liberación de las citocinas producidas por las células Th2, que activan la inmunidad humoral, exacerbando procesos alérgicos y enfermedades autoinmunes (Marshall y cols., 1998).

Así, se abrió un nuevo camino de investigación que tomaba en consideración el papel de las citocinas para explicar los vínculos entre el estrés, los cambios inmunológicos y las enfermedades. En los últimos años, la mayoría de los estudios se han centrado en analizar la activación inflamatoria producida por el estrés, incluyendo el estrés psicosocial, en individuos sanos (Bierhaus y cols., 2003; Dickerson y cols., 2004; Pace y cols., 2006). Así, cada vez son mayores las evidencias de una activación inflamatoria tanto en animales como en humanos estresados. A nivel periférico, se ha observado que el estrés agudo aumenta la cantidad de marcadores inflamatorios en la circulación sanguínea en roedores (Grippo y cols., 2005; Hale y cols., 2003; Johnson y cols., 2005) y en humanos, en los cuales particularmente se han encontrado niveles altos de IL-1, IL-6 y TNF- α (Steptoe y cols., 2007). A nivel central, en roedores, también se ha observado que el estrés induce la liberación de citocinas en varias regiones cerebrales (Barnum y cols., 2008; Blandino y cols., 2006; Blandino y cols., 2009; Goshen y cols., 2008; Grippo y cols., 2005; Johnson y cols., 2005; Kwon y cols., 2008; Murray y Lynch, 1998; Nguyen y cols., 1998). Las citocinas liberadas en respuesta a una lesión, una enfermedad o una infección causan un conjunto de conductas organizadas que tienen el objetivo de optimizar la

supervivencia (Hart, 1988). Este fenómeno conductual fue definido con el término de “conducta de enfermedad” (Kent y cols., 1992) y se manifiesta cuando las citocinas proinflamatorias periféricas estimulan en el cerebro una cascada de señalización de citocinas cerebrales (Dantzer y cols., 2008a; Dantzer y cols., 2008b). La conducta de enfermedad es un fenómeno presente en muchas especies que incluye la manifestación de una serie de características conductuales entre las que se encuentran la reducción de la actividad exploratoria, psicomotora, sexual, alimenticia y de aseo, además de un incremento de la sensibilidad al dolor, trastornos del sueño y respuestas alteradas a estímulos gratificantes y afectivos (miedo, anhedonia y falta de interés por las interacciones sociales), y en ocasiones fiebre. Se considera que estos patrones conductuales activados por las citocinas en respuesta a un desafío inmunológico tiene bases adaptativas ya que facilitan la convalecencia, aumentando las posibilidades de supervivencia. En este sentido, se cree que estos mismos cambios conductuales también forman parte de una respuesta adaptativa ante el estrés psicológico ya que la debilidad física conlleva a evitar una serie de peligros y amenazas como por ejemplo, la predación o los conflictos sociales.

El aumento de citocinas producido tanto por el estrés psicosocial (Danese y cols., 2008) como por una serie de enfermedades médicas (Evans y cols., 2005) se asocia con una elevada incidencia de depresión. Desde hace mucho tiempo se viene observando que las conductas de enfermedad se superponen con los síntomas de la depresión (Smith, 1991). Esto no significa, de ninguna manera, que las enfermedades depresivas sean adaptativas, sino que el mecanismo por el cual las citocinas orquestan toda una serie de respuestas conductuales altamente adaptativas y reversibles en respuesta a una infección en individuos sanos, pueda ser también el mecanismo por el cual se produzcan síntomas psicológicos y conductuales característicos de la depresión en individuos vulnerables (Dantzer y cols., 2008a; Dantzer y cols., 2008b).

En resumen, podríamos decir, que dentro del campo de la psiconeuroinmunología el estudio de las relaciones entre el estrés y el sistema inmunitario ha tenido dos líneas de investigación predominantes. La primera de ellas ha estudiado la relación entre el estrés y la supresión inmunitaria, acompañada de una reducida respuesta proliferativa de células inmunitarias y un deterioro de la inmunidad tanto innata como adquirida (Evans y cols., 2002; Glaser y Kiecolt-Glaser, 1998; Irwin y Miller, 2007; Kiecolt-Glaser y Glaser, 2002; Leserman y cols., 2000; Leserman y cols., 2002; Spiegel y Giese-Davis, 2003). La segunda línea de investigación ha examinado la relación entre el estrés y la activación inmunitaria, que va acompañada de la proliferación de células inmunitarias y un incremento de la producción de citocinas

proinflamatorias (Dantzer y cols., 1999; Evans y cols., 2005; Miller y cols., 2009; Raison y cols., 2006). Las evidencias tanto de supresión como de activación inmunitaria en el estrés han llevado a la conclusión de que ambas situaciones concurren en los mismos individuos de forma que algunos aspectos inmunitarios resultan suprimidos mientras que otros son activados.

La literatura emergente sugiere que los procesos inflamatorios producidos por una activación inmunitaria pueden suprimir algunos aspectos de la inmunidad innata y la inmunidad adquirida celular (Medzhitov, 2008). Se ha encontrado que la exposición crónica a TNF- α produce una reducción de la función y la expresión del complejo TCR/CD3, de la expresión de IL-2 (Clark y cols., 2005), una supresión del funcionamiento y la expresión de células NK (Eleftheriadis y cols., 2008; Eleftheriadis y cols., 2009; Vaknin y cols., 2008) y de células T (Cope, 2003; Eleftheriadis y cols., 2009; Vaknin y cols., 2008). Otros datos muestran que la inflamación crónica también puede mediar en la relación entre el estrés y la supresión de la inmunidad humoral (Kiecolt-Glaser y cols., 1996; Moraska y cols., 2002). Por otro lado, también es posible que esta relación entre la inflamación crónica y la supresión inmunitaria sea bidireccional. Es sabido que las células T reguladoras tienen capacidades antiinflamatorias ya que suprimen o inhiben las respuestas inmunitarias excesivas o inapropiadas mediante la liberación de citocinas antiinflamatorias como por ejemplo la IL-10 (Bach, 2002; Rook y Lowry, 2008; Workman y cols., 2009). En condiciones normales, cuando las células T resultan activadas estas comienzan a secretar citocinas proinflamatorias como el INF- γ y a continuación citocinas antiinflamatorias como la IL-10, y siempre en presencia de niveles elevados de IL-2 (Cardone y cols., 2010). Aparentemente, una respuesta inmune celular adecuada es un mecanismo autorregulador que reprime los procesos inflamatorios. En este sentido, algunos autores piensan que la disfunción de las células T reguladoras pueden contribuir a la prolongación de los procesos inflamatorios (Miller, 2010; Roybal y Wulfig, 2010; Zanin-Zhorov y cols., 2010). Este mecanismo puede ser relevante para la desregulación inmunitaria que ocurre en los trastornos relacionados con el estrés como por ejemplo la depresión donde se ha encontrado una alteración en la proliferación de linfocitos (Zorrilla y cols., 2001) así como una producción reducida de IL-2 en respuesta a mitógenos (Anisman y cols., 1999).

2.4. Relaciones entre glucocorticoides y respuesta inmunitaria

Los glucocorticoides modulan procesos fisiológicos, metabólicos e inmunitarios para restaurar la homeostasis (Chorusos y Gold, 1992). Cuando ocurre una infección, las células inmunitarias que resultan activadas secretan citocinas proinflamatorias y estas a su vez inciden en el eje HPA estimulando la liberación de glucocorticoides (Besedovsky y cols., 1986; Ruzek y cols., 1997). El incremento de estas hormonas pone en marcha un proceso de regulación inhibitorio mediante su unión a receptores específicos (MR y GR) expresados en células de tejidos inmunitarios (Lowy, 1989; Spencer y cols., 1991). Así, los glucocorticoides reducen la expresión de citocinas proinflamatorias y otras moléculas, finalizando el proceso inflamatorio (Almawi y cols., 1996; Cato y Wade, 1996). Una vez que cesa la inflamación los niveles de glucocorticoides retornarán a condiciones basales (Brattsand y Linden, 1996).

Cuando en respuesta al estrés aumentan los niveles de glucocorticoides, estas hormonas también actúan suprimiendo la actividad inmunitaria (Raison y Miller, 2001; Schleifer y cols., 1999; Schleifer y cols., 2002). Una vez que la respuesta de estrés acaba y los niveles de glucocorticoides vuelven a condiciones basales, los efectos inhibitorios desaparecen. Sin embargo, cuando la respuesta de estrés se prolonga y ocurre una hiperactividad del eje HPA, la liberación continua de glucocorticoides da lugar a una inmunosupresión sostenida, provocando deficiencias funcionales en muchos parámetros inmunitarios (Birmaher y cols., 1994; Maes, 1993). Se ha observado que la exposición crónica a glucocorticoides, tanto en respuesta al estrés como en ensayos en los que se han administrado glucocorticoides sintéticos, suprime la inmunidad innata y la inmunidad adquirida, reduciendo la circulación leucocitaria, la proliferación de linfocitos y la maduración de células dendríticas, además de inducir la apoptosis de basófilos, eosinófilos y células T (De Bosscher y cols., 2003; Sorrells y Sapolsky, 2007).

A pesar de las propiedades antiinflamatorias de los glucocorticoides hay trabajos que han encontrado que en situaciones de estrés crónico puede haber un aumento de la actividad inmunitaria aunque haya niveles elevados de glucocorticoides (Bohus y cols., 1993; Klein y cols., 1992; Lyte y cols., 1990). Esto ha llevado a sugerir que los GR expresados en las células inmunitarias son hipofuncionales además de estar reducidos en número, y que en consecuencia los glucocorticoides no pueden suprimir la actividad inmunitaria, es decir las células son resistentes a los efectos de los glucocorticoides (Avitsur y cols., 2001; Pariante y Miller, 2001; Raison y Miller, 2003; Stark y cols., 2001). La disminución tanto en el número como en la

funcionalidad de los receptores GR puede ser debida al aumento continuado de los glucocorticoides (Stark y cols., 2001; Avitsur y cols., 2001) y también el resultado de la exposición crónica a citocinas proinflamatorias que inciden en las señales de transducción y transcripción de estos receptores (Hu y cols., 2009; Pace y cols., 2007; Wang y cols., 2004).

Recientemente se ha señalado que los glucocorticoides pueden aumentar la actividad inmunitaria en situaciones de estrés agudo. En trabajos realizados tanto en humanos como en animales, *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que los glucocorticoides pueden potenciar las respuestas inflamatorias periféricas y centrales provocadas por la administración de un antígeno, cuando estas hormonas son administradas antes que el antígeno. Por el contrario, si los glucocorticoides son administrados después del antígeno estos suprimen la respuesta proinflamatoria (Barber y cols., 1993; Frank y cols., 2010; Johnson y cols., 2002; Smyth y cols., 2004). Estos trabajos han dado lugar a la hipótesis de que los glucocorticoides liberados por el estrés agudo pueden aumentar la respuesta inmunitaria en un desafío inmunológico posterior (Dhabhar, 2009; Sorrells Sapolsky y cols., 2007; Sapolsky y cols., 2009).

2.5. Relaciones entre catecolaminas y respuesta inmunitaria

Junto con los glucocorticoides, las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) constituyen otro grupo importante de hormonas mediadoras del estrés, ya que éste estimula las fibras noradrenérgicas simpáticas provocando la liberación de catecolaminas por parte de la medula adrenal. Así, al igual que en el caso de los glucocorticoides las catecolaminas también regulan las respuestas inmunitarias inducidas por el estrés a través de su unión con receptores α y β adrenérgicos localizados en las células inmunitarias.

Muchos autores sugieren que las catecolaminas median en el aumento de la liberación de citocinas proinflamatorias, periféricas y centrales, inducidas por el estrés (Bierhaus y cols., 2003; Johnson y cols., 2005; Sorrells y Sapolsky, 2007). Por ejemplo, se ha demostrado, que las catecolaminas liberadas durante la exposición a un estrés físico juegan un papel importante en el incremento de citocinas proinflamatorias observado (Johnson y cols., 2005). También hay evidencias de que la adrenalina liberada en respuesta a un estrés psicológico puede inducir la liberación de TNF- α e IL-6 (Black, 2006). Sin embargo, otros estudios también han mostrado que las catecolaminas pueden ejercer efectos antiinflamatorios reduciendo la liberación de citocinas, tales como la IL-1 β y el TNF- α , en respuesta a un estrés agudo por natación (Connor y cols.,

2005). Hay otros trabajos que describen a la noradrenalina como la inductora de los efectos antiinflamatorios observados en modelos animales de trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y la esclerosis múltiple (Galea y cols., 2003).

Los estudios farmacológicos indican que las catecolaminas pueden ejercer tanto efectos proinflamatorios como antiinflamatorios en función del receptor que resulte bloqueado o estimulado. Se ha observado que el bloqueo de los receptores α -adrenérgicos, con prazosin o labetalol, en situaciones de estrés atenúa los efectos proinflamatorios de la IL-1 β e IL-6 circulantes, mientras que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos, con propranolol, previene la liberación de la IL-1 β en el hipotálamo, el hipocampo y la pituitaria (García-Bueno y cols., 2008). Además, la estimulación de los receptores β -adrenérgicos con isoproterenol induce la liberación de IL-6, IL-1 β y su proteína en el hipotálamo, el hipocampo y la pituitaria (Johnson y cols., 2005).

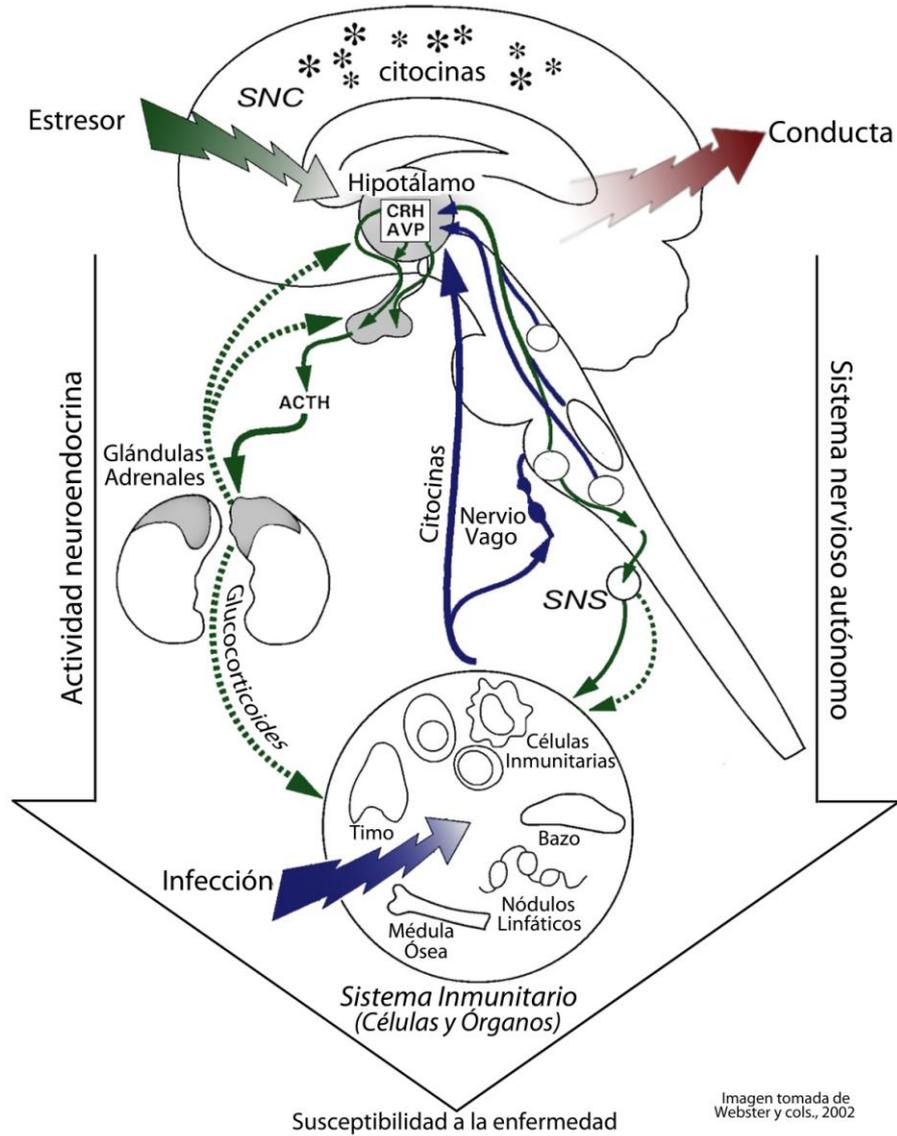


Figura 11. Representación esquemática de las principales vías de comunicación entre el SNC, el sistema inmunitario, incluyendo el eje HPA, el SNS y el circuito de retroalimentación al cerebro, a través de las citocinas.

3

ESTRÉS Y
SISTEMA SEROTONINÉRGICO

El sistema serotoninérgico es considerado el más antiguo filogenéticamente ya que se ha observado que existen receptores serotoninérgicos en los organismos más primitivos. Además, las neuronas serotoninérgicas son las primeras en generarse durante el desarrollo y la serotonina es liberada antes de que se establezcan las sinapsis convencionales (Gaspar y cols., 2003). En el cerebro es un neurotransmisor omnipresente que se sintetiza a partir de un aminoácido esencial (L-triptófano) fundamentalmente en las neuronas serotoninérgicas que están localizadas en los núcleos del rafe (Dahlstrom y Fuxe, 1964). A partir de estos núcleos las neuronas serotoninérgicas se proyectan prácticamente a todas las partes del sistema nervioso central conformando una de las redes neuroquímicas más extensas del cerebro. Una de las regiones que más proyecciones recibe es el hipocampo y la mayoría de ellas proceden del núcleo medial del rafe. La amplia distribución de fibras serotoninérgicas a lo largo de todo el sistema nervioso central permite controlar una gran variedad de funciones por parte de la serotonina. Así, la serotonina interviene en la regulación del humor, el sueño, la vigilia, la alimentación, la libido y funciones cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje. El sistema serotoninérgico también está implicado en la respuesta de estrés contribuyendo a la formación de las respuestas conductuales que el organismo prepara en respuesta al estrés psicológico (Graeff y cols., 1996). Recientemente, algunos autores han demostrado que ciertas subregiones del núcleo dorsal del rafe están particularmente involucradas en el estrés y en la ansiedad (Abrams y cols., 2004; Abrams y cols., 2005; Lowry, 2002; Maier y Watkins, 2005; Silva y cols., 2002). En respuesta a diferentes estresores, la actividad de las neuronas serotoninérgicas aumenta, tal y como demuestra el rápido incremento de la expresión génica que sucede en el núcleo dorsal del rafe (Amat y cols., 2005; Grahn y cols., 1999; Takese y cols., 2004). Asimismo, la síntesis y la liberación de serotonina incrementan en varias regiones cerebrales (Amat y cols., 2005; Bland y cols., 2003; Clement y cols., 1993; Grahn y cols., 1999; Greenwood y cols., 2003; Inoue y cols., 1994; Kawahara y cols., 1993; Keeney y cols., 2006; Kirby y cols. 1997; Maswood y cols., 1998; Pei y cols., 1990; Takahashi y cols., 2000).

En las últimas décadas se ha recopilado un gran número de datos sobre los transportadores y receptores que median en el funcionamiento del sistema serotoninérgico y cuyas acciones son las responsables de modular las respuestas de adaptación ante el estrés. La serotonina que se libera en respuesta al estrés se elimina del espacio extracelular mediante un transportador muy afín a la serotonina. Este transportador serotoninérgico (SERT ó 5HTT) determina la magnitud y la duración de la actividad serotoninérgica sobre los receptores

presinápticos y postsinápticos, además de regular el volumen de transmisión de serotonina a nivel extrasináptico (Blakely y cols., 1991; Torres y Amara, 2007). Aunque existen varios estudios que muestran una disminución de la expresión génica del SERT por efecto tanto del estrés agudo como del crónico en el núcleo dorsal del rafe (McKittrick y cols., 2000; Arborelius y cols., 2004; Vázquez y cols., 2000; Vollmayr y cols., 2000), también hay datos que indican que no hay alteraciones en la recaptación de serotonina mediada por el SERT en respuesta al estrés agudo (Martin y cols., 2000).

También hay otros estudios que relacionan el SERT con la conducta de ansiedad. La eliminación del gen de este transportador (*Slc6a4*), en ratones, produce una pérdida del aclaramiento de serotonina y un aumento de los niveles extracelulares de serotonina (Mathews y cols., 2004; Montañez y cols., 2003) que se ha asociado al incremento de conductas de ansiedad en varios test (Ansorge y cols., 2004; Carroll y cols., 2007; Fox y cols., 2007; Holmes y cols., 2002; Holmes y cols., 2003a, Holmes y cols., 2003b; Kalueff y cols., 2007; Lira y cols., 2003; Zhao y cols., 2006), que empeoran con la exposición repetida al estrés (Wellman y cols., 2007; Zhao y cols., 2006). Por el contrario, los ratones transgénicos que sobreexpresan este gen muestran un repertorio más reducido de conductas de ansiedad (Jennings y cols., 2006). Los estresores que activan el sistema serotoninérgico pueden estimular tanto vías ansiogénicas como vías ansiolíticas, dependiendo del tipo de receptor que resulte estimulado. Por ejemplo, la activación de los receptores 5-HT_{2A} en el hipocampo tiene efectos ansiogénicos mientras que la activación de los receptores 5-HT_{1A} los suprime (Graeff y cols., 1993). En la actualidad se han identificado 15 receptores serotoninérgicos (Hoyer y cols., 2002) que se dividen en 7 familias con sus respectivos subtipos: **5-HT_{1A}** (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}), **5-HT₂** (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), **5-HT₃** (5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}), **5-HT₄**, **5-HT₅** (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}), **5-HT₆** y **5-HT₇**. Excepto el receptor 5-HT₃ que es ionotrópico el resto de receptores son metabotrópicos. La serotonina liberada dentro del espacio extracelular actúa sobre estos receptores tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico. A continuación se analizan los receptores serotoninérgicos que han sido objeto de estudio en el presente trabajo de tesis.

3.1 Receptores 5-HT_{1A} (5-HT_{1A}-R)

Estos receptores, a nivel periférico, se encuentran en el bazo, los riñones, el intestino y el páncreas, regulando funciones relacionadas con estos órganos (Kirchgessner y cols., 1993; Raymond y cols., 1993). A nivel cerebral, están distribuidos a lo largo de todo el sistema nervioso central. En el núcleo dorsal del rafe los receptores 5-HT_{1A} son somatodentríticos y actúan como autorreceptores, regulando su actividad neuronal. A nivel postsináptico, estos receptores median en las acciones serotoninérgicas de regiones corticolímbicas, tales como la corteza prefrontal medial (CPFm), la amígdala y el hipocampo (Riad y cols., 2000; Sotelo y cols., 1990; Verge y cols., 1986). Estos receptores se acoplan a la proteína G_{i/o} inhibiendo el disparo neuronal a través de la reducción del adenosin monofosfato cíclico (AMPC) (Aghajanian, 1995). A pesar de estar establecida la participación de estos receptores en la regulación de algunas respuestas fisiológicas y conductuales, todavía queda por esclarecer si estas respuestas son mediadas por receptores presinápticos o postsinápticos.

La activación de los autorreceptores localizados en los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas inhibe el disparo de éstas en el núcleo dorsal del rafe (Clifford y cols., 1998; Sprouse y Aghajanian, 1986). Este es un mecanismo mediante el cual el sistema serotoninérgico puede autorregular su propia actividad bajo las condiciones de un estímulo estresante. Sin embargo, en situaciones de estrés crónico parece ser que este mecanismo resulta comprometido. En varios trabajos se ha observado que el estrés repetido desensibiliza los autorreceptores 5-HT_{1A} que controlan el disparo neuronal en el núcleo dorsal del rafe (Froger y cols., 2004; Laaris y cols., 1995; Laaris y cols., 1997; Lanfumey y cols., 1999). Otros trabajos muestran que la pérdida de la función de los autorreceptores como resultado de la exposición al estrés, incrementa la concentración de serotonina en el espacio extracelular del núcleo dorsal del rafe (Amargos-Bosch y cols., 2004; Bortolozzi y cols., 2004; He y cols., 2001). Además, estos receptores no sólo pueden controlar la actividad serotoninérgica en respuesta al estrés a través de sus acciones como autorreceptores, sino que también pueden influir indirectamente en la actividad del núcleo dorsal del rafe vía receptores 5-HT_{1A} postsinápticos localizados en la CPFm y el núcleo subtalámico, que a su vez presentan proyecciones al núcleo dorsal del rafe (Peyron y cols., 1998; Temel y cols., 2007). Los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos se expresan en abundancia en el hipocampo (Lanfumey y Hamon, 2004), y se considera que juegan un papel fundamental en la adaptación al estrés y en la regulación de funciones hipocampales, tales como la memoria y el

aprendizaje (McEwen, 1987; Meijer y De Kloet, 1998). Hay datos que apoyan la idea de que el hipocampo, al igual que la amígdala y la CPFm, está involucrado en transmitir información sobre las características de los estresores. Así, la interpretación sobre la severidad, la duración y el tipo de estresor pueden promover cambios dinámicos en los receptores 5-HT_{1A} hipocampales que pueden conducir al organismo a responder bien con conductas adaptativas o bien con conductas maladaptativas (Maren y Quirk, 2004; McHugh y cols., 2007).

3.2. Receptores 5-HT₄ (5-HT₄-R)

Este receptor se expresa tanto en la periferia como en el cerebro. A nivel periférico, estos receptores controlan funciones urinarias, cardíacas, adrenales y fundamentalmente gastrointestinales donde se expresan tanto en células enterocromafinas como en neuronas entéricas (Hegde y Eglén, 1996). En los nervios y músculos entéricos, la estimulación de los receptores 5-HT₄ facilitan la liberación de acetilcolina y la relajación del colon (Gershon, 2005; Irving y cols., 2007). Por ello, se han utilizado fármacos agonistas de estos receptores para el tratamiento del estreñimiento y del síndrome del intestino irritable (Kale-Pradhan y Wilhelm, 2007; Tonini y Pace, 2006). También se han desarrollado fármacos antagonistas para el tratamiento de las arritmias cardíacas (Murray y cols., 2007).

A nivel central, los receptores 5-HT₄ se expresan con mayor densidad en los bulbos olfatorios, en la ínsula, los ganglios basales, en el núcleo acumbens, hipocampo y la sustancia negra. También se encuentran en menor densidad en la amígdala, el hipotálamo y la corteza (Jakeman y cols., 1994; Manuel-Apolinar y cols., 2005; Waeber y cols., 1994). Estos receptores estimulan la producción de AMPc facilitando que las neuronas respondan a los inputs excitatorios (Andrade y cols., 1991; Mlinar y cols., 2006). Recientemente se ha observado que los receptores 5-HT₄ ejercen un control de feedback negativo sobre el núcleo dorsal del rafe, por vía indirecta a través de la CPFm (Lucas y Debonnel, 2002; Lucas y cols., 2005). Los receptores 5-HT₄ son expresados en neuronas GABAérgicas estriatales y en sus proyecciones al globo pálido y a la sustancia negra (Compan y cols., 1996; Patel y cols., 1995). En la corteza, el hipocampo y amígdala, además de encontrarse en neuronas glutamatérgicas es probable que también se hallen en neuronas colinérgicas, ya que su estimulación provoca la liberación de acetilcolina (Bockaert y Dumuis, 1997; Bockaert y cols., 2004; Bonaventure y cols., 2000; Eglén y cols., 1995;

Huang y Kandel, 2007; Matsumoto y cols., 2001; Yamaguchi y cols., 1997). Por último, también tienen efectos estimuladores sobre el sistema nigro-estriatal dopaminérgico (Lucas y cols., 2001).

Actualmente se sabe que los receptores 5-HT₄ modulan algunos aspectos cognitivos y conductuales. Un gran número de estudios ha observado que los fármacos agonistas específicos de estos receptores pueden mejorar de manera efectiva el aprendizaje y la memoria en animales (Bockaert y cols., 2004; Huang y Kandel, 2007; Lamirault y Simon, 2001; Lelong y cols., 2001; Manuel-Apolinar y cols., 2005; Micale y cols., 2006; Pérez-García y cols., 2006; Terry y cols., 1998). Debido a que es un receptor todavía poco estudiado no está claro su papel en relación al estrés y patologías asociadas. Existen trabajos que han observado que los ratones transgénicos que carecen de estos receptores muestran una reducción de las conductas de ansiedad en respuesta al estrés, y también, que ciertos cambios intestinales y alimenticios producidos por el estrés resultan atenuados (Compan y cols., 2004; Conductier y cols., 2006). Otros estudios que han utilizado antagonistas de los receptores 5-HT₄ encuentran resultados similares (Kennett y cols., 1997; Smriga y Torii, 2003). Por otro lado, los estudios que han utilizado agonistas de los receptores 5-HT₄, en ratas, han encontrado una reducción de los perfiles depresivos en una serie de pruebas conductuales, como por ejemplo la prueba de natación forzada (Lucas y cols., 2007). A partir de estos trabajos se ha sugerido que los receptores 5-HT₄ podrían tener un papel importante en trastornos relacionados con el estrés, tales como la depresión y la ansiedad, y en su tratamiento (Duman, 2007)

3.3. Relaciones entre el eje HPA y serotonina

Los estudios realizados en animales y en humanos han demostrado que la activación del eje HPA en respuesta a diferentes estresores produce cambios en el turnover de serotonina a nivel cerebral (Amat y cols., 2005; Bland y cols., 2003; Clement y cols., 1993; Grahn y cols., 1999; Greenwood y cols., 2003; Inoue y cols., 1994; Maswood y cols., 1998; Pei y cols., 1990). Los procedimientos experimentales como la adenolectomía y la administración de corticosterona endógena han demostrado que esta hormona estimula la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa y el turnover serotoninérgico en el cerebro (Singh y cols., 1990). Por otro lado, también hay evidencias de que el sistema serotoninérgico influye a su vez en la secreción de corticosterona (Klaassen y cols., 2002; Wetzler y cols., 1996) y que varios son los tipos de receptores que participan en esta regulación.

El impacto de la desregulación del eje HPA sobre la actividad de los receptores 5-HT_{1A} ha sido muy estudiado tanto en animales (Fairchild y cols., 2003; Hensler y cols., 2007; Laaris y cols., 1999; Lanfumey y cols., 1999; Leitch y cols., 2003; McAllister-Williams y cols., 2001; Young y cols., 1992; Young y cols., 1994a) como en humanos (McAllister-Williams y cols., 2007; Young y cols., 1994b). Estos estudios han demostrado que un tratamiento crónico con glucocorticoides atenúa los efectos fisiológicos de los agonistas de los receptores 5-HT_{1A}, sugiriendo que ocurre una regulación a la baja o una desensibilización de los receptores somatodendríticos 5-HT_{1A}. En relación a los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} también se ha observado que tanto el estrés crónico como la administración de corticosterona producen una desensibilización o una regulación a la baja de estos receptores en el hipocampo (Chalmers y cols., 1994; Karten y cols., 1999; Lopez y cols., 1998; Van Riel y cols., 2003; Van Riel y cols., 2004), la corteza frontal (Watanabe y cols., 1993), el hipotálamo y la amígdala (Vicentric y cols., 2006). En otros trabajos se ha observado que la exposición a un estrés psicosocial produce una disminución del número de receptores 5-HT_{1A} en la corteza cingulada posterior, la corteza parietal, el hipocampo y la corteza prefrontal en tupayas (*tupaia belangeri*) (Flugge, 1995; Flugge y cols., 1998). El hecho de que estos efectos del estrés puedan ser prevenidos por la adenolectomía (Chalmers y cols., 1994) sugiere que la desregulación de los receptores somatodendríticos y postsinápticos está relacionada con los glucocorticoides. También hay datos que indican que el incremento de glucocorticoides por exposición al estrés está, en parte, inducido por la acción de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} localizados en neuronas hipotalámicas que producen CRH (Lesch y Gutknecht, 2004; Raap y Van de Kar, 1999; Schule, 2007).

Los glucocorticoides a través de la unión con sus receptores específicos, MR y GR, en múltiples áreas límbicas (hipocampo, la amígdala, la CPFm y el hipotálamo) pueden regular la actividad serotoninérgica. La ocupación de receptores MR por parte de los glucocorticoides inhibe tónicamente la neurotransmisión serotoninérgica mientras que la ocupación de GRs inhibe la expresión de los receptores 5-HT_{1A} (Flugge, 1995; Lopez y cols., 1998; Ou y cols., 2001). En un principio no se creía que los GR tuvieran capacidad de regulación sobre los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos, sin embargo los estudios han ido mostrando niveles significativos de inmunoreactividad y una alta densidad de GRs en el núcleo dorsal del rafe (Cintra y cols., 1991; Harsstrand y cols., 1986; Morimoto y cols., 1996).

Los trabajos que han examinado la relación entre los receptores 5-HT₄ y la actividad del eje HPA son muy escasos. Un trabajo realizado por Bijak y colaboradores (2001) indica que la

administración crónica de corticosterona incrementa la actividad de los receptores 5-HT₄ en las neuronas hipocampales y que en consecuencia, disminuye el efecto inhibitorio neto de la serotonina en el hipocampo.

3.4. Relaciones entre citocinas proinflamatorias y serotonina

Una vez que la señal de citocinas llega al cerebro, éstas tienen la capacidad de influir en la síntesis, en la liberación y en la recaptación de las monoaminas (Lacosta y cols., 2000; Linthorst y cols., 1995; Merali y cols., 1997; Miller, 2008; Pauli y cols., 1998; Song y cols., 1999). Numerosos trabajos en animales han demostrado que la administración de citocinas puede afectar al metabolismo de la serotonina, la noradrenalina y la dopamina (Anisman y cols., 2008c; Felger y cols., 2007). En estos trabajos se ha observado que los cambios neuroquímicos varían en función de la región cerebral estudiada y que son específicos a la citocina administrada (Song y cols., 1999). Así, por ejemplo, la administración sistémica de IL-1 en ratas incrementa la actividad dopaminérgica, noradrenérgica y serotoninérgica en el hipotálamo, núcleo acumbens e hipocampo (Anisman y Merali, 1999; Dunn y cols., 1999; Merali y cols., 1997; Song y cols., 1999), mientras que la administración intracerebroventricular de TNF- α no afecta la neurotransmisión serotoninérgica hipocampal (Pauli y cols., 1998). Por último, la administración sistémica de IL-6 incrementa la neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo, núcleo acumbens y corteza frontal (Dunn y cols., 1999; Müller y Ackenheil, 1998; Song y cols., 1999).

La mayoría de los trabajos que han estudiado el mecanismo a través del cual las citocinas pueden influir en la síntesis de serotonina se han centrado en la función de la enzima indolamina 2,3-oxigenasa (IDO). Mediante la estimulación de múltiples vías inflamatorias las citocinas pueden activar esta enzima (Fujigaki y cols., 2006), que descompone el triptófano (TRP), el aminoácido precursor de la serotonina, en kinurenina (KYN) contribuyendo a la reducción de la disponibilidad de serotonina (Dantzer y cols., 2008b; Scwarcz y Pellicciari, 2002). Capuron y colaboradores (2003) realizaron un trabajo que apoya la mediación de la enzima IDO en los síntomas depresivos o la conducta de enfermedad que inducen las citocinas. Estos autores observaron que los síntomas depresivos que desarrollaban los pacientes administrados con IFN- α se asociaban con niveles reducidos de TRP y elevados de KYN en sangre. En este mismo sentido, otros autores también encontraron que el bloqueo de la enzima IDO en ratones, inhibía el desarrollo de conductas de tipo depresivo inducidas por un antígeno como el LPS (O'Connor y cols., 2008). En humanos, también se ha encontrado que la administración de INF- α reduce la

concentración del metabolito de la serotonina (5HIAA) en el fluido cerebroespinal, y que además esta reducción correlacionaba con el incremento de la IL-6, la cual a su vez podría activar la enzima IDO (Raison y cols., 2010). En cuanto a la capacidad de las citocinas para influir en la recaptación de las monoaminas, se ha observado que las citocinas, tales como la IL-1 y el TNF- α , pueden aumentar la actividad del transportador serotoninérgico (SERT) y en consecuencia, incrementar la recaptación de serotonina (Zhu y cols., 2006). En conjunto, los datos sugieren que las citocinas influyen tanto en la síntesis como en la recaptación de la serotonina contribuyendo a la reducción de su disponibilidad.

4

ESTRÉS Y
FACTOR NEUROTRÓFICO
DERIVADO DEL CEREBRO

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una proteína que pertenece a la familia de las neurotrofinas, en la que también se incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4 (NT-4). Entre todas ellas, el BDNF es la neurotrofina más ampliamente distribuida por todo el sistema nervioso central y sus mayores niveles se encuentran en el hipocampo y corteza prefrontal (Hofer y cols., 1990; Yan y cols., 1997). Esta neurotrofina es producida principalmente por las neuronas, pero también puede ser sintetizada y liberada por astrocitos que están bajo el control de la actividad neuronal (Balkowiec y Katz, 2000; Juric y cols., 2006). En un principio se creía que el BDNF era transportado únicamente de forma retrógrada desde las terminales hacia los cuerpos neuronales (Di Stefano y cols., 1992), pero hoy día se sabe que también es transportada de forma anterógrada, siendo liberada en el espacio sináptico (Conner y cols., 1997; Fawcett y cols., 1998). Aunque todavía no se sabe por qué se activa un tipo de transporte u otro, hay datos que indican que esto depende de una serie de parámetros, tales como la zona estimulada, el tiempo de estimulación, etc., y que además, la clase de transporte determinará las acciones biológicas resultantes (Heerssen y Segal, 2002).

El BDNF no sólo se localiza en el cerebro, sino que también se encuentra en la periferia. Además, el BDNF no se sintetiza exclusivamente en el cerebro ya que también existe una producción a nivel periférico (Donovan y cols., 1995; Nakahashi y cols., 2000; Noga y cols., 2003) que puede llegar al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica, a través de un sistema de transporte saturable (Pan y cols., 1998). Los estudios realizados en animales indican que existe una fuerte correlación entre los niveles de BDNF periféricos y BDNF centrales durante la maduración y el envejecimiento (Karege y cols., 2002a). Se ha observado que los niveles de BDNF en sangre y cerebro resultan alterados por igual por efecto del tratamientos con antidepresivos (Chen y cols., 2001; Shimizu y cols., 2003), en la esquizofrenia (Durany y cols., 2001; Toyooka y cols., 2002) y en la enfermedad de Alzheimer (Connor y cols., 1997; Laske y cols., 2007), entre otros.

En un principio se pensó que el BDNF era una proteína secretora cuya función era estimular la supervivencia de neuronas periféricas. En la actualidad se sabe que es un factor importante implicado en múltiples funciones centrales entre las que se incluyen la supervivencia y migración neuronal, la diferenciación fenotípica, el crecimiento axónico y dendrítico, y la formación de sinapsis (Huang y Reichardt, 2001; Lewin y Barde, 1996), y también en la regulación de la plasticidad sináptica y la conducta (McAllister y cols., 1999; Poo, 2001; Lu, 2003). Además,

estudios recientes sugieren que el BDNF participa de forma notable en el desarrollo de funciones cognitivas, particularmente en la adquisición y consolidación de la memoria (Lu y Woo, 2006; Pang y cols., 2004; Tyler y cols., 2002). Estudios con ratones deficientes en BDNF han mostrado que esta neurotrofina también está involucrada en el aprendizaje (Linnarsson y cols., 1997), en la obesidad (Lyons y cols., 1999), y en el desarrollo de la ansiedad (Ríos y cols., 2001) y la depresión (Chan y cols., 2006). Los efectos del BDNF en la periferia no han sido muy estudiados pero parece ser que contribuye a la regeneración de nervios dañados (Novilova y cols., 1997) y a la regulación del sistema inmunitario (Schuhmann y cols. 2005; Schenone y cols., 1996).

El BDNF ejerce estos efectos neurotróficos a través de su unión con dos receptores específicos, la tropomiosina quinasa B (TrkB) de alta afinidad y el receptor de neurotrofinas p75NTR de baja afinidad. La mayoría de las funciones ejercidas por el BDNF son atribuidas a su unión con el receptor TrkB (Chao, 2003; Huang y Reichardt, 2003; Kaplan y Miller, 2000). Por otro lado, el precursor de esta neurotrofina, el pro-BDNF, se une preferentemente con el receptor p75NTR (Gentry y cols., 2004; Teng y cols., 2005).

La expresión de BDNF en el cerebro es regulada por una serie de factores entre los que se incluyen el ejercicio (Berchtold y cols., 2005), el ambiente enriquecido (Rossi y cols., 2006), accidentes cerebrovasculares como las isquemias (Lee y cols., 2004) y el estrés (Jacobsen y Mørk, 2006; Nair y cols., 2007). Fueron Smith y colaboradores (1995a) los que observaron por primera vez que el estrés agudo reducía la expresión de ARNm-BDNF en el hipocampo. Desde entonces varios son los trabajos en animales que indican que no sólo el estrés agudo sino que también el estrés crónico produce una reducción de la expresión de ARNm-BDNF hipocampal (Duman, 2004b; Duman y Monteggia, 2006; Nair y cols., 2007; Nibuya y cols., 1999; Roceri y cols., 2002; Smith y cols., 1995b; Vollmayr y cols., 2001). A nivel periférico también se han encontrado niveles reducidos de BDNF en sangre en pacientes con trastornos del ánimo y expuestos a situaciones de estrés severas (Karege y cols., 2005a; Licinio y Wong, 2002; Shimizu y cols., 2003). Aunque la mayoría de los trabajos coinciden en que existe una reducción del BDNF en el hipocampo por efecto del estrés crónico, hay autores que no han encontrado cambios (Kuroda y McEwen, 1998). Hay que tener en cuenta, también, que los estresores no afectan por igual la expresión de BDNF en todas las áreas cerebrales. Al contrario que en el hipocampo, en otras estructuras cerebrales como el hipotálamo (Rage y cols., 2002; Smith y cols., 1995c) o la pituitaria (Smith y cols., 1995c) se observa un aumento de esta misma neurotrofina por efecto del estrés.

Por otra parte, existen trabajos que han encontrado que el estrés agudo puede aumentar transitoriamente los niveles de ARNm-BDNF en la corteza prefrontal y cingulada en ratas (Molteni y cols., 2001), en el lóbulo frontal en ratones (Molteni y cols., 2009) y también en el hipocampo en ratas (Marmigere y cols., 2003). En este sentido, se ha propuesto que este rápido incremento de la expresión de BDNF tras un estrés agudo representa un mecanismo protector a corto plazo que facilita la preservación de la homeostasis neuronal (McEwen, 2008). Por el contrario, una exposición más prolongada reduciría la expresión de ésta neurotrofina en esas mismas regiones cerebrales, perjudicando la plasticidad neuronal, tal y como han mostrado diferentes paradigmas de estrés crónico, incluyendo el psicosocial (Fumagalli y cols., 2003; Fumagalli y cols. 2004; Rasmusson y cols., 2002; Roceri y cols., 2004). No obstante, los efectos del estrés crónico no están claros, ya que recientemente se ha encontrado que un estrés crónico de 21 días también puede incrementar de manera intensa los niveles de BDNF en el hipocampo, el hipotálamo y la pituitaria (Naert y cols., 2011). Realmente, todavía se desconocen los mecanismos exactos mediante los cuales el estrés crónico puede modular la expresión de BDNF, por lo que se ha comenzado a considerar y estudiar la mediación de sistemas involucrados en la respuesta de estrés.

4.1. Relaciones entre el eje HPA y el BDNF

Es sabido que los glucocorticoides tienen efectos sobre las funciones neuronales. Por un lado, a dosis bajas o agudamente elevadas, los glucocorticoides ejercen efectos tróficos y protectores sobre las neuronas (Gould y cols., 1990). Por ejemplo, en ratas se ha observado que para un funcionamiento cognitivo correcto son necesarios niveles moderados de glucocorticoides (Mizoguchi y cols., 2004). Así mismo, se ha observado que el tratamiento con glucocorticoides incrementa la generación de espinas dendríticas, pudiendo así, incrementar la plasticidad sináptica (Komatsuzaki y cols., 2005). También se ha propuesto que la mejora observada en la excitabilidad del sistema hipocampal-amigdalino por efecto de los glucocorticoides es muy importante para la consolidación de la memoria de eventos adversos y su posterior rememoración en situaciones similares (De Kloet y cols., 2005). Por otro lado, cuando por efecto de un estrés prolongado ocurre una desregulación del eje HPA, paralelamente se observa un daño sobre el sistema nervioso central (McEwen, 2005; Watanabe y cols., 1992), especialmente en el hipocampo (Gould y cols., 1992; Duman, 2004b; Duman y Monteggia, 2006; Magariños y

cols., 1996; McEwen, 1999; Sapolsky, 2001). Estos efectos de los glucocorticoides sobre el SNC podrían estar mediados en parte, por los cambios que producen estas mismas hormonas en los niveles de BDNF. Existen evidencias de que la administración de cantidades de corticosterona, similares a las producidas por el estrés, ocasiona una disminución de la expresión de BDNF en el hipocampo (Barbany y Persson, 1992; Jacobsen y Mørk, 2006; Schaaf y cols., 1998; Smith y cols., 1995a), mientras que la adrenalectomía incrementa la expresión de esta neurotrofina (Barbany y Persson, 1992; Chao y cols., 1998; Smith y cols., 1995a). Sin embargo, la corticosterona no es la única variable que influye en la reducción del BDNF, ya que la adrenalectomía no suprime del todo los efectos del estrés sobre el BDNF (Smith y cols., 1995a). Por otra parte, la reducción en la disponibilidad de BDNF podría representar un mecanismo mediante el cual los glucocorticoides o la exposición al estrés producen efectos deletéreos en diversas estructuras cerebrales (Duman y Monteggia, 2006; Thoenen, 1995). Sin embargo, la reducción de BDNF por sí misma no parece ser suficiente como para dañar o destruir las neuronas hipocampales, sino que haría que las neuronas fueran más vulnerables a los efectos del estrés o los glucocorticoides (Smith y cols., 1995a; Sofroniew y cols., 1993).

Los mecanismos que median en esta relación entre el BDNF y los glucocorticoides todavía no están claros. Hay autores que proponen que la activación de los receptores MR sería responsable de la reducción de la expresión del BDNF hipocampal observada en situaciones de estrés (Chao y cols., 1998; Jacobsen y Mørk, 2006). Sin embargo, es sabido que los MR pueden estar completamente ocupados en ausencia de estrés y que la señalización de los MR no está asociada a los efectos perjudiciales producidos por los glucocorticoides (De kloet y cols., 2005). Los resultados hallados en otro estudio mostraron que la activación de los receptores GR produjo a su vez una activación de los receptores TrkB, pero no provocó variaciones en los niveles de diferentes neurotrofinas, incluyendo el BDNF (Jeanneateau y cols., 2008). A la vista de estos resultados, no está clara la participación de los GR y MR en la reducción de BDNF producida por el estrés.

Por otra parte, se ha observado que el rápido incremento de la expresión de BDNF en respuesta a un estrés agudo precede a la activación de las neuronas que expresan arginina-vasopresina y CRH (Givalois y cols., 2004). También se ha observado que la administración central de BDNF modifica la actividad del eje HPA (Givalois y cols., 2004; Naert y cols., 2006). Estos datos indicarían que el BDNF regula la actividad de eje HPA, participando en procesos fisiológicos

adaptativos, necesarios para las neuronas, a la hora de hacer frente a los cambios homeostáticos producidos por el estrés.

4.2. Relaciones entre citocinas proinflamatorias y el BDNF

En condiciones normales, las citocinas IL-1, IL-6 y TNF α abastecen tróficamente las neuronas y aumentan la neurogénesis contribuyendo al correcto funcionamiento de importantes funciones cognitivas (Bernardino y cols., 2008; Goshen y cols., 2007). Por el contrario, cuando sucede una activación crónica o excesiva de citocinas en el SNC, debida al estrés, agudo o crónico, o a un desafío inmunológico, se observan una serie de cambios perjudiciales como la disminución del aporte neurotrófico, reducción de la neurogénesis, incremento de la activación glutamatérgica y del estrés oxidativo, inducción de apoptosis en células relevantes (oligodendrocitos y astrocitos) y desregulación de interacciones neuronales y de funciones tanto cognitivas como conductuales (Barrientos y cols., 2003; Ben Menachem-Zidon y cols., 2008; Buntinx y cols., 2004; Dantzer y cols., 2008b; Gavillet y cols., 2008; Goshen y cols., 2007; Ida y cols., 2008; Koo y Duman, 2008; Li y cols., 2008; McTigue y Tripathi, 2008; Pav y cols., 2008; Rajkowska y Miguel-Hidalgo, 2007; Tilleux y Hermans, 2007; Volterra y Meldolesi, 2005; Wu y cols., 2007). También se ha observado que el bloqueo de los receptores IL-1 en roedores y su eliminación en ratones transgénicos previene estos efectos nocivos producidos por el estrés (Barrientos y cols., 2003; Ben Menachem-Zidon y cols., 2008; Goshen y cols., 2008; Koo y Duman, 2008).

A pesar del interés creciente en el estudio de los efectos neurotróficos de las citocinas, existen pocos trabajos que hayan examinado la relación entre las citocinas y el BDNF en concreto. En un estudio la administración tanto de IL-1 β como de TNF- α redujo la expresión de BDNF en la amígdala, sugiriendo que los efectos ansiógenos producidos por las citocinas podrían ser debidas a las acciones de estas moléculas sobre el BDNF (Churchill y cols., 2006). En un estudio posterior se observó que la administración de IL-1 β redujo la función protectora de esta neurotrofina sobre la apoptosis neuronal interfiriendo en la unión entre el BDNF y su receptor TrkB (Tong y cols., 2007). Estos resultados sugieren que el estrés y las citocinas producen cambios similares en la expresión de BDNF. Sin embargo, Barrientos y colaboradores (2004) observaron que el miedo condicionado en ratas se asocia al incremento de la producción de BDNF en algunas áreas hipocámpales que podía ser bloqueado por la administración de IL-1 β . El aumento de BDNF

observado podría estar relacionado con el aprendizaje de la respuesta de miedo característico de este modelo de estrés, y que otro tipo de estresor bien sea impredecible, incontrolable o incluso crónico produjera diferentes resultados (Anisman, 2009). Por otro lado, también se ha sugerido que las acciones de las citocinas sobre el BDNF difieren en función de la estructura cerebral implicada (Rage y cols., 2006).

4.3. Relaciones entre serotonina y el BDNF

La contribución del BDNF en la supervivencia y diferenciación morfológica de las neuronas serotoninérgicas se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, por ejemplo, en los cultivos celulares de neuronas embrionarias derivadas del rafe que han sido tratadas con BDNF se observa que esta neurotrofina induce un aumento del número de células que expresan marcadores serotoninérgicos y estimula la complejidad morfológica de las mismas (Djalali y cols., 2005; Eaton y Whittemore, 1996; Rumajogee y cols., 2002; Zhou y cols., 2000). La infusión intraventricular de BDNF, *in vivo*, estimula el brote de axones serotoninérgicos lo que conduce a un aumento de la inervación en el lugar de la infusión (Mamounas y cols., 1995; Mamounas y cols., 2000). Además, se ha observado que la infusión de BDNF en el cerebro también aumenta la expresión de la enzima triptófano hidroxilasa (enzima limitante de la velocidad de la síntesis de serotonina), regula al alza la captación y liberación de serotonina dependiendo de la actividad neuronal, y por último, modifica los patrones de disparo de las neuronas serotoninérgicas del rafe (Celada y cols., 1996; Goggi y cols., 2002; Siuciak y cols., 1996; Siuciak y cols., 1998; Zhou y cols., 2000). En ratones transgénicos que tienen reducidos los niveles de BDNF se ha observado que los niveles serotoninérgicos, la tasa de aclaramiento de serotonina y las funciones de algunos receptores serotoninérgicos están significativamente alterados en diversas regiones cerebrales, (Daws y cols., 2007; Hensler y cols., 2007; Lyons y cols., 1999; Ríos y cols., 2006; Szapacs y cols., 2004) así como algunos aspectos conductuales relacionados con el estrés (Ren-Patterson y cols., 2005). El papel del BDNF en la función serotoninérgica está respaldado por la observación de que tanto el BDNF como su receptor específico TrkB son co-expresados en neuronas serotoninérgicas situadas en los núcleos dorsal y medial del rafe (Madhav y cols., 2001; Merlio y cols., 1992), y el BDNF es transportado de forma retrograda desde neuronas serotoninérgicas del estriado e hipocampo hacia los cuerpos celulares de los núcleos del rafe (Anderson y cols., 1995).

Por otro lado, también existen datos que indican que la transmisión serotoninérgica puede controlar la expresión de BDNF. Los datos parecen indicar que el incremento de serotonina extracelular puede provocar un aumento de los niveles de BDNF a través de los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ que al unirse a enzimas de membrana aumentan la actividad de la proteína CREB (elemento modulador de la respuesta a AMPc) regulando positivamente la transcripción del BDNF.

Dado que el sistema serotoninérgico también resulta afectado por el estrés se piensa que la reducción de la expresión de esta neurotrofina por efecto del estrés está parcialmente influenciada por alteraciones ocurridas en el sistema serotoninérgico. Así, se observó que la regulación a la baja de BDNF inducida por el estrés pudo ser prevenida, en parte, con un pretratamiento con agonistas de los receptores 5-HT_{2A} (Vaidya y cols., 1997; Vaidya y cols., 1999). Además, los tratamientos con inhibidores de la recaptación de la serotonina que incrementan los niveles de serotonina también pueden revertir los efectos que tiene el estrés sobre la expresión de BDNF (Aydemir y cols., 2005; Gervasoni y cols., 2005; Gonul y cols., 2005). Sin embargo, no todos los trabajos apoyan esta idea, ya que ratones transgénicos que carecen del SERT, muestran niveles elevados de serotonina extracelular, pero no muestran un aumento de BDNF (Szapacs y cols., 2004).

En conjunto, los datos parecen indicar la existencia de una relación bidireccional entre el BDNF y la función serotoninérgica, establecida a través de un circuito de retroalimentación. Así, se ha observado que la serotonina administrada de manera exógena regula al alza el ARNm del BDNF, a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A}, y seguidamente, el BDNF se une a su receptor específico TrkB localizados en neuronas serotoninérgicas promoviendo el desarrollo fenotípico de estas neuronas (Galter y Unsicker, 2000a; Galter y Unsicker, 2000b).

ESTRÉS SOCIAL, DEPRESIÓN Y
DIFERENCIAS INDIVIDUALES

5.1. Estrés social y depresión

Sabemos que cuando la respuesta de estrés permanece activada de manera crónica, esto supone una carga alostática, o un desgaste para el organismo, que en ocasiones resulta traumática y perjudicial para la salud de los individuos, tanto a nivel físico como emocional (Korte y cols., 2005; McEwen, 2000; McEwen, 2003; McEwen y Wingfield, 2003). Sin embargo, no solo la duración del estresor sino que el tipo de evento estresante también influye en el desarrollo de la carga alostatica y se considera que los individuos son más susceptibles a padecer dicha carga cuando el estresor además de crónico es también impredecible y de naturaleza social (Björkqvist, 2001; Blanchard y cols., 2002; De Kloet y cols., 1998; Koolhaas y cols., 1997a). Se ha observado que además de las situaciones traumáticas, como los desastres naturales o las guerras, o las vivencias estresantes como el divorcio o la muerte de un familiar cercano, las situaciones de la vida cotidiana pueden generar altos niveles de estrés. En este sentido, varios estudios han demostrado que la incapacidad del organismo humano para controlar los estresores sociales y psicológicos puede llevar al desarrollo de alteraciones físicas y psicológicas (Blanchard y cols., 2001; Korte y cols., 2005; McEwen, 2008) e incluso, precipitar la aparición de trastornos mentales e influir en la incidencia, en la severidad y en el curso de la enfermedad (Cherry y cols., 2006; Frank y cols., 1990; Holmes y Rahe, 1967; Kar y Bastia, 2006; Kessler y cols., 1994; Lazarus y Cohen, 1977; Matheson y cols., 2006; Pflanz y Ogle, 2006; Sandin y cols., 2004).

La utilización de modelos de estrés psicosocial en animales dentro del campo de investigación de la neurociencia conductual ha permitido estudiar la relación entre el estrés social y la emergencia de patologías asociadas (Henry y cols., 1993; Koolhaas y cols., 1999; Wiepkema y Schouten, 1992). Muchas especies animales se enfrentan con frecuencia a diferentes niveles de estrés en conflicto social con sus congéneres. El abordaje del estudio de las consecuencias de estas interacciones ha llevado al desarrollo de modelos animales basados en la derrota social (Koolhaas y cols., 1990; Meerlo y cols., 1996; Meerlo y cols., 1997; Ruis y cols., 1999; Scholtens y Van de Poll, 1987) que permiten observar un conjunto de síntomas físicos y conductuales que emulan la sintomatología de la depresión, y otros trastornos relacionados, en humanos (Agustinovich y cols., 2005; Martínez y cols., 1998). Los resultados derivados de los estudios que han utilizado diferentes paradigmas de derrota social, incluyendo el paradigma de residente/intruso o el modelo de contacto sensorial, en animales territoriales, tales como los roedores, han demostrado claramente que estos modelos engloban una metodología y una

validez etológica adecuada que permiten examinar cómo el estrés social crónico afecta al organismo tanto a nivel fisiológico como conductual, así como el estudio de psicopatologías asociadas (Bartolomucci y cols., 2005; Koolhaas y cols., 1990; Koolhaas y cols., 1997b; Kudryavtseva y cols., 1991).

La respuesta de estrés y la depresión mayor comparten muchas características en común debido a que los circuitos cerebrales y mediadores que participan en ambas situaciones son similares (Gold y cols., 1988a; Gold y cols., 1988b; Gold y Chrousos, 1999). En este sentido, el estudio de biomarcadores que reflejan los procesos fisiológicos subyacentes ha sido de gran ayuda para la propuesta de diferentes teorías que implican la activación de diferentes vías por las cuales el estrés puede inducir depresión.

Una de las primeras teorías propuesta en la patogénesis de la depresión en relación al estrés fue la que se basaba en la disfunción del eje HPA (Dinan, 1994) y ciertamente es uno de los resultados más consistentes hallado, tanto en el estudio del estrés crónico por derrota como en la depresión mayor. La mayoría de los pacientes que sufren de depresión mayor muestran concentraciones elevadas de cortisol en plasma, en orina y líquido cefalorraquídeo, y agrandamiento de las glándulas adrenales y pituitarias (Gold y cols., 1988c; Holsboer y Barden, 1996; Nemeroff, 1996; Owens y Nemeroff, 1993). En estos pacientes también es habitual encontrar un aumento de CRH en el líquido cefalorraquídeo, así como de la expresión génica de CRH en el NPV postmortem, y una respuesta reducida de la ACTH a la administración exógena de CRH (Arato y cols., 1989; Arborelius y cols., 1999; Banki y cols., 1992; Gold y cols., 1988c; Heuser y cols., 1998; Nemeroff y cols., 1984; Nemeroff, 1996; Wong y cols., 2000). Se considera que el aumento de CRH es el responsable de los síntomas conductuales típicos hallados en los pacientes depresivos entre los que se incluyen un aumento de la ansiedad, pérdida de la capacidad de respuesta a los estímulos ambientales, alteraciones del sueño y psicomotoras, pérdida del apetito y la libido, y deterioro cognitivo (Gold y Chrousos, 1985; Gold y Chrousos, 2002; Holsboer, 1999). De manera similar, los animales expuestos a situaciones de estrés crónico por derrota también reflejan una disfunción del eje HPA mostrando niveles elevados de ACTH (Heinrichs y cols., 1992; Huhman y cols., 1991; Pich y cols., 1993; Saltzman y cols., 2004; Skutella y cols., 1994) y glucocorticoides (Blanchard y cols., 1995; Cacho y cols., 2003; Dijkstra y cols., 1992; Fano y cols., 2001; Huhman y cols., 1990; Huhman y cols., 1991; Pich y cols., 1993; Raab y cols., 1986; Sachser y Lick, 1991; Stark y cols., 2001), además de un agrandamiento de las glándulas adrenales

(Blanchard y cols., 1995; Brain, 1972; Hukelbridge y cols., 1981; Krugers y cols., 1996; Rygula y cols., 2005).

Tanto en animales estresados como en pacientes deprimidos, se observa una desregulación del feedback negativo del eje HPA, evidenciado por una falta de respuesta en el test de supresión de la dexametasona (Buwalda y cols., 1999; Heuser y cols., 1994; Holsboer y Barden, 1996; Nemeroff, 1996; Owens y Nemeroff, 1993) y se piensa que este fenómeno está mediado por la disminución de la función de los GR y los MR en el cerebro (De Kloet y cols., 1998; Holsboer, 2000; Reul y cols., 2000). En humanos, los estudios postmortem muestran que las víctimas de suicidio tienen niveles reducidos de MR en el hipocampo (López y cols., 1998). En animales derrotados también se observa una disminución de la ratio MR/GR hipocampal (Buwalda y cols., 2001a; Veenema y cols., 2003a; Veenema y cols., 2003b). En este sentido, se ha sugerido que un desequilibrio en el ratio MR/GR puede incrementar la vulnerabilidad a desarrollar trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés en individuos susceptibles (De Kloet y cols., 2007).

Los tratamientos antidepresivos se asocian con una normalización de la actividad del eje HPA en pacientes deprimidos (Deuschle y cols., 1997; Heuser y cols., 1996; Linkowski y cols., 1987; Wodarz y cols., 1992) probablemente debido a que estos tratamientos aumentan la funcionalidad de los GR y los MR, tal y como se ha observado en estudios animales (Brady y cols., 1992; Peeters y cols., 1994; Pepin y cols., 1992a; Przegalinski y Budziszewska, 1993; Reul y cols., 1993; Rossby y cols., 1995; Seckl y Fink, 1992). Concretamente, se ha observado que el tratamiento crónico con antidepresivos atenúa las alteraciones endocrinas, como los niveles elevados de corticosterona y ACTH, y conductuales como el deterioro cognitivo, en ratones transgénicos con una reducción de la expresión de GR (Montkowski y cols., 1995; Pepin y cols., 1992b). Otros estudios también han mostrado que los antidepresivos regulan al alza los receptores MR (Reul y cols., 1993; Reul y cols., 1994; Seckl y Fink, 1992; Yau y cols., 1995) y que la disminución de la expresión de los MR debida al estrés crónico, en ratas, puede ser evitada utilizando antidepresivos (López y cols., 1998).

Otro posible mecanismo a través del cual el estrés puede inducir depresión implica a los diferentes sistemas de neurotransmisión monoaminérgica (Charney, 1998; Hirschfeld, 2000). En este sentido, una de las primeras hipótesis fue que la deficiencia de actividad serotoninérgica a nivel central incrementa la vulnerabilidad a padecer depresión mayor (Asberg y cols., 1986). El sistema serotoninérgico facilita la adaptación al estrés y por lo general los estresores producen

una activación de este sistema (Avgustinovich y cols., 1999; Berton y cols., 1998; Blanchard y cols., 1991; Deutch y Roth, 1990; Devoino y cols., 2003; Watanabe y cols., 1995). Sin embargo, tal y como sugiere la hipótesis monoaminérgica de la depresión, la exposición repetida a un estrés puede finalmente dar lugar a una disminución de la actividad serotoninérgica (Van Praag, 2004). Aunque son varios los receptores serotoninérgicos que participan en las alteraciones descritas en los trastornos relacionados con el estrés, se ha demostrado que el receptor 5-HT_{1A} está especialmente involucrado en los trastornos depresivos (Lanfume y Hamon, 2004). Los estudios farmacológicos apoyan esta idea indicando, por un lado, que los fármacos ISRS e IMAO desensibilizan los autorreceptores 5-HT_{1A} del rafe de tal modo que aumentan la transmisión serotoninérgica a nivel postsináptico (Blier y cols., 1987; Chaput y cols., 1991; Giovacchini y cols., 2005; Invernizzi y cols., 1994; Kreiss y Lucki, 1995; Lerer y cols., 1999; Pineyro y Blier, 1999; Rausch y cols., 2006; Riad y cols., 2004; Stahl, 1994). Por otro lado, también se ha observado que los agonistas selectivos de los receptores 5-HT_{1A}, tales como la buspirona y la gepirona, resultan efectivos en el tratamiento de la ansiedad y la depresión en humanos (Den Boer y cols., 2000; Fabre, 1990; Rickels y Schweizer, 1990; Robinson y cols., 1990).

La mayoría de los trabajos coinciden en que los receptores 5-HT_{1A} presinápticos están elevados al alza en la depresión, sin embargo, los datos existentes sobre la regulación de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos son contradictorios. Muchos estudios postmortem han encontrado una reducción del número, de la expresión y del ligamiento de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos en varias regiones cerebrales en personas deprimidas víctimas de suicidio (Anisman y cols., 2008a; Arango y cols., 2001; Boldrini y cols., 2008; Bowen y cols., 1989; López y cols., 1998; López-Figueroa y cols., 2004; Szewczyk y cols., 2008). Sin embargo, hay trabajos en los que no se han observado cambios en la regulación de estos receptores (Arranz y cols., 1994; Matsubara y cols., 1991; Lowther y cols., 1997) y también en los que se ha observado una regulación al alza de estos receptores en este mismo tipo de pacientes (Arango y cols., 1995; Sharp y cols., 2007). Los datos derivados de los modelos animales de depresión también son dispares. Algunos estudios muestran una reducción del ligamiento de los receptores 5-HT_{1A} hipocámpales tanto en tupayas como en ratas expuestas a estrés social crónico (Flugge, 1995; McKittrick y cols., 1995), así como en ratas derrotadas (Buwalda y cols., 2001b; Korte y cols., 1995), aunque no siempre se han observado cambios en estos receptores tras la derrota en el modelo de contacto sensorial (Veenema y cols., 2003b). Otra serie de estudios indican un incremento de los receptores 5-HT_{1A} hipocámpales en modelos de depresión en monos (Shively y

cols., 2007) y ratones (Naudon y cols., 2002) y un aumento de la sensibilidad de los receptores 5-HT_{1A} hipocámpales en modelos de depresión en ratas (Overstreet y cols., 1994). Además, los ratones “knockout” 5-HT_{1A}, modificados genéticamente que no sintetizan el receptor 5-HT_{1A}, muestran un incremento de conductas relacionadas con la ansiedad y la depresión (Heisler y cols., 1998; Parks y cols., 1998).

Recientemente, los estudios realizados en humanos con diagnóstico de depresión han mostrado un aumento del ligamiento de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos (Miller y cols., 2009a; Parsey y cols., 2006; Parsey y cols., 2010). Estos datos, estarían de acuerdo con la hipótesis monoaminérgica de la depresión ya que es sabido que la eliminación o el déficit de serotonina durante un periodo prolongado puede inducir un aumento de la regulación al alza de estos receptores (Miquel y cols., 1992; Parsey y cols., 2010; Pranzatelli y cols., 1994; Sijbesma y cols., 1991). Finalmente, muchos estudios farmacológicos indican que los tratamientos antidepresivos regulan a la baja los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos que previamente estaban aumentados tanto en pacientes deprimidos como en modelos animales de depresión (Gunther y cols., 2008; Naudon y cols., 2002; Parsey y cols., 2006).

En comparación con los receptores 5-HT_{1A} y otros receptores serotoninérgicos, el conocimiento de la implicación de los receptores 5-HT₄ en la depresión es limitado. Un estudio reciente ha indicado que existe un aumento del ligamiento de estos receptores en la corteza prefrontal y núcleo caudado en pacientes deprimidos víctimas de suicidio, mientras que en otras zonas como el hipocampo o la amígdala no observaron cambios (Rosel y cols., 2004). En estudios farmacológicos realizados en modelos animales se ha observado que la activación de los receptores 5-HT₄ estimula la actividad serotoninérgica, sugiriendo la implicación de estos receptores en la depresión y en los tratamientos antidepresivos (Lucas y cols., 2007)

Además del eje HPA y el sistema serotoninérgico, otro de los sistemas que en la actualidad ha cobrado un gran interés en el estudio de la etiología de la depresión es el sistema inmunitario, ya que los datos apuntan a que existe un empeoramiento general de la función inmunitaria en este trastorno (Biondi y Picardi, 1996; Constantino y cols., 2000; Herbert y Cohen, 1993b; Irwin y cols., 1990b; Kronfol y House, 1984; Krueger y cols., 1984; Maes y cols., 1992; Miller y cols., 1999; Stein y cols., 1985; Zisook y cols., 1994). Se ha propuesto que los estresores de tipo psicosocial, entre otros, pueden activar vías y procesos inflamatorios que provocan alteraciones neuroendocrinas y neuroquímicas típicas de la depresión (Maes, 2009). Así, la activación inflamatoria observada en la depresión se relaciona con la hiperactividad del eje HPA

(Maes y cols., 1993a; Maes y cols., 1993b), mientras que la activación inmunitaria mediada por las células T se relaciona con alteraciones serotoninérgicas (Maes y cols., 1993c; Maes y cols., 1994). En este sentido, también se ha sugerido que la activación prolongada del sistema inmunitario, además de exacerbar la conducta de enfermedad, también da lugar al desarrollo de síntomas depresivos en individuos vulnerables (Dantzer y cols., 2008b). Recientemente se han publicado una serie de trabajos de meta-análisis que muestran que las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α se asocian con la depresión (Dowlati y cols., 2010; Howren y cols., 2009) siendo los niveles elevados de IL-6 el dato más consistente en todos los trabajos (Mössner y cols., 2007; Zorrilla y cols., 2001). Además, se ha demostrado que la administración terapéutica de citocinas como el IFN- α para el tratamiento de la Hepatitis-C provoca síntomas depresivos que pueden ser revertidos con antidepresivos (Bull y cols., 2009; Capuron y Miller, 2004; Lotrich y cols., 2007; Maddock y cols., 2005; Raison y cols., 2005).

Los estudios en animales también han mostrado evidencias de que los estresores aumentan los niveles de citocinas tanto en plasma como en el cerebro (Blandino y cols., 2006; Blandino y cols., 2009; Deak y cols., 2005; Maes, 1995), y que la administración de citocinas proinflamatorias provoca conductas similares a las depresivas de la misma forma que lo hace el estrés, y que desaparecen cuando cesa la administración de las citocinas (Anisman y cols., 2008b; Dantzer y cols., 2008b). También hay datos que muestran que la aplicación de un estrés psicosocial en ratones da lugar a concentraciones elevadas de IL-6 en plasma (Cryan y Mombereau, 2004). Por otra parte, estudios con ratones transgénicos deficientes en IL-6 han mostrado que esta interleucina está implicada en las conductas ansiogénicas que manifiestan estos animales (Armario y cols., 1998; Butterweck y cols., 2003).

En los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de los efectos del estrés sobre la neuroplasticidad y la implicación de factores neurotróficos, tales como el BDNF, dando lugar a la hipótesis neurotrófica de la depresión. Según este planteamiento, la depresión se caracteriza por una reducción de la plasticidad neuronal y del soporte neurotrófico producida por la exposición al estrés. Los estudios en humanos muestran que los paciente deprimidos tienen niveles reducidos de BDNF en suero (Karege y cols., 2002b; Shimizu y cols., 2003) y otros estudios indican que los tratamientos antidepresivos y las terapias electroconvulsivas pueden revertir estos efectos (Aydemir y cols., 2005; Bocchio-Chiavetto y cols., 2006; Gervasoni y cols., 2005; Gonul y cols., 2005; Sen y cols., 2008). Por otro lado, existen estudios que sugieren que las grandes cantidades de glucocorticoides liberadas por el estrés contribuyen a la atrofia y a la

reducción hipocampal observada en pacientes deprimidos (Duman, 2004a; Duman, 2004b; McEwen, 2005; Sapolsky, 2000; Sheline y cols., 2003), por lo que esta estructura cerebral ha sido muy estudiada a este respecto. Así, los análisis postmortem realizados en pacientes deprimidos víctimas de suicidio muestran una expresión reducida de BDNF en el hipocampo, en comparación con aquellos pacientes que estaban siguiendo un tratamiento antidepresivo en el momento de la defunción (Chen y cols., 2001; Dwivedi y cols., 2003; Karege y cols., 2005b).

Los estudios que han utilizado modelos animales de depresión, incluyendo la derrota social crónica, indican que el estrés es una de las variables que más efectos negativos tiene sobre la regulación de la neurogénesis y también sobre el BDNF (Barrientos y cols., 2003; Pizarro y cols., 2004). Además, en ocasiones, la regulación a la baja de ésta neurotrofina correlaciona con alteraciones conductuales de tipo depresivo observadas en varios test (Malberg y Duman, 2003). En este tipo de estudios, la administración crónica de varias clases de antidepresivos, a diferencia de la administración aguda, aumenta la expresión del BDNF en diferentes zonas hipocampales (Calabrese y cols., 2007; Castren y cols., 2007; Coppell y cols., 2003; Dias y cols., 2003; Holoubek y cols., 2004; Nibuya y cols., 1995; Nibuya y cols., 1996; Russo-Neustadt y cols., 2004; Russo-Neustadt y Chen, 2005; Vinet y cols., 2004; Xu y cols., 2004), además de revertir dichas alteraciones conductuales (Tsankova y cols., 2006). A la vista de estos resultados se ha sugerido que la causa del retardo de las acciones terapéuticas de los fármacos antidepresivos podría ser debida a que el organismo requiere de un periodo de tiempo para poner en marcha mecanismos neuroadaptativos que aumenten la plasticidad neuronal (Castren, 2005; Kozisek y cols., 2008; Pittenger y Duman, 2008). De hecho, varios estudios han mostrado que el BDNF puede mediar en las acciones terapéuticas de los antidepresivos ya que son necesarios unos niveles determinados de esta neurotrofina para que estos fármacos sean efectivos (Berton y Nestler, 2006; Groves, 2007; Martinowich y cols., 2007). Además, también se ha observado que la administración de BDNF produce cambios similares a los de los antidepresivos, y que la administración conjunta aumenta estos efectos (Deltheil y cols., 2009)

5.2. Diferencias individuales y vulnerabilidad a la depresión

A pesar de la evidente relación que existe entre el estrés y la emergencia de trastornos mentales, la exposición a un estrés social crónico no predice automáticamente el desarrollo o el padecimiento de psicopatologías, es decir, no todos los individuos expuestos son susceptibles de enfermar. A este respecto, la mayoría de los investigadores coinciden en que los eventos estresantes vitales pueden provocar o precipitar la aparición de trastornos, particularmente en presencia de factores genéticos de vulnerabilidad (Caspi y cols., 2003) y de diversos factores psicológicos que pueden moderar o exacerbar los efectos de los estresores (Anisman y Matheson, 2005). Así, en la actualidad se reconoce que el afrontamiento del estrés es un factor de suma importancia para la calidad de vida en numerosas especies (Cavigelli y McClintock, 2003; Janczak y cols., 2003, Korte y cols., 2005) incluyendo a los humanos (Susman y cols., 1999). Sin embargo, hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en entender los mecanismos mediante los cuales los eventos estresantes vitales pueden provocar o precipitar la aparición de trastornos como la depresión, la ansiedad o el estrés postraumático, sin tener en consideración las diferencias individuales en el afrontamiento del estrés (Yehuda y cols., 2006). No obstante, en la actualidad, el estudio y entendimiento de las diferencias individuales en la capacidad de afrontamiento ha adquirido un interés primordial dentro del campo de investigación del estrés y la psiquiatría biológica (Bartolomucci y cols., 2005; Korte y cols., 2005), así como, el conocimiento de las bases y mecanismos biológicos que median en la dicotomía de resistencia-vulnerabilidad a los efectos deletéreos del estrés. El estudio de los cambios de las variaciones biológicas en individuos susceptibles también puede ser abordado mediante la utilización de los modelos animales que además de emular la sintomatología de la depresión a la vez permiten observar las diferencias individuales en respuesta al estrés (Rutter, 2006).

Los estudios en los que se utiliza el modelo de derrota social han evidenciado que los individuos pueden diferir considerablemente en la forma en que responden al estrés, mostrando una alta variabilidad conductual (Koolhaas y cols., 1999). A partir de los trabajos realizados por Henry y Stephens (1977) numerosas investigaciones han demostrado que al menos existen dos alternativas conductuales, que pueden ser denominadas activa y pasiva, para afrontar los estímulos ambientales, que han sido observadas en varias especies incluyendo ratones, ratas, aves, peces, cerdos, monos y humanos (Benus y cols., 1991; Crusio y cols., 1991; Hinton y cols., 1991; Koolhaas y cols., 1999; Marchetti y Drent, 2000; Øverli y cols., 2007; Ursin y cols. 1993;

Verbeek y cols., 1994). La primera de ellas, la respuesta activa, fue descrita originalmente por Cannon (1915) como una respuesta de “lucha-huida” que conductualmente se caracteriza por mostrar altos niveles de agresión y del control territorial. El segundo tipo de respuesta, la pasiva, fue originalmente descrita por Engel y Schmale (1972) con el nombre de conservación-retirada, caracterizada por una excesiva inmovilidad conductual y bajos niveles de agresión. Basándose en estas ideas, Benus y colaboradores (1991) propusieron que los niveles de agresión de cada uno de los individuos estaban relacionados con la manera en la que cada uno de ellos reaccionaba a los desafíos ambientales en general. Así, Koolhaas y colaboradores (1999) promovieron la utilización del término estrategia o estilo de afrontamiento, “coping style” en inglés, definiéndolo de la siguiente manera: “un conjunto coherente de respuestas conductuales y fisiológicas al estrés, el cual es consistente a través del tiempo y en diferentes situaciones, y característico de un determinado grupo de individuos”. Tal y como se observa en la definición, estas estrategias conductuales van acompañadas de diferentes respuestas fisiológicas. Así, el afrontamiento activo se asocia a una mayor actividad del sistema simpático y una menor actividad del eje HPA, mientras que el afrontamiento pasivo se caracteriza por una activación del sistema parasimpático y una mayor reactividad del eje HPA (Bohus y cols., 1987; Bohus y Koolhaas, 1993; Koolhaas, 1994; Korte y cols., 1997; Korte y cols., 1999; Sgoifo y cols., 1996). Actualmente se piensa que estas diferencias neuroendocrinas son una consecuencia de la estrategia de afrontamiento más que una causa. Así, puede ser que la principal diferencia entre estas dos estrategias lo marque el grado de plasticidad o flexibilidad conductual del individuo (Koolhaas y cols., 2001) con su consiguiente implicación en la susceptibilidad individual a las enfermedades relacionadas con el estrés.

El uso del concepto de estrategia de afrontamiento ha creado cierto debate (Jensen y cols., 1995) debido a que originalmente se sugería que su empleo se restringiera a aquellas situaciones en las que los individuos podían elegir libremente la manera de dominar la situación y exhibir su tendencia a mostrar siempre la misma alternativa conductual por variada que fuera la situación. Sin embargo, hay autores que piensan que los individuos pueden variar en el empleo de las estrategias de afrontamiento dependiendo de la situación y la valoración que se realice de ésta (Carver y cols., 1989; Folkman y Lazarus, 1985; Tennen y cols., 2000). Así, por ejemplo, en el caso del test de ansiedad denominado “defensive burying test”, se ha observado que los estilos de afrontamiento no son una característica tan rígida, ya que los individuos al no poder emplear el tipo de afrontamiento preferido optan por manifestar conductas alternativas (Koolhaas y cols.,

2010). En este sentido, hay autores que sugieren que los individuos pueden intentar el uso de diferentes estrategias de afrontamiento de manera secuencial o consecutiva con el fin de testar la más adecuada (Matheson y Anisman, 2003). Se ha sugerido que aquellos individuos que tengan una gama relativamente amplia de estrategias de afrontamiento y sean flexibles y tengan la capacidad de cambiar de una a otra, tendrán la ventaja de adoptar el estilo de afrontamiento más adecuado ante cualquier estresor. Por el contrario, aquellos individuos que carezcan de cierto repertorio estratégico o adopten de manera persistente estrategias inefectivas tendrán un éxito más reducido a la hora de enfrentarse a la situación estresante, siendo más vulnerables a los efectos negativos del estrés (Anisman y Matheson, 2005). De acuerdo con esto, en una situación de estrés crónico es de esperar que las estrategias de afrontamiento a utilizar puedan variar en el tiempo, a medida que la situación se prolongue. A pesar de la controversia, parece existir un consenso en cuanto a que la reactividad individual al estrés es el principal factor que determina la vulnerabilidad a desarrollar enfermedades relacionadas con el estrés (Cohen y Hamrick, 2003; Kavelaars y Heijnen, 2006; Marsland y cols., 2002).

En general, los datos sugieren que una elevada sensibilidad al estrés puede ser un factor de vulnerabilidad a la hora de desarrollar características depresivas. Sin embargo, todavía existen pocos trabajos que han examinado la relación entre las diferentes estrategias de afrontamiento al estrés y otros sistemas implicados en la respuesta de estrés además del eje HPA, como por el ejemplo el sistema inmunitario, el serotoninérgico y neurotrofinas como el BDNF. Tal y como se ha apuntado previamente, existen muchos datos en relación a la disfunción a nivel del eje HPA tanto en pacientes depresivos como en modelos animales de estrés y depresión. Sin embargo, los individuos pueden diferir entre sí en la reactividad al estrés y no siempre se encuentra que el estrés aumente los niveles de ACTH (De Goeij y cols., 1992) o que los niveles de glucocorticoides estén elevados de manera crónica (Veenema y cols., 2005) o que se reduzca la expresión de los GR y MR (López y cols., 1998). En general, aquellos sujetos que reaccionan al estrés con un tipo de estrategia más pasiva o reactiva son los que muestran una mayor y más prolongada respuesta de glucocorticoides, de manera similar a los pacientes deprimidos. Así, por ejemplo, en el caso del estrés social se ha observado que los animales que responden con altos niveles de agresión liberan menores cantidades de glucocorticoides en comparación con aquellos que responden de una manera menos agresiva (Azpiroz y cols., 2008; Korte y cols., 1996; Veenema y cols., 2003a; Veenema y cols., 2003b). Un reciente estudio realizado por Walker y colaboradores (2009) ha mostrado que los animales derrotados también difieren entre sí en la reactividad del eje HPA en

función del estilo conductual adoptado durante el conflicto social. En este trabajo, los ratones derrotados que exhibían altos niveles de conductas de protección para evitar la aproximación del oponente durante el conflicto (sujetos activos) manifestaron una menor respuesta adrenocortical en comparación con los sujetos derrotados que apenas exhibían estas conductas de protección (sujetos pasivos).

En relación a las diferencias individuales y la actividad serotoninérgica, la mayoría de los estudios, realizados en diferentes especies, se han centrado en investigar la participación de este sistema en el control de la agresión y las conductas impulsivas dentro de los conflictos sociales (Higley y cols., 1992; Ison y cols., 1996; Kravitz y cols., 2003; Lesch y Merschdorf, 2000; Miczek y cols., 2002; Øverli y cols., 1999; Summers y cols., 2005). Hay trabajos que señalan que los sujetos dominantes y subordinados, o los sujetos que muestran altos niveles de agresión frente a los que muestran bajos niveles, difieren entre sí en el control del feedback negativo ejercido por los autoreceptores 5-HT_{1A} Y 5-HT_{1B} sobre las propias neuronas serotoninérgicas (De Boer y Koolhaas, 2005). A la hora de estudiar estos aspectos en relación a enfermedades como la depresión, hay trabajos que han utilizado ratones que han sido seleccionados en función de su alta (LAL) o baja (SAL) latencia de ataque ante un oponente no agresivo. Los resultados indican que los sujetos pasivos (LAL) en comparación con los sujetos activos (SAL) muestran menores niveles de transcripción y ligamiento de receptores 5-HT_{1A} hipocampales (Korte y cols., 1996). Estudios más recientes han observado que el estrés por contacto sensorial durante 5 días induce una regulación a la baja de la transcripción de los receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo en los sujetos LAL o pasivos. Sin embargo, este efecto parece ser transitorio ya que un estrés de 25 días no produce tales cambios (Veenema y cols., 2003b). Por último, se puede añadir, que los ratones LAL muestran una mayor reactividad del eje HPA que los SAL, ya que muestran mayores niveles de corticosterona en plasma (Korte y cols., 1996; Veenema y cols., 2005).

Por otro lado, en relación a las diferencias individuales, actividad serotoninérgica y vulnerabilidad existen trabajos realizados con ratas genéticamente seleccionadas que son consideradas un buen modelo animal de depresión (Overstreet y cols., 2005). Estas ratas denominadas "Flinders Sensitive Line" (FSL) en comparación con las "Flinders Resistant Line" (FRL), tienen la característica de mostrar conductas de tipo depresivo, como por ejemplo altos niveles de inmovilidad en la prueba de natación forzada, así como varios síntomas relacionados con la depresión clínica, tales como la falta de apetito, la pérdida de peso y una reducida actividad psicomotora (Overstreet y cols., 2005), y también son más susceptibles a desarrollar

anhedonia por efecto del estrés (Pucilowski y cols., 1993). Además, se ha observado que la conducta de inmovilidad en la prueba de natación forzada correlaciona con el incremento de sensibilidad de los receptores 5-HT_{1A}, sugiriendo que el fenotipo depresivo de estas ratas está asociado a cambios en el sistema serotoninérgico (Overstreet y cols., 1994).

Actualmente el afrontamiento del estrés y la personalidad se consideran factores importantes a la hora de explicar la diferente vulnerabilidad a desarrollar alteraciones inmunológicas en humanos (Buske-Kirschbaum y cols., 2001; Kiecolt-Glaser y cols., 2002; Segerstrom, 2003). Así, vista la diferente reactividad de los diferentes sistemas implicados en la respuesta de estrés, es de esperar que también existan diferencias individuales en la activación o supresión del sistema inmunitario. Sin embargo, todavía existen pocos trabajos que apoyen la idea de que las estrategias de afrontamiento del estrés sean un factor importante a la hora de explicar la diferente reactividad inmunitaria (Koolhaas, 2008). Los resultados derivados de trabajos realizados en ratas muestran que una estrategia pasiva, a diferencia de la activa, se relaciona con una menor actividad de las células NK y una menor proliferación de los esplenocitos en respuesta a mitógenos (Sandi y cols., 1991). Otros trabajos realizados en cerdos muestran que aquellos que tienen una estrategia pasiva tienen una menor inmunidad celular y una mayor inmunidad humoral, y que estos parámetros estaban en concordancia con una mayor reactividad neuroendocrina y conductual (Bolhuis y cols., 2003; Hessing y cols., 1995; Schrama y cols., 1997). Recientemente, también se ha observado que existen diferentes perfiles de citocinas que se asocian a diferencias individuales en la reactividad del eje HPA (Kunz-Ebrecht y cols., 2003). Sin embargo, todavía son necesarios más trabajos para reafirmar la idea de que las diferentes estrategias de afrontamiento están relacionadas con diferentes patrones de actividad inmunitaria y consecuentemente con una diferente vulnerabilidad a enfermar (Koolhaas y cols., 2008).

Aunque hay autores que piensan que las alteraciones en los factores neurotróficos, a casusa del estrés, podrían ser las responsables de la vulnerabilidad individual a desarrollar trastornos de tipo psiquiátrico (Alleva y cols., 2009), casi no existen trabajos que hayan abordado este aspecto. Existe un trabajo relevante realizado por Knapman y colaboradores (2010) que han utilizado dos grupos de ratones consanguíneos, criados y seleccionados en función de su alta o baja reactividad al estrés. Por un lado, los ratones con alta reactividad al estrés (HR) han sido caracterizados por una hiperreactividad del eje HPA, un ritmo circadiano plano, un incremento del sueño REM y pérdida de peso corporal, por lo que se han propuesto como modelo de

depresión melancólica. Por otro lado, los ratones con baja reactividad al estrés (LR) se caracterizan por una hiporreactividad del eje HPA, un incremento de las conductas agresivas y un aumento del peso corporal, de manera que estos animales representan un modelo de depresión atípica (Touma y cols., 2008; Touma y cols., 2009). En este estudio, por una parte, los autores han encontrado que los ratones HR muestran una disminución del BDNF hipocampal en comparación con los LR, asociado a una serie de déficits cognitivos, debida a la exposición crónica de glucocorticoides en el hipocampo. Por otra parte, los ratones LR muestran un incremento del BDNF hipocampal, asociado a una mayor capacidad de memoria en varios test. De acuerdo con lo que proponen estos autores, el estudio de la relación entre las respuestas de estrés alteradas, las capacidades cognitivas, las estrategias de afrontamiento y los niveles hipocampales de BDNF puede ser una nueva línea de investigación a seguir en el estudio y conocimiento de los mecanismos implicados en la depresión, así como contribuir al avance de su tratamiento.

RS 67333: AGONISTA PARCIAL
DE LOS RECEPTORES 5-HT₄

Una vez que los receptores 5-HT₄ fueron identificados, en la década de 1990, comenzaron a sintetizarse una serie de compuestos agonistas y antagonistas de estos receptores (Bockaert y cols., 1997; Bockaert y cols., 2004). El uso terapéutico de los agonistas de los receptores 5-HT₄ ha ido variando a medida que ha ido conociéndose la función y la distribución de estos receptores, tanto en la periferia como en regiones cerebrales implicadas en importantes funciones cognitivas. Las dos primeras clases de agonistas que se sintetizaron, triptamina sustituida y derivados de benzamida, fueron utilizados para el tratamiento del síndrome de colon irritable y de otros trastornos gastrointestinales, respectivamente. Posteriormente, se sintetizó un tercer tipo de agonista derivado de los anteriores, el SL65.0155, que resultó tener efectos positivos sobre la memoria y el aprendizaje, y que en la actualidad se sigue investigando para su posible utilización en la enfermedad de Alzheimer (Moser y cols., 2002).

El RS 67333 que pertenece a la cuarta generación de estos agonistas, fue caracterizado farmacológicamente en 1995 como un agonista parcial de los receptores 5-HT₄. Estos estudios determinaron que el fármaco RS 67333, se encontraba entre los agonistas parciales más potentes, más selectivos y más afines identificados hasta el momento para los receptores 5-HT₄ (Eglen y cols., 1995b). Además, lo que hacía particularmente interesante a este nuevo fármaco era que tenía unas propiedades moleculares diferentes al resto de los agonistas conocidos hasta el momento que le permitían atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (Eglen y cols., 1995b). Así, este fármaco comenzó a utilizarse en modelos animales que se centraban en el estudio de alteraciones cognitivas, tales como la memoria y el aprendizaje. En un estudio preliminar en ratas se observó que la administración de RS 67333 mejoraba el rendimiento en el test de la piscina de Morris revirtiendo el déficit cognitivo inducido por la atropina (Fontana y cols., 1997). Posteriormente, han aparecido numerosos trabajos que, utilizando diferentes paradigmas, apoyan la idea de los efectos pro-cognitivos ejercidos por este fármaco (Lamirault y Simon, 2001; Lelong y cols., 2003; Marchetti y cols., 2000). Además, hay datos recientes que indican que este fármaco inhibe la producción del péptido β -amiloide en neuronas corticales primarias, por lo que se ha sugerido que podría estar indicado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Cho y Hu, 2007).

Al igual que otros receptores serotoninérgicos, los receptores 5-HT₄ han sido objeto de estudio en relación a psicopatologías, y los estudios conductuales y neuroquímicos indican que estos receptores están implicados en los trastornos afectivos (Duman, 2007). En la actualidad, los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) son la clase de antidepresivo

más prescrita pero al igual que muchos otros antidepresivos, presentan el inconveniente de que sus efectos terapéuticos se observan tras varias semanas de tratamiento. Además, se estima que únicamente resultan efectivos en el 50% de los casos (Nestler y cols., 2002). Se cree que el retraso en los efectos antidepresivos de estos fármacos corresponde al periodo de tiempo que necesitan para desensibilizar los autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos localizados en el núcleo del rafe (Artigas y cols., 2002; Blier y Montgny, 1994; Blier y De Montigny, 1999) y producir una desinhibición de las neuronas serotoninérgicas que en consecuencia aumenta la liberación de serotonina en la terminal axónica, dando lugar así al efecto antidepresivo. En este sentido, recientemente se ha demostrado que los receptores 5-HT₄ ejercen un control excitatorio sobre la actividad y el disparo de las neuronas serotoninérgicas localizadas en el núcleo dorsal del rafe que desencadenaría la misma secuencia de reacciones (Lucas y Debonnel, 2002). Aunque este núcleo carece de receptores 5-HT₄ (Vilaro y cols., 1996; Waeber y cols., 1994), en un estudio posterior se determinó que ese control sobre el rafe era ejercido de forma indirecta a través de los receptores 5-HT₄ localizados en neuronas de la CPFm que a su vez, podrían proyectar al núcleo dorsal del rafe. Así, los efectos tónicos sobre el disparo de las neuronas serotoninérgicas observados tras el tratamiento con RS 67333 podrían estar mediados por la estimulación de receptores 5-HT₄ en la CPFm (Lucas y cols., 2005). Además, se observó que estos efectos llegaban a su nivel máximo en tan sólo 3 días de tratamiento y mantenían la misma amplitud a lo largo de un tratamiento crónico de 21 días (Lucas y cols., 2005). En vista a estos resultados, este grupo de investigación consideró que la estimulación de los receptores 5-HT₄ podría representar un nuevo mecanismo antidepresivo de rápida acción.

Así, Lucas y colaboradores (2007) procedieron a realizar un nuevo estudio cuyo objetivo era averiguar si el tratamiento agudo de 3 días con RS 67333 producía los mismos cambios funcionales, morfológicos y moleculares que los producidos por antidepresivos convencionales en un periodo más largo de tratamiento. El fármaco seleccionado fue el citalopran por considerarlo uno de los ISRS más selectivos (Sánchez y Hyttel, 1999). Los resultados hallados en la prueba de natación forzada mostraron que la administración subaguda de RS 67333 disminuía el tiempo de inmovilidad de los animales en un 50%, mientras que la reducción observada en el caso del citalopran tras el mismo periodo de tratamiento, era de un 23%. Por otra parte, el tratamiento de 3 días con RS 67333 fue suficiente para conseguir una desensibilización de los autorreceptores 5-HT_{1A} del núcleo dorsal del rafe. Así mismo, se observó un incremento de la liberación de serotonina en neuronas CA3 hipocampales, una mejora de la actividad de los

receptores 5-HT_{1A} postsinápticos, de la fosforilación de la proteína CREB y la neurogénesis en el hipocampo. Todos ellos cambios indicativos de un efecto antidepresivo. Por el contrario, el tratamiento de 3 días de citalopran no produjo tales efectos. En un estudio más reciente, Licht y colaboradores (2010) observaron que la administración de RS 67333 durante 3 días aumentaba los niveles extracelulares de serotonina, apoyando la idea de que los agonistas de los receptores 5-HT₄ pueden representar un nuevo y rápido mecanismo de acción antidepresiva.

En una segunda fase, Lucas y colaboradores (2007) estudiaron los efectos del tratamiento agudo (3 días) y crónico (14 días) con el RS 67333 y el citalopran en modelos conductuales de depresión, tales como la bulbectomía olfatoria y el estrés medio crónico. En animales bulbectomizados, el efecto del citalopran sobre la hiperlocomoción inducida en estos animales se observó únicamente después de 14 días de administración mientras que el RS 67333 fue efectivo a los tres días de ser administrado y revirtió totalmente dicha conducta tras la administración crónica. En el caso del estrés medio crónico, el citalopran necesitó entre 2 y 3 semanas para revertir totalmente la anhedonia inducida por este modelo de estrés. Sin embargo, 3 días de administración de RS 67333 mostró cierta capacidad antidepresiva y en tan sólo 1 semana de tratamiento la reversión de la anhedonia fue total.

Los datos en conjunto indican que el RS 67333 tiene propiedades antidepresivas, tanto a nivel neuroquímico como conductual, al igual que los tratamientos actuales con la diferencia de que éstas son observables en un menor periodo de tiempo. Esta idea se ha visto reforzada en experimentos recientes que han estudiado los efectos del tratamiento combinado de RS 67333 y diferentes ISRS, tales como el citalopran, la fluvoxamina, la fluoxetina y la paroxetina. Los resultados indican que la administración conjunta produce un incremento de la transmisión serotoninérgica de una forma rápida y que los ISRS aumentan las propiedades antidepresivas del RS 67333 (Licht y cols., 2010; Lucas y cols., 2010). Aunque todavía son necesarios más estudios y los efectos secundarios del RS 67333 no hayan sido descritos ampliamente, los datos parecen indicar que éstos son menores a los observados con los tratamientos clásicos, lo que podría implicar una mejora en la calidad de vida de los pacientes.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

La investigación acerca de los efectos del estrés social sobre la salud ha aportado numerosas evidencias de que produce un aumento de la vulnerabilidad a padecer enfermedades sistémicas y trastornos mentales (Cherry y cols., 2006; Korte y cols., 2005; Matheson y cols., 2006; McEwen, 2008). Específicamente los datos procedentes de estudios animales muestran que los cambios conductuales producidos por el estrés crónico se asocian con síntomas relacionados con la depresión (Blanchard y cols., 2001; Buwalda y cols., 2005). Sin embargo, no todos los individuos responden de la misma manera al estrés y el estudio de las diferencias individuales y las consecuencias en términos de vulnerabilidad individual a la enfermedad es uno de los retos de la investigación actual. Para el estudio de las diferencias individuales en la vulnerabilidad a los efectos negativos del estrés, el modelo de conflicto social (Bartolomucci y cols., 2005; Koolhaas y cols., 1990; Koolhaas y cols., 1997b; Kudryavtseva y cols., 1991) adquiere especial relevancia ya que la mayoría de los estímulos estresantes que producen alteraciones psicopatológicas en humanos son de naturaleza social, crónica e inevitable (De Kloet y cols., 1998). Concretamente, el modelo de derrota social ha evidenciado que los individuos pueden diferir en la conducta que manifiestan durante los episodios de derrota (Bartolomucci y cols., 2005; Stefanski, 1998), de manera que la susceptibilidad al estrés puede ser determinada analizando la manera en la que el organismo responde biológicamente ante el estrés. Los factores biológicos que pueden servir como marcadores de susceptibilidad al estrés incluyen la actividad del eje HPA, factores neurotróficos, sistema inmunitario y actividad serotoninérgica, cuyas alteraciones se han asociado con trastornos psiquiátricos (Anisman y Merali, 2002; Duman y Monteggia, 2006; Miller y cols., 2010; Sapolsky, 1992; Van Praag, 1994).

La variabilidad individual en la respuesta del eje HPA en el estrés ha sido observada tanto en animales como en humanos (Bartolomucci y cols., 2005; Koolhaas y cols., 1999; Kudielka y cols., 2009; Veenema y cols., 2003a; Walker y cols., 2009). Así, los individuos pueden diferir mostrando tanto un exceso como un déficit de la actividad del eje HPA (Touma y cols., 2008) que puede afectar a todo el organismo, incluyendo la función inmune, el balance neurotrófico y la actividad serotoninérgica y explicar la aparición de diferentes trastornos inducidos por el estrés incluyendo la depresión (Antonijevic, 2006; De Kloet y cols., 2005; Gould y Chrousos, 2002; Yehuda 2001).

También se han encontrado diferencias individuales en respuesta al estrés en la actividad inmunitaria, pero existen pocos datos en relación a la actividad serotoninérgica y a los

factores neurotróficos como el BDNF (Bartolomucci y cols. 2005; Gasparotto y cols., 2002; Krishnan y cols., 2007; Stefanski, 1998; Veenema y cols., 2003b).

Es sabido que las citocinas liberadas durante el estrés pueden comunicar con el cerebro a través de diferentes rutas neurales y tener un mayor efecto sobre el metabolismo de neurotransmisores, funciones neuroendocrinas, plasticidad sináptica y la conducta (Dantzer y cols., 2008b; Hayley y cols., 2005; Raison y cols., 2006). Además, el incremento de la producción de citocinas proinflamatorias ha sido asociado con los trastornos depresivos (Anisman, 2009; Raison y cols., 2006). También existen datos de que la funcionalidad de las células T resulta alterada en la depresión (Irwin y Miller, 2007; Zorrilla y cols., 2001). Más recientemente se ha evidenciado que el BDNF juega un papel importante en los cambios conductuales inducidos por el estrés, los cuales también están presentes en los trastornos depresivos (Duman y Monteggia, 2006). Estudios animales han indicado que la exposición al estrés produce una disminución de los niveles de BDNF en el hipocampo (Rasmussen y cols., 2002) y que la administración de antidepresivos revierte estos efectos (Nibuya y cols., 1995). Por otra parte, las situaciones de estrés pueden dar lugar a una disminución de la actividad serotoninérgica que se manifiesta también a través de cambios en receptores que han sido relacionados con el estado de depresión. Las evidencias que implican a la serotonina en la depresión proceden también de estudios donde se observa que la manipulación farmacológica que aumenta la serotonina, mejora la depresión (Blier y cols., 1987; Rausch y cols., 2006).

En la actualidad, los antidepresivos presentan el inconveniente de que sus efectos terapéuticos se observan tras varias semanas de tratamiento. Se cree que el retraso en los efectos antidepresivos de estos fármacos se debe a que es necesario desensibilizar los autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos localizados en los núcleos del rafe (Artigas y cols., 2002; Blier y Montgny, 1994; Blier y De Montigny, 1999) para producir posteriormente una activación serotoninérgica que de lugar al efecto terapéutico. Recientemente, se ha demostrado que los receptores 5-HT₄ ejercen un control excitatorio sobre la actividad y el disparo de las neuronas serotoninérgicas localizadas en el núcleo dorsal del rafe que desencadenaría la misma secuencia de reacciones, pero de una forma más rápida (Lucas y Debonnel, 2002; Lucas y cols., 2005). A la vista de estos resultados, se ha propuesto que la utilización de fármacos que estimulen los receptores 5-HT₄ podría representar un nuevo mecanismo antidepresivo de acción rápida.

Considerando estas evidencias, esperamos que los diferentes perfiles conductuales manifestados ante la derrota, activo y pasivo, se asocien a diferentes características fisiológicas y conductuales, que reflejen una diferente vulnerabilidad a padecer trastornos afectivos. Además, proponemos que los ratones con un perfil conductual pasivo serán más susceptibles a desarrollar alteraciones de la actividad del eje HPA, alteraciones inmunitarias, neurotróficas, serotoninérgicas y conductuales que previamente han sido relacionadas con trastornos de tipo depresivo. Por otra parte, esperamos que la administración de un agonista parcial de los receptores 5-HT₄ (RS 67333), descrito como un antidepresivo potencial con inicio de acción más rápido que los antidepresivos clásicos, revierta los efectos conductuales y fisiológicos producidos por el estrés, en un corto periodo de tiempo.

Para comprobar estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- Establecer diferentes perfiles conductuales en los sujetos derrotados crónicamente, en función de las respuestas conductuales que adoptan durante la confrontación social.
- 2.- Estudiar los efectos del estrés social crónico en función de la estrategia de afrontamiento adoptada por el sujeto derrotado en situaciones de confrontación social, sobre diferentes variables biológicas:
 - Activación del eje HPA: se medirán los niveles de corticosterona en sangre 40 minutos después de 21 días de derrota y los niveles de corticosterona 3 días después de la última derrota. También se medirán los receptores de glucocorticoides (MR y GR) hipotalámicos e hipocampales.
 - Actividad inmunitaria: se medirán niveles de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) y la capacidad proliferativa de linfocitos B y T en el bazo.
 - Niveles de BDNF en el hipocampo.
 - Expresión génica de receptores serotoninérgicos hipocampales: 5-HT_{1A} y 5-HT₄
- 3.- Estudiar si las diferentes estrategias de afrontamiento se relaciona con diferentes niveles de corticosterona a lo largo de la aplicación del estrés social (días 3, 11 y 21).

4.- Evaluar los efectos del estrés social crónico en función de la estrategia de afrontamiento adoptado por el sujeto derrotado en situaciones de confrontación social, sobre la conducta manifestada en el test de natación forzada.

5.- Estudiar si el fármaco agonista serotoninérgico selectivo de los receptores 5-HT₄ (RS 67333), tras un periodo corto de tratamiento de 3 y 5 días, revierte los efectos del estrés crónico. Para ello, se estudiarán los cambios en las variables fisiológicas y conductuales ya descritas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO

Los experimentos que se describen a continuación fueron realizados en el Laboratorio de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (San Sebastián). Para ello, se emplearon ratones macho de la cepa OF1 (Charles River, Oncins, Francia), una línea no consanguínea cuya característica principal consiste en poseer una conducta altamente agresiva. A su llegada al animalario los ratones contaban con 6 semanas de edad (30 – 32 gr), momento en el que comienzan a manifestar esa conducta agresiva.

Desde su llegada a las instalaciones del animalario hasta el fin de los experimentos, el lugar de alojamiento de los animales se mantuvo en unas condiciones estables, que consistieron en una temperatura constante de 20 ± 1 °C, una humedad relativa del 55% y un ciclo artificial de iluminación revertido para asegurar que los ensayos conductuales se realizaban en la fase activa del animal, correspondiente al ciclo de oscuridad (12 horas de oscuridad 08:00 – 20:00, y 12 horas de luz, 20:00 – 08:00). Así mismo, todos los animales tuvieron en todo momento libre acceso a agua y comida.

A su llegada, los ratones fueron alojados individualmente en cajas de plástico transparente de 24,5 x 24,5 x 15 cm de medida durante un periodo de 7 días para facilitar su aclimatación. Tras este periodo de aislamiento se dio comienzo a los ensayos experimentales, cuyos procedimientos se llevaron a cabo también en condiciones estables en una sala adyacente al animalario.

Todos los procedimientos de manipulación animal se realizaron respetando los reglamentos europeos para la atención y el tratamiento de los animales de experimentación, siendo todos los procedimientos controlados y aprobados por la Diputación Foral de Guipúzcoa, España, de acuerdo con el Consejo Directivo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC).

2. PROCEDIMIENTO GENERAL

Se realizaron dos experimentos diferentes utilizando el modelo de contacto sensorial basado en una situación de experiencia de derrota repetida (Kudryavtseva y cols., 1991). Aunque durante las interacciones con el oponente agresivo los sujetos derrotados recibieron algunas mordeduras, la mayoría de ellos no mostró heridas evidentes. En el caso de heridas visibles, los animales fueron retirados de los experimentos.

2.1. EXPERIMENTO 1: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios en los niveles de corticosterona, BDNF y sistema inmunitario

Después de un periodo de adaptación de 7 días se dio comienzo al experimento y se establecieron dos grupos iniciales. Un grupo experimental formado por sujetos sometidos a estrés social crónico por derrota y un grupo control que denominamos grupo control manipulado. Para la formación del grupo experimental y con el objetivo de obtener un grupo homogéneo de animales con experiencia repetida de derrota social, se utilizó el modelo de contacto sensorial (Kudryavtseva y cols., 1991) y se procedió de la siguiente manera (Figura M1):

- **Sujetos derrotados:** El primer día del experimento se formaron 78 parejas de ratones, de acuerdo con su peso corporal, y un miembro de la pareja elegido al azar (sujeto intruso) fue introducido en la caja (24.5 x 24.5 x 15 cm) del otro (sujeto residente). A continuación, se les dejó interactuar libremente por un periodo de 10 minutos y una vez transcurrido este tiempo las parejas fueron separadas por un separador transparente y perforado que fue colocado en la misma caja. Así, los animales fueron alojados en cohabitación sin poder interactuar de una manera física directa, pero sí mantener un contacto sensorial que les permitía verse, oírse y olerse. Este procedimiento se repitió cada 24 horas durante 3 días consecutivos, y a partir de entonces únicamente siguieron en el experimento aquellas parejas que ya habían establecido de forma clara una relación de dominancia-subordinación. Es decir, únicamente fueron seleccionadas aquellas parejas formadas por un dominante agresivo y un subordinado no agresivo que mostraba claramente conductas de sumisión, así el número total de ratones derrotados fue de 56. A partir del cuarto día hasta el último día de estrés social, día 21, los ratones subordinados fueron sometidos a interacciones agonísticas diarias durante 5 minutos

con un dominante residente diferente cada día. Cuarenta minutos después de las derrotas de los días 3, 11 y 21, a todos los animales derrotados se les extrajo sangre por punción submandibular. Los enfrentamientos agonísticos de los días 11 y 21 fueron grabados para evaluar posteriormente la conducta manifestada por los sujetos derrotados durante el conflicto social y establecer así diferentes estrategias de afrontamiento del estrés crónico por derrota (*ver* el punto 3). Después del periodo experimental de 21 días, todos los animales realizaron la prueba de natación forzada durante 2 días consecutivos. El segundo día fue grabado y evaluado. Veinticuatro horas después de la última sesión de la prueba de natación forzada, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se procedió a extraer muestras de sangre por punción cardiaca, se extrajo el bazo y los hipocampos, tal y como se detalla en su apartado correspondiente (*ver* 2.3. Extracción de muestras biológicas).

- **Controles manipulados:** Este grupo (n = 11) fue tratado forma idéntica al grupo de sujetos derrotados, pero no fue expuesto a las interacciones agonísticas y al contacto sensorial con un sujeto agresivo. Estos ratones fueron alojados individualmente en cajas (24.5 x 24.5 x 15 cm) en las que se colocó un separador transparente y perforado con el fin de que habitaran en el mismo espacio restringido que los ratones experimentales. Los controles manipulados fueron llevados diariamente a la sala de experimentación durante los 21 días. Allí, se les retiraba el separador de manera que deambulaban libremente por la caja durante el mismo periodo de tiempo que duraban las interacciones para los sujetos derrotados. Al igual que los sujetos experimentales, estos también realizaron la prueba de natación forzada durante dos días. Igualmente, se evaluó la conducta del segundo día. Los días 3, 11 y 21, cuarenta minutos después de la manipulación se les extrajo sangre por punción submandibular. Así mismo, 24 horas después de la prueba de natación forzada, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente después se les extrajo sangre por punción cardiaca, el bazo y los hipocampos.

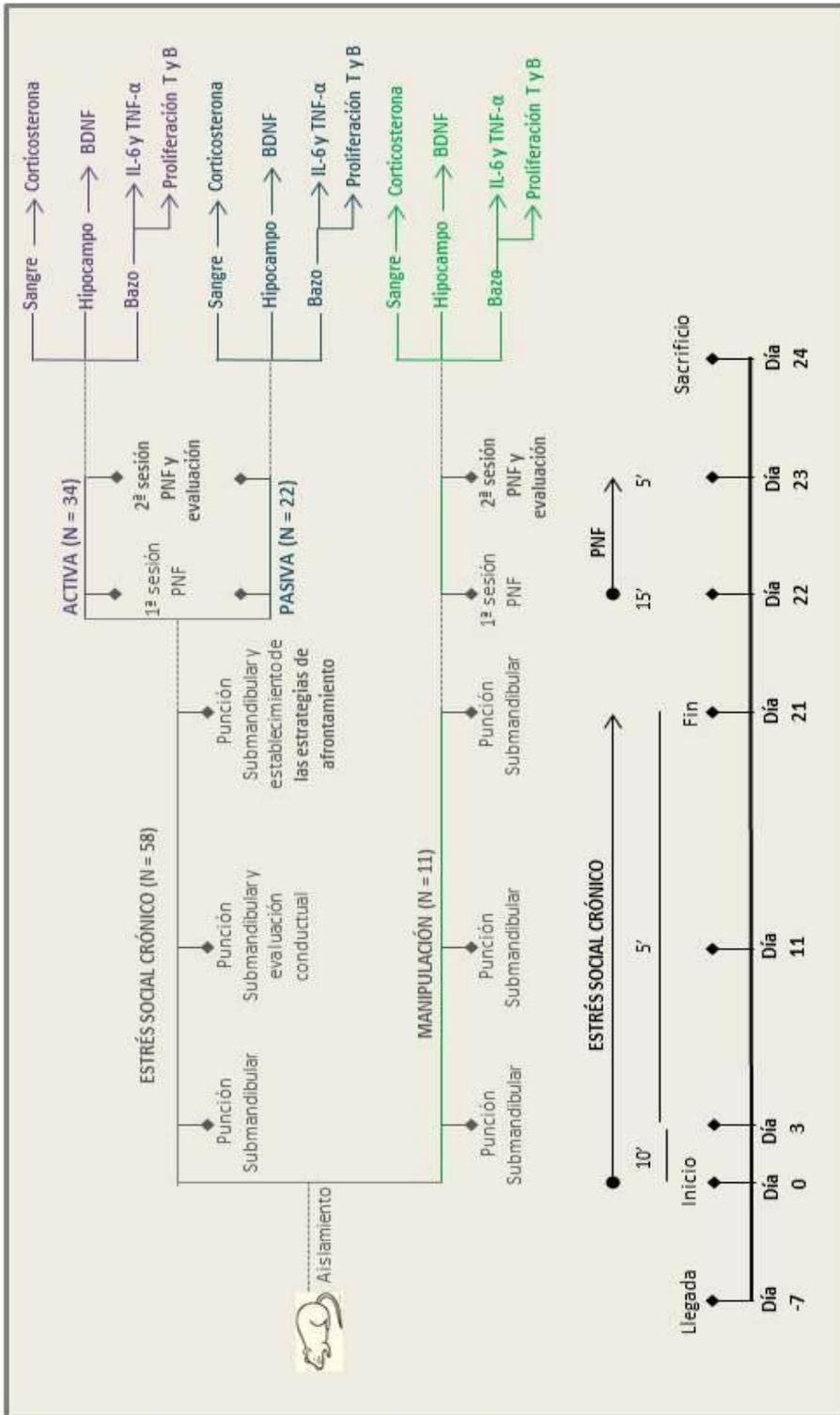


Figura M1. Representación del diseño experimental del experimento 1

2.2. EXPERIMENTO 2: Estrategias de afrontamiento en respuesta al estrés crónico por derrota y cambios en los receptores de glucocorticoides (MR y GR) y en los receptores serotoninérgicos postsinápticos (5-HT_{1A} y 5-HT₄). Efectos del tratamiento a corto plazo con el RS 67333.

En este segundo experimento se aplicó el mismo protocolo de estrés durante el mismo periodo de tiempo, el número total de animales derrotados al finalizar el experimento fue de 68. En esta ocasión, sin embargo, las estrategias de afrontamiento fueron establecidas el día 18 de estrés, tal y como se detalla en el apartado 2.1. de resultados. Para ellos se grabaron los enfrentamientos e inmediatamente después se evaluó la conducta manifestada por los sujetos derrotados. Una vez establecidas las estrategias de afrontamiento, la mitad de los sujetos de cada grupo fue asignada al grupo de tratamiento farmacológico y la otra mitad al grupo que recibía vehículo. La administración tanto del fármaco como del vehículo comenzó el día 19 de estrés social y tuvo una duración de 5 días en total. El enfrentamiento del día 21 también fue grabado para su posterior evaluación conductual (3 días de tratamiento farmacológico). Tras la aplicación del estrés social se realizó la prueba de natación forzada durante dos días consecutivos. El segundo día de la prueba fue grabado y evaluado coincidiendo con el quinto día de tratamiento farmacológico. Trascurridas 24 horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo sangre por punción cardiaca, el bazo, el hipotálamo y los hipocampos. Además, también se extrajeron muestras de sangre por punción submandibular tres días antes de comenzar la aplicación del estrés, 40 minutos después de la última derrota y tres días después de ésta (Figura M2).

El grupo de controles manipulados (n= 20) fue tratado igual que en el primer experimento. La única variedad consistió en que a partir del día 19 de experimento a la mitad (n= 10) de ellos se les administró un tratamiento farmacológico y a la otra mitad (n = 10) vehículo. También realizaron la prueba de natación forzada y por último, se les extrajeron las mismas muestras que a los sujetos derrotados y de forma idéntica.

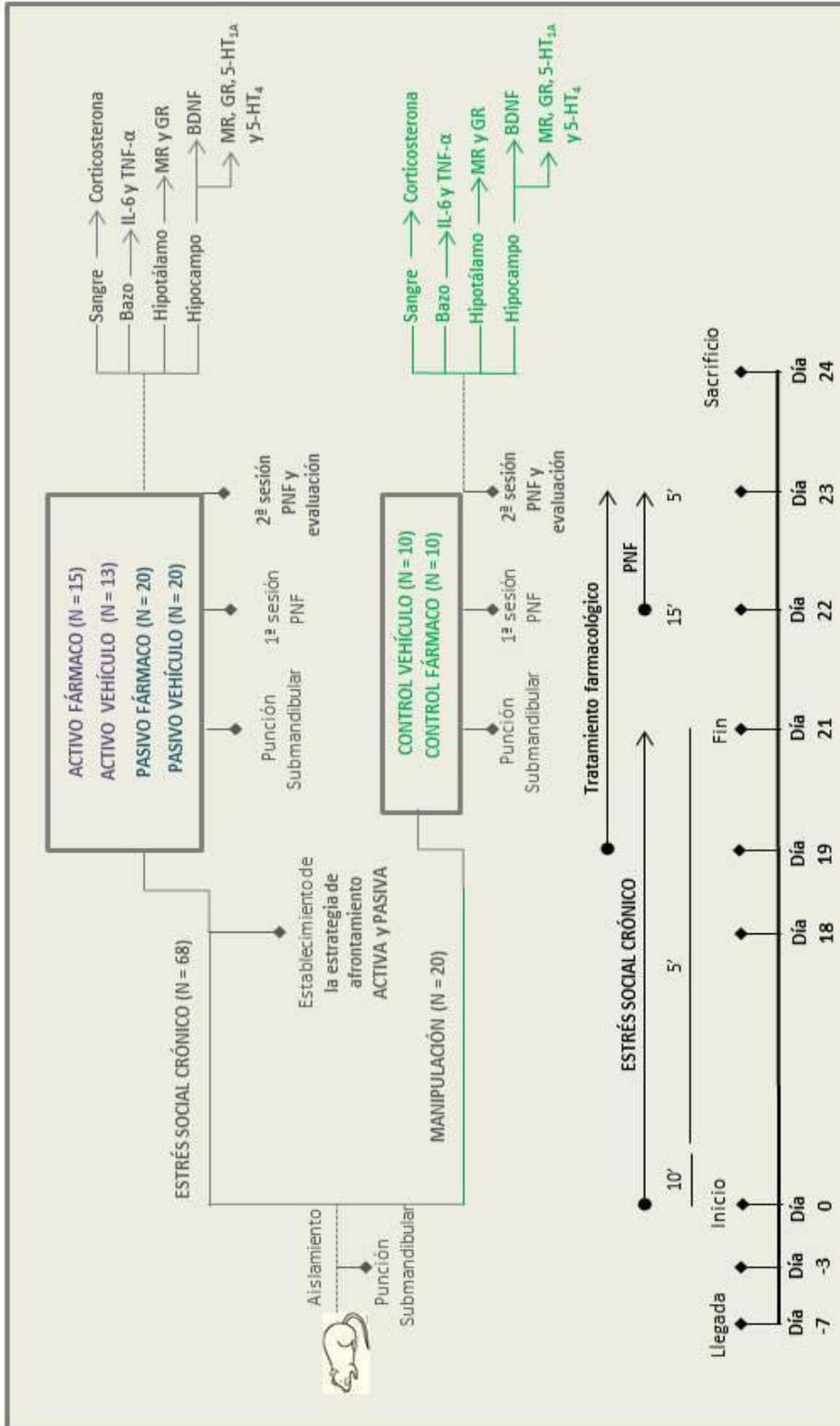


Figura M2. Representación del diseño experimental del experimento 2

2.3. Extracción de muestras biológicas

- **La extracción de sangre para el posterior análisis de los niveles de corticosterona en plasma** se hizo mediante punción submandibular durante el periodo de estrés y mediante punción cardíaca inmediatamente después del sacrificio. En ambos casos, la sangre fue recolectada en tubos revestidos con heparina. Las muestras extraídas se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1800 xg durante 15 minutos a 4°C. El plasma resultante fue transferido a un microvial que fue almacenado a -70°C. La extracción de muestras sanguíneas *in vivo* mediante la punción submandibular en ratones, consiste en un nuevo procedimiento que ha sido propuesto por Golde y colaboradores (2005) como una alternativa a otras técnicas más agresiva que a menudo resultan complicadas, e incluso, incompatibles con los objetivos de la investigación. Esta técnica permite obtener volumen suficiente de sangre (200-500µl), de una manera muy rápida, realizando una punción sobre la vena submandibular (Figura M3) con una lanceta de 5mm (Lancetas 5mm Goldenrod, Medipoint International Inc., EE.UU). Para ello únicamente es necesario inmovilizar al animal, cogiéndolo con la mano, sin necesidad de utilizar anestesia.



Figura M3. Ilustración de la vena submandibular en ratón. La mejilla es drenada por las venas retro-orbital (arriba) y submandibular (abajo) procedentes de la vena yugular.

- **Extracción del bazo:** tras la extracción de sangre se extrajeron los bazos en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Cultair BC 100. Cultair S.L., Madrid, España). Los bazos fueron procesados para realizar ensayos de proliferación celular y para la determinación de niveles de citocinas.

- **Extracción de los hipocampos e hipotálamo:** en una plataforma de aluminio colocada sobre hielo en escamas a 4°C, los animales fueron decapitados para la extracción de los hipocampos y el hipotálamo. Los dos hipocampos de cada sujeto fueron guardados en viales separados que primeramente fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -70°C, para posteriores análisis.

3. EVALUACIÓN CONDUCTUAL Y ESTABLECIMIENTO DE LAS ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO.

3.1. Experimento 1

Las conductas manifestadas por los sujetos derrotados los días 11 y 21 fueron grabadas con una cámara de video digital (JVC, GZ-MG77E). Las grabaciones de cada sujeto se evaluaron posteriormente utilizando un programa informático THE OBSERVER 3.0 (Noldus, IT, Wageningen, Holanda). Este programa permite cuantificar el tiempo que ha invertido cada sujeto en cada una de las categorías conductuales establecidas. La evaluación se realizó en base al etograma del ratón elaborado por el profesor P.F. Brain y detalladamente descrito por M. Martínez y colaboradores (1998). Dicho etograma contempla 52 pautas conductuales agrupadas en 11 categorías. En el presente trabajo se evaluaron 7 de esas categorías (Para la descripción detallada de cada una de las pautas de conducta evaluada ver ANEXO I):

1. Autoaseo-Escarbar
2. Defensa-Sumisión
3. Evitación-Huida
4. Exploración a Distancia
5. Exploración No Social
6. Exploración Social
7. Inmovilidad

Una vez realizada la evaluación conductual, se obtuvo el porcentaje de tiempo dedicado a cada una de las categorías conductuales evaluadas y se exportaron a la aplicación de tratamientos estadísticos SPSS para Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, EE.UU). Así, utilizando el porcentaje medio de tiempo dedicado por cada uno de los sujetos a cada una de las conductas analizadas el día 21 de estrés social, se realizó un análisis cluster jerárquico. El análisis de cluster jerárquico es una técnica de agrupamiento que partiendo de elementos muestrales individuales, va creando grupos hasta llegar a la formación de un único grupo (o cluster) constituido por todos los individuos de la muestra. El análisis se basa en el cálculo de la matriz de distancias entre los elementos individuales de la muestra organizando los elementos (o casos) en grupos o clusters,

de modo que los individuos dentro de un grupo son más similares entre sí que los individuos pertenecientes a grupos diferentes. Cuando se consigue agrupar a todos los casos en un único cluster el siguiente paso será encontrar grupos homogéneos “naturales” que puedan existir en el archivo de datos valorando distintas soluciones con el fin de elegir la más consistente. Es decir, a la hora de decidir el número de clusters óptimos deberá comprobarse la validez estadística de éstos y para ello, en ocasiones, resulta valioso el uso de otras técnicas estadísticas. En el presente trabajo, se realizó un análisis discriminante utilizando el método de *Lambda de Wilks* de inclusión por pasos, para investigar la integridad de los grupos derivados del análisis cluster y determinar las variables conductuales que más eficientemente discriminaban los dos grupos, ayudándonos a interpretar estas diferencias (*ver* apartado 1.1. de los resultados).

3.2. Experimento 2

En este segundo experimento se grabaron y evaluaron las conductas manifestadas por los sujetos derrotados los días 18 y 21. Para ese fin, se evaluaron las mismas categorías conductuales del primer experimento, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Con el porcentaje medio de tiempo obtenido el día 18 se realizó un análisis discriminante para asignar a los sujetos a los diferentes grupos en base a los clusters obtenidos en el experimento 1 (*ver* apartado 2.1. de los resultados).

4. PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA (PNF)

La prueba de natación forzada (en inglés, *Forced Swim Test*, FST) es probablemente el modelo de depresión más empleado a la hora de estudiar la efectividad de los tratamientos antidepresivos sobre los cambios conductuales inducidos por el estrés (Duman y Monteggia, 2006). En este paradigma, cuanto más tiempo pasa el animal en un estado inmóvil en decremento de conductas activas, ese estado inactivo es interpretado como un estado de depresión (Porsolt y cols., 1977). Además, este modelo también puede predecir de forma fiable la eficacia antidepresiva de un fármaco, ya que el tiempo de inmovilidad del animal tratado con un antidepresivo se reduce en comparación con un animal tratado con vehículo (Dalvi y Lucki, 1999).

Considerando estos aspectos, la PNF se realizó de la siguiente manera en ambos experimentos. Los ratones fueron introducidos individualmente en un recipiente cilíndrico (18.5 cm de altura y 12.5 cm de diámetro) que contenía 13.5 cm de agua a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Duarte y cols., 2006). La prueba se realizó dos días consecutivos a las 09:00 horas. Una primera sesión de pre-test, 24 horas después de la última derrota, durante 15 minutos. La sesión del segundo día fue realizada 48 horas después de la última derrota y tuvo una duración de 5 minutos, los cuales fueron grabados (JVC, GZ-MG77E) para su posterior evaluación. Tras cada sesión los animales eran depositados en cajas que se mantenían calientes con el fin de secarlos de una forma rápida antes de volver a estabularlos.

La evaluación conductual se realizó mediante un programa informático, THE OBSERVER 3.0 (Noldus, IT, Wageningen, Holanda). Las conductas evaluadas fueron la inmovilidad, la conducta de escalada y la natación. A la hora de realizar los análisis estadísticos se consideraron el tiempo total dedicado a cada conducta así como la latencia en segundos de cada una de ellas. En cuanto al criterio de evaluación, se consideró que los animales estaban inmóviles cuando cesaban de patear y se mantenían flotando en el agua, los movimientos mínimos realizados con el objetivo de mantener la cabeza fuera del agua también fueron considerados un estado de *inmovilidad*. La conducta de *escalada* es representada por una serie de movimientos enérgicos en el intento de escalar el recipiente. La conducta de *natación* implica movimientos activos de las patas delanteras, bien en dirección horizontal cruzando el recipiente o bien girando en círculo.

5. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Se empleó un fármaco agonista parcial de los receptores 5-HT₄, el RS 67333 Hidroclorida (1-(4-amino-5-cloro-2-metoxifenil)-3-(1-n-butil-4-piperidinil)-1-propano) (Tocris Cookson Ltd., Bristol, Reino Unido). El fármaco fue disuelto en solución salina (Grifols, Barcelona, España), la cual también fue utilizada como sustancia vehículo. Todas las inyecciones se administraron intraperitonealmente en un volumen de 5ml/kg de peso corporal entre las 08:30-09:00 horas. La dosis administrada del fármaco fue de 1.5mg/kg por día, en base a la literatura disponible (Lucas y cols., 2007).

6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA EN PLASMA

La determinación de los niveles de corticosterona en plasma se realizó utilizando el kit comercial de ensayo inmunoenzimático competitivo Assay Desings' Correlate-EIATM (Ann Arbor, Michigan, EE.UU), de tipo "sándwich" (ELISA). Cada kit contiene una placa de 96 pocillos pre-tratada con un anticuerpo policlonal anti-corticosterona murina. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el kit y únicamente fueron utilizados los reactivos que proporciona el kit, y todos ellos fueron equilibrados a la temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizados.

- **Preparación y adición de la curva estándar y las muestras:** para la preparación de la curva estándar el kit suministra un vial con una concentración de corticosterona de 200.000 pg/ml. Utilizando el diluyente suministrado se preparó el siguiente rango de concentraciones para la fabricación de la curva estándar: 20.000 pg/ml, 4.000 pg/ml, 800 pg/ml, 160 pg/ml y 32 pg/ml. Las muestras fueron diluidas en una concentración de 1:300 y para ello, se añadió 1µl de plasma en 299 µl de diluyente (Tampón Tris Salino con proteínas y azida sódica). Finalmente, se añadieron por duplicado 100 µl de cada uno de los estándares y de las muestras en sus pocillos correspondientes. Así mismo, se preparó un control para la determinación del nivel de unión no específica (UNE) añadiendo por duplicado 150 µl de diluyente en sus pocillos correspondientes.

- **Incubación con el conjugado y el anticuerpo de corticosterona:** una vez añadidas las muestras, los estándares y el control, se añadieron 50 µl del conjugado (fosfatasa alcalina conjugada con corticosterona) en todos los pocillo. Finalmente, se añadieron 50 µl del anticuerpo policlonal de corticosterona en todos los pocillos excepto en los de control. La placa fue sellada e incubada durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placas a ~500 rpm (Minishaker, IKA). Durante este periodo de incubación, se produce el llamado "sándwich" anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

- **Adición del sustrato:** tras el periodo de incubación, todos los pocillos fueron lavados con el tampón de lavado (Tampón Tris Salino con detergente) tres veces. Tras el último lavado, la placa fue escurrida y se añadieron 200 µl del sustrato p-Npp (fosfato p-nitrofenol) en todos los pocillos y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de la adición de las muestras, éstas fueron mantenidas a 4°C.

- **Detención y revelado de la reacción enzimática:** tras este último periodo de incubación se añadieron a todos los pocillo 50 μ l de fosfato trisodio para detener la reacción enzimática. Seguidamente se obtuvo la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de placas ELx 800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbancia de 405 nm de longitud de onda.
- **Valoración de los resultados:** en primer lugar, se calcularon las medias de la DO de cada uno de los estándares y las muestras y se les sustrajo el valor de la media del control (UNE). Las DO de los estándares se utilizaron para la construcción de la curva patrón, a partir de la cual se calcularon las concentraciones de corticosterona de las muestras mediante un análisis de curva logística, con la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU). Finalmente, los valores obtenidos fueron ajustados teniendo en consideración la concentración (1:300) en la que habíamos añadido las muestras en el ensayo. Así, se obtuvieron los niveles de corticosterona en ng/ml.

7. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO

Para estudiar la capacidad del sistema inmunitario de responder a un antígeno tanto a nivel celular como humoral, se estudió la respuesta proliferativa, *in vitro*, de células mononucleares de bazo ante dos mitógenos, Conavalina A (Con A) y Liposacrido E.coli (LPS), respectivamente. Durante todo el proceso de manipulación celular descrito a continuación, se trabajó en condiciones de esterilidad y las células se mantuvieron a 4°C.

- **Aislamiento de células mononucleares de bazo:** los bazos se extrajeron en una campana de flujo laminar (Cultair BC 100. Cultair S.L., Madrid, España) en completa esterilidad. El bazo se disgregó en 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España), realizando sucesivos pases a través de un tamiz estéril de acero inoxidable provisto de una malla de acero de grado 50. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 400 xg durante 5 minutos a 4°C (Jouan, CR412). Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y el sedimento celular fue resuspendido en 3 ml de medio RPMI-1640. Para aislar las células mononucleares de la suspensión celular esplénica, se añadieron cuidadosamente 2 ml de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio Sciences, Uppsala, Suecia) y se centrifugó a 400 xg durante 30 minutos a 21°C (Jouan, CR412). El gradiente de densidad establecido con el Ficoll-Paque (1,077 g/ml) permite que por debajo de éste, sedimenten eritrocitos, granulocitos y células muertas, y que las células mononucleares (linfocitos y monocitos) se distingan como una interfase entre el Ficoll-Paque y el medio RPMI-1640. Se recoge la interfase y se diluye en 3 ml de medio RPMI-1640. Se resuspende cuidadosamente y se centrifuga a 400 xg durante 5 minutos a 4°C (Jouan, CR412). A continuación, se elimina el sobrenadante y se añaden de nuevo 3 ml de medio RPMI-1640, se resuspende el sedimento cuidadosamente y se realiza un segundo lavado recentrifugando la suspensión celular a 400 xg durante 5 minutos a 4°C (Jouan, CR412). Este proceso de lavado, se repite una vez más. Tras el último lavado, se elimina el sobrenadante y el sustrato obtenido que contiene las células se resuspende en 1 ml de medio RPMI-1640. Se recoge una muestra de 50 µl de cada uno de los sujetos y se procede al recuento celular y al estudio de viabilidad de las células.

- **Recuento celular y estudio de viabilidad:** estos análisis se realizaron mediante una cámara cuentaglóbulos Bürker (Brand, Wertheim/Main, Alemania), con un área cuadrículada de

dimensiones conocidas y un microscopio invertido (Olympus CK2, Tokio, Japón). La muestra de 50 μl se diluyó en tinción de azul tripán (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España), y se situó en la cámara de recuento. El azul tripán es una molécula coloreada de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada. Así, se contaron tanto las células vivas (incoloras) como las células muertas (azules), y mediante una sencilla fórmula se determinó el número total de células vivas y muertas de la muestra. Todos los cultivos celulares que se llevaron a cabo contaron con un índice de células vivas, viables o incoloras, superior al 95% del total de células de la muestra. Conocido el número de células en la muestra, se ajustan las concentraciones a $2,5 \times 10^6$ células/ml.

- **Preparación de los cultivos de proliferación celular:** en una placa Falcon de 96 pocillos y de fondo plano (Becton-Dickinson, Meylan, Francia), se sembraron 15 pocillos por sujeto, con 100 μl de la suspensión celular ajustada. Cinco pocillos, sin estimulación, se sembraron sobre 100 μl de medio RPMI-1640 suplementado con un 20% de suero bovino fetal (SBF, Gibco, Life-Technologies Inc., Gaithersburg, MD., EE.UU.). Otros cinco pocillos, estimulados con Con A (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España), se sembraron sobre 100 μl de medio RPMI-1640 suplementado con un 20% de SBF y 5 $\mu\text{g/ml}$ de Con A. Los cinco pocillos restantes, estimulados con LPS (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España), se sembraron sobre 100 μl de medio RPMI-1640 suplementado con un 20% de SBF y 1 mg/ml de LPS. Una vez sembradas todas las muestras, las placas se mantuvieron en incubación durante 72 horas en una estufa de cultivo (Jouan, Saint Herblain, Francia), a 37°C y con un 5% de CO_2 .

- **Determinación de la capacidad proliferativa:** la determinación de la capacidad proliferativa de las células mononucleares de bazo, se realizó con el Kit de Proliferación Celular II, XTT (Roche, Mannheim, Alemania). Este kit permite la cuantificación de la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico, no radioactivo, que se basa en la conversión colorimétrica que tiene lugar sólo en células activas metabólicamente, con la degradación de las sales de tetrazolio del XTT (ácido sulfónico de sodio 3'-[1-fenilaminocarbonil]-3, 4 tetrazolio]-bis (4-metoxi-6-nitro) a sales de formazán. El compuesto de formazán expresa un color naranja que es directamente cuantificable utilizando un lector electrofotométrico. Tras el periodo de incubación de 72 horas, se añadieron 100 μl de la solución preparada de XTT a cada pocillo. Las placas fueron incubadas de nuevo en la estufa de cultivo y en las mismas condiciones anteriores durante 6 horas. Concluido este periodo, se midió en un lector de placas colorimétrico ELx 800 (Bio-Tek

Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbanza de 490 nm de longitud de onda. Los datos se expresan como índice de proliferación (IP), aplicando la siguiente fórmula para cada uno de los mitógenos: Densidad óptica media de los pocillos estimulados/Densidad óptica de los pocillos sin estimular.

8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 Y TNF- α EN BAZO

Tras aislar las células mononucleares del bazo y ajustar su concentración a $2,5 \times 10^6$ células/ml, tal y como se explica en el apartado anterior, paralelamente a la preparación de los cultivos para la capacidad proliferativa, también se prepararon los cultivos para la posterior determinación IL-6 y TNF- α . Estos cultivos también se realizaron en placas Falcon de 96 pocillos y de fondo plano, y se sembraron 6 pocillos por sujeto, con 100 μ l de la suspensión celular ajustada. Tres de estos pocillos, se sembraron sobre 100 μ l de medio RPMI-1640 suplementado con un 20% de SBF y 5 μ g/ml de Con A para la secreción de IL-6. Los tres pocillos restantes, se sembraron sobre 100 μ l de medio RPMI-1640 suplementado con un 20% de SBF y 1 mg/ml de LPS para la secreción de TNF- α . Una vez sembradas todas las muestras, las placas se mantuvieron en incubación durante 48 horas en la estufa de cultivo a 37°C y con un 5% de CO₂. Transcurrido este periodo, las placas fueron centrifugadas a 400 xg durante 15 minutos a 4°C (Jouan, CR412). Se recogió el sobrenadante y se trasvasó a microviales que primeramente fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -70°C.

8.1. Determinación de los niveles de IL-6 en el bazo

La determinación de los niveles de IL-6 (pg/ml) en el bazo se realizó utilizando un kit comercial de ensayo inmunoenzimático de tipo “sándwich” (ELISA), suministrado por BD OptEIA™ (Pharmigen, SanDiego, EE.UU). El ensayo contiene dos placas de 96 pocillos pre-tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 murina. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el kit y únicamente se utilizaron los reactivos proporcionados por éste. Antes de usar cada uno de los reactivos estos fueron equilibrados a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizados. Además, antes de la adición de las muestras éstas fueron mantenidas a 4°C.

- **Preparación de la curva estándar:** para la preparación de la curva estándar el kit suministra un vial liofilizado que contiene IL-6 que debe ser reconstituido añadiendo un diluyente específico (suero animal). Después, se prepara la curva estándar siguiendo un rango de concentraciones: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml y 0 pg/ml. Esta última concentración únicamente contiene diluyente.

- **Adición de la curva estándar y las muestras:** en primer lugar se añaden 50 μ l de otro diluyente (tampón de proteínas) en cada pocillo. En segundo lugar, se añaden 50 μ l de cada uno de los estándares y de las muestras por duplicado. Por último, se sella la placa y se pone a incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

- **Adición e incubación con el anticuerpo-detector:** tras el periodo de incubación la placa es lavada 5 veces con el tampón de lavado que contiene detergente y tras el último lavado la placa se escurre. Una vez eliminado el material no ligado se añadieron 100 μ l del anticuerpo-detector en cada pocillo. El anticuerpo-detector se preparó mezclando 48 μ l de la enzima estreptavidina peroxidasa de rábano en 12 ml del anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IL6 murina. Se selló la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

- **Adición del sustrato:** tras la incubación se lavó la placa 7 veces con el tampón de lavados y tras el último se escurrió bien la placa. Una vez eliminado el exceso de anticuerpo ligado a la enzima, se añadieron 100 μ l de la solución sustrato TMB (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina). La placa fue incubada en total oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- **Detención y revelado de la reacción enzimática:** tras este último periodo de incubación se añadieron a todos los pocillo 50 μ l de ácido fosfórico 1M para detener la reacción enzimática. Seguidamente se obtuvo la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de placas ELx 800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbancia de 450 nm de longitud de onda.

- **Valoración de los resultados:** las DO de los estándares se utilizaron para la construcción de la curva patrón, a partir de la cual se calcularon las concentraciones de IL-6 de las muestras mediante un análisis de regresión, con la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU). Así, se obtuvieron los niveles de IL-6 en pg/ml.

8.2. Determinación de los niveles de TNF- α en el bazo

La determinación de los niveles de TNF- α (pg/ml) en el bazo se realizó utilizando un kit comercial de ensayo inmunoenzimático de tipo “sándwich” (ELISA), suministrado por BD OptEIA™ (Pharmigen, SanDiego, EE.UU). El ensayo contiene dos placas de 96 pocillos pre-tratadas con un anticuerpo policlonal anti-TNF- α murina. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el kit y únicamente se utilizaron los reactivos proporcionados por éste. Antes de usar cada uno de los reactivos estos fueron equilibrados a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizados. Además, antes de la adición de las muestras, éstas fueron mantenidas a 4°C.

- **Preparación de la curva estándar:** para la preparación de la curva estándar el kit suministra un vial liofilizado que contiene TNF- α que debe ser reconstituido añadiendo un diluyente específico (suero animal). Después, se prepara la curva estándar siguiendo un rango de concentraciones: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml y 0 pg/ml. Esta última concentración únicamente contiene diluyente.
- **Adición de la curva estándar y las muestras:** en primer lugar se añaden 50 μ l de otro diluyente (tampón de proteínas) en cada pocillo. En segundo lugar, se añaden 50 μ l de cada uno de los estándares y de las muestras por duplicado. Por último, se sella la placa y se pone a incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- **Adición e incubación con el anticuerpo-detector:** tras el periodo de incubación, la placa es lavada 5 veces con el tampón de lavado que contiene detergente y tras el último lavado la placa se escurre. Una vez eliminado el material no ligado se añadieron, en cada pocillo, 100 μ l del anticuerpo-detector, anticuerpo policlonal biotinilado anti-TNF- α murina. Se selló la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
- **Adición e incubación del conjugado enzimático:** tras el periodo de incubación, la placa es lavada 5 veces con el tampón de lavado y tras el último lavado la placa se escurre. Se añaden 100 μ l del conjugado enzimático en cada pocillo. Éste se preparó mezclando 48 μ l de la enzima estreptavidina peroxidasa de rábano en 12 ml de suero animal. Se selló la placa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

- **Adición del sustrato:** tras la incubación se lavó la placa 7 veces con el tampón de lavados y tras el último se escurrió bien la placa. Una vez eliminado el exceso de anticuerpo ligado a la enzima, se añadieron 100 μ l de la solución sustrato TMB (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina). La placa fue incubada en total oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- **Detención y revelado de la reacción enzimática:** tras este último periodo de incubación se añadieron a todos los pocillo 50 μ l de ácido fosfórico 1M para detener la reacción enzimática. Seguidamente se obtuvo la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de placas ELx 800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbancia de 450 nm de longitud de onda.
- **Valoración de los resultados:** las DO de los estándares se utilizaron para la construcción de la curva patrón, a partir de la cual se calcularon las concentraciones de TNF- α de las muestras mediante un análisis de regresión, con la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU). Así, se obtuvieron los niveles de TNF- α en pg/ml.

9. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE BDNF EN EL HIPOCAMPO

Antes de la cuantificación de los niveles de proteína BDNF en el hipocampo, fue necesario un proceso de homogenización de las muestras para realizar la extracción de BDNF. Las muestras fueron homogenizadas en un tampón de lisis que contenía los siguientes compuestos que fueron disueltos en agua ultrapura (Direct-Q 3 Ultrapure Water Systems, Millipore, Madrid, España):

- 100 mM Tris-HCL pH7 (Tris hidróclorido pH7, Sigma-Aldrich Química SA)
- 2% BSA (seroalbúmina bovina, Sigma-Aldrich Química SA)
- NaCl 1M (sodio cloruro, Sigma-Aldrich Química SA)
- 4mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Sigma-Aldrich Química SA)
- 2% Triton X-100 ($[C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n]$, Sigma-Aldrich Química SA)
- un coctel de inhibidores de proteasas (una pastilla/50ml de tampón de lisis)

Una vez preparado el tampón de lisis, se procedió a sacar los hipocampos del congelador y se mantuvieron en hielo. Cada muestra fue introducida en 1.5 ml de tampón de lisis y sonicada durante 30 segundos, en pulsos, con un intervalo de 5 segundos a una intensidad de 70 Hz (LABSONIC P, Braun Biothec International). Las muestras fueron centrifugadas durante 30 minutos a 14000 xg a 4 °C (Avanti J-E Centrifuge, Beckman Coulter). Transcurrido el periodo de centrifugación se desechó el pellet y se extrajo el sobrenadante que fue trasvasado a dos microviales diferentes, uno para la cuantificación de los niveles de BDNF y el otro para la determinación de la cantidad de proteína.

Este método de extracción fue propuesto por Pang y colaboradores (2006) y presenta unas ligeras modificaciones con respecto al método sugerido por la casa comercial, permitiendo extraer mayores cantidades de BDNF.

9.1. Determinación de los niveles de BDNF

Con el propósito de medir la cantidad de BDNF hipocampal se utilizó un kit comercial de ensayo inmunoenzimático de tipo "sándwich" (ELISA), BDNF E_{max}[®] ImmunoAssay System, comercializado por la casa Promega (Promega CO., Madison, WI, EE.UU).

- **Revestimiento de la placa:** por requerimiento del kit comercial, antes de comenzar con el ensayo es necesario revestir las placas con el anticuerpo monoclonal Anti-BDNF (mAb) que

suministra el kit. Para ello, se utilizaron placas Falcon de 96 pocillos y de fondo plano (Becton-Dickinson, Meylan, Francia), y en cada uno de los pocillos se añadió 100 µl de un tampón de recubrimiento de carbonato pH 9.7 (25 mM sodio bicarbonato, 25 mM carbonato de sodio, Sigma-Aldrich Química SA) al que se le añadió el Anti-BDNF mAb. Se selló la placa y se incubó a 4°C durante 12 horas en el frigorífico.

- **Bloqueo de las uniones no específicas:** una vez transcurrido el periodo de incubación se saca la placa del frigorífico y se lava una vez con TBST (20mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween®, Sigma-Aldrich Química SA). Así, se desecha el Anti-BDNF mAb sobrante que no ha sido absorbido. Tras el lavado, se añaden 200 µl de un tampón suministrado por el kit, y la placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

- **Preparación de la curva estándar:** para la preparación de la curva estándar el kit suministra un vial con BDNF a una concentración de 1 µg/ml y utilizando el diluyente, se prepara la curva estándar siguiendo un rango de concentraciones: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml, 7.8 pg/ml y 0 pg/ml. Esta última concentración únicamente contiene diluyente.

- **Adición de la curva estándar y las muestras:** una vez transcurrido el periodo de la incubación, se lava la placa una vez con TBST. Tras el lavado se añaden 100 µl de cada uno de los estándares por duplicado. En los pocillos restantes se añaden 75 µl de diluyente y a continuación se añaden 25 µl de nuestras muestras sobre el diluyente depositado, también por duplicado. Así, obtuvimos una dilución de 1:4 para nuestras muestras. Una vez finalizado este proceso, la placa se selló e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitaplacas a 400 ± 100 rpm. Durante esta incubación el BDNF de nuestras muestras será capturado por el anticuerpo que reviste la placa.

- **Adición del anticuerpo-detector:** tras la incubación, la placa se lavó 5 veces con TBST y se añadieron 100 µl del anticuerpo policlonal Anti-Human BDNF pAb a cada pocillo. Se selló la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitaplacas a 400 ± 100 rpm (Minishaker, IKA). Durante esta incubación el BDNF que previamente ha sido capturado se unirá a este otro anticuerpo policlonal.

- **Adición del conjugado enzimático:** tras la incubación, la placa se lavó 5 veces con TBST. Seguidamente se añadieron 100 μ l del anticuerpo anti-IgY conjugado con peroxidasa. Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitaplacas a 400 ± 100 rpm. Durante este periodo de incubación, se produce el llamado “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo.
- **Adición del sustrato:** tras la incubación se lavó la placa 5 veces con TBST. Una vez eliminado el exceso de anticuerpo, se añadieron 100 μ l de la solución sustrato TMB (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina). La placa fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente en el agitaplacas a 400 ± 100 rpm (Minishaker, IKA).
- **Detención y revelado de la reacción enzimática:** tras este último periodo de incubación, se añadieron a todos los pocillos 100 μ l de ácido clorhídrico 1N para detener la reacción enzimática. Seguidamente se obtuvo la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un lector de placas ELx 800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VE., EE.UU) con un filtro de absorbancia de 450 nm de longitud de onda.
- **Valoración de los resultados:** la DO obtenida de los estándares se utilizó para la construcción de la curva patrón a partir de la cual se calcularon las concentraciones de BDNF de nuestras muestras, mediante un análisis de regresión con la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU). Finalmente, los niveles de BDNF obtenidos en pg/ml fueron corregidos en función de la dilución 1:4 en la que habíamos sembrado nuestras muestras. No obstante, para terminar con la valoración de los resultados se midió la concentración de proteína total presente en cada una de las muestras. Tal y como se describe en el siguiente apartado.

9.2. Determinación de los niveles de proteína (mg/ml)

La determinación de la cantidad de proteína se realizó mediante la técnica de Bradford. Este procedimiento se basa en el complejo que se forma tras la unión entre el reactivo Bradford (un colorante azul brillante, Sigma-Aldrich Química SA) y las proteínas en solución. Este complejo causa un cambio en la absorción máxima del colorante desde 465 a 595 nm. La cantidad de absorción se mide por espectrofotometría y es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

En primer lugar es necesario preparar una curva estándar y para ello se utilizó BSA (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) y como diluyente el mismo tampón de lisis en el que habían sido homogenizadas las muestras. Las concentraciones de la curva estándar fueron las siguientes: 1.4 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml y 0 mg/ml. Esta última concentración únicamente contiene diluyente. A continuación, se midió la absorbancia de los estándares y las muestras a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro (Biomate 3. Thermo Fisher Scientific., Alcobendas, España). Para ello, se mezclaron 1.5 ml del reactivo Bradford con 0.05 ml de muestra o estándar.

Los valores de absorbancia de los estándares fueron utilizados para calcular la cantidad de proteína presente en las muestras mediante un análisis de regresión con la aplicación informática GraphPad Prism 3.0 (San Diego, California, EE.UU). Finalmente, los niveles de BDNF obtenidos en pg/ml fueron divididos por los mg/ml de proteína, de manera que los resultados de los niveles de BDNF fueron expresados en relación a los niveles totales de proteína.

10. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES GLUCOCORTICOIDEOS (GR Y MR) HIPOTALÁMICOS E HIPOCAMPALES Y DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS EN EL HIPOCAMPO (5-HT_{1A} Y 5-HT₄)

En todos los procedimientos que se describen a continuación se tomaron todas las medidas de esterilidad pertinentes con el fin de evitar la contaminación de las muestras. Así mismo, todo el material plástico utilizado está fabricado libre de ARNasa y ADNasa.

- **Extracción de ácido ribonucleico (ARN) en tejido hipocampal e hipotalámico:** cada muestra de tejido cerebral fue homogenizada (Homogenizador T10 Basic Dispenser, IKA Crushing) utilizando 1 ml de Trizol (Invitrogen, Barcelona, España) en un tubo con capacidad para 2 ml. A continuación las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente y trascurrido este periodo fueron centrifugadas a 11900 xg durante 15 minutos a 4°C (Miofuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter). El sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo con capacidad para 1.5 ml y se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, España). Esta mezcla fue agitada vigorosamente en posición vertical durante 2 minutos, y para ello, se utilizó un agitador (Vortex Genie-2, Scientific Industries). Tras la agitación, se dejó reposar las muestras durante 3 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 11900 xg durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se obtuvo un precipitado con tres fases. En la superficie se observa una fase acuosa que contiene el ARN de las muestras. En segundo lugar, una interfase de color blanco que contiene el ADN, y finalmente, en el fondo, una fase orgánica de color rosa compuesta fundamentalmente por proteínas. La fase acuosa de la superficie fue transferida a un nuevo tubo con capacidad para 1.5 ml y se le añadieron 200 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, España). El resto de las fases fueron desechadas. La fase acuosa con el isopropanol fue agitada vigorosamente en el vortex (Vortex Genie-2, Scientific Industries) se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 11900 xg durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se reserva el pellet al que se le añade, en el mismo tubo, 1 ml de Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania), que previamente había sido diluido al 75% con agua libre de ARNasa y ADNasa (Ambion Inc.). Tras comprobar que el tubo está cerrado correctamente, se invierte para que el pellet se suelte de la pared del tubo. Seguidamente, las muestras se centrifugaron por última vez a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se dejó

secar el pellet. Finalmente, se añadieron 10 µl de agua libre de ARNasa y ADNasa y las muestras fueron almacenadas a -70°C.

- **Valoración de la calidad y la cantidad de ARN de las muestras procesadas por espectrofotometría:** resulta recomendable conocer tanto la calidad como la cantidad del ARN obtenido antes de realizar el análisis de los ácidos nucleicos. Para ello, en la cubeta del espectrofotómetro (Biomate 3. Thermo Fisher Scientific., Alcobendas, España), se añadieron 99 µl de Tris EDTA (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) y 1 µl de la muestra y se midió la absorbancia a dos longitudes de onda: 260 nm y de 280 nm. Así, se obtuvieron dos datos:

-La calidad de las muestras: mediante la división entre los valores de absorbancia obtenidos a las diferentes longitudes de onda (A_{260}/A_{280}) se obtuvo un índice que nos indicó la calidad de nuestras muestras. Las muestras mostraron valores comprendidos entre 1,8 y 2. Índices menores indicarían la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes.

-La cantidad de ARN en las muestras: ésta fue calculada teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 40 mg/ml de ARN, por lo que se aplicó la siguiente fórmula para cada muestra: $(A_{260} \times 100 \times 40)/1000 =$ cantidad de ARN en µg/ml.

Por último, considerando que lo adecuado es que todas las muestras partan de la misma cantidad de ARN en el proceso de amplificación, todas ellas fueron ajustadas a la misma concentración en un volumen de 8 µl utilizando la cantidad de agua libre de ARNasa y ADNasa necesaria para cada caso, en tubos térmicos para PCR. La concentración elegida la determinó la muestra que presentaba menor cantidad de ARN. Así mismo, necesariamente esta concentración debe situarse en un rango comprendido entre 0.5 ng/µl y 5 µg/µl. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta el siguiente procedimiento.

- **Tratamiento con ADNasa I:** a la hora de extraer el ARN, también se pueden extraer trazas de ADN que pueden dar lugar a falsos positivos en el proceso de transcripción reversa, debido a la amplificación del ADN genómico o incluso a la de pseudogenes. Por ello, las muestras fueron tratadas con un kit de ADNasa I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, Barcelona, España), para purificar el ARN de las muestras, y se procedió tal y como se describe a continuación. Las muestras fueron sacadas del congelador y se mantuvieron en hielo durante el proceso. A los 8 µl de muestra se le añadieron 2 µl de una mezcla compuesta por 1 µl de la

enzima ADNasa y 1 μ l de un tampón diluyente específico. Posteriormente, las muestras (10 μ l) fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C en la PCR. Tras la incubación a las muestras se les añadió 1 μ l de EDTA 50mM (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) y se volvieron a incubar durante 10 minutos a 37°C. Completado el proceso, las muestras (11 μ l) fueron almacenadas a -70°C.

- **Reacción de la cadena de polimerasa en transcripción Reversa:** El análisis por RT-PCR se realizó en dos etapas, primeramente se realizó la retrotranscripción del ARN y posteriormente se realizó el proceso de amplificación, tal y como se explica a continuación. Sin embargo, antes de determinar la expresión génica es necesario seleccionar, diseñar y fabricar los cebadores directos e inversos de cada gen a analizar. Para obtener la secuencia genómica de los genes a analizar se utilizó la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Una vez obtenida la secuencia, se procedió a la selección y al diseño de los cebadores utilizando el programa informático Primer Express 3.0 de Applied Biosystems. La fabricación de los cebadores se le encargó a Applied Biosystems. Los cebadores son entregados por la casa comercial en estado liofilizado en una concentración de 10 nM, por lo que es necesario reconstituirlos añadiendo agua libre de ARNasa y ADNasa consiguiendo una concentración final de 13 μ M.

-Retrotranscripción del ARN: En este proceso todo el ARN de las muestras se transcribió a ADNC (ADN complementario). En primer lugar a los 11 μ l de las muestras se les añadió 2 μ l de una mezcla compuesta por 1 μ l de cebadores hexaméricos aleatorios (Random Primers, Invitrogen, Barcelona, España) y 1 μ l de nucleósidos 5'-trifosfato 200mM (dATP-dCTP-dGTP-dUTP, Invitrogen, Barcelona, España). Posteriormente, las muestras (13 μ l) fueron incubadas durante 5 minutos a 65°C en la PCR. Seguidamente las muestras se metieron durante 1 minuto en el congelador a -20°C. Tras sacar las muestras del congelador a éstas se les añadió 6 μ l de otra mezcla compuesta por 2 μ l de DTT 20mM (ditiotreitól, Invitrogen, Barcelona, España) y 4 μ l de un tampón específico (Invitrogen, Barcelona, España). En este caso la incubación será de 2 minutos a 65°C. Finalmente, a cada muestra (19 μ l) se le añade 1 μ l de la enzima transcriptasa inversa (SuperScript II, Invitrogen, Barcelona, España). A continuación, las muestras se introducen en la PCR y se pone en marcha la reacción de retrotranscripción en las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 50 minutos, 70°C durante 15 minutos y finalmente la muestra alcanza 4 °C, en ese momento las muestras fueron almacenadas a -20°C.

-Amplificación del ADNc: Una vez obtenido el ADNc mediante transcripción reversa, se determinó la expresión génica de los parámetros elegidos mediante PCR a tiempo real (PCR 7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, Madrid, España). Para ello, se emplearon microplacas de 96 pocillos específicas para PCR y en cada pocillo se añadieron 25 μ l de la siguiente reacción: 10 μ l de agua libre de ARNasa y ADNasa, 13 μ l de QuantiTect® SYBER® Green PCR como fluorocromo (Qiagen Iberia S.L., Madrid, España), 1 μ l del cebador directo y 1 μ l del cebador inverso, ambos específicos de cada gen analizado (Tabla M1). Una vez completada la placa, se añadió 1 μ l del ADNc de las muestras por triplicado. La placa fue sellada y centrifugada a 400 xg durante 3 minutos a 20°C. Tras la centrifugación, la placa se introdujo en la PCR y se dio comienzo al proceso de amplificación. Las condiciones de tiempo y temperatura utilizados fueron las mismas para todos los genes, excepto la temperatura de fusión (Tf) que es específica para cada gen ^(a) en Tabla M1). Así, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de 15 minutos a 95°C y a continuación 40 ciclos de amplificación (25 segundos a 94°C, 30 segundos a Tf, 30 segundos a 72°C).

Mediante este último proceso se determinó la expresión génica de los MR, GR, 5-HT_{1A}-R, 5-HT₄-R y GAPDH en el hipocampo y la de los MR, GR y GAPDH en el hipotálamo (Tabla M1). El GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) se utilizó como gen endógeno de control.

- **Valoración de los resultados:** la medida de la expresión génica del ARNm por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa que se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar y el gen endógeno de control. Para ello se utilizan los valores Ct que corresponden al número de ciclos que han sido necesarios para que se produzca un incremento significativo de la fluorescencia durante la reacción. La cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc de partida. Así, teniendo en cuenta los valores Ct se aplicó la siguiente fórmula matemática descrita por Pfaffl (2001): Expresión génica (ARNm) del Gen X = $2^{-\Delta C} T$ Gen X / $2^{-\Delta C} T$ Gen GAPDH.

GEN	Tf ^(a)	Secuencia del cebador DIRECTO	Secuencia del cebador INVERSO
Receptor serotoninérgico 5-HT _{1A}	58,5 °C	5'-CTg TgC ACT TCg TCC AT-3'	5'-ggT Cgg TgA TTg CCC AgT AC-3'
Receptor serotoninérgico 5-HT ₄	59 °C	5'-CAC ACA TCg CAT gAg gAC AgA-3'	5'-gCA gCC CAT gAT gAC ACA TAA-3'
Receptor mineralocorticoideo (MR)	58 °C	5'-ACC TgC AgA gAg gAC CAA TgA-3'	5'-ggA gTA ATT CgT gTT TTT CTT TgC T-3'
Receptor glucocorticoideo (GR)	58,5 °C	5'-CCC ATg gAg gTA gCg ATT gT-3'	5'-TgT AAA ggC TgC CCA ATg TgT-3'
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	58 °C	5'-Tgg CCT CCA Agg AgT AAg AAA C-3'	5'-ggg ATA ggg CCT CTC TTg CT-3'

Tabla 1M. Secuencia de los cebadores, directos e inversos, utilizados para la amplificación de los genes: 5-HT_{1A}, 5-HT₄, MR, GR y GAPDH.

5'-.....-3' *dirección de los cebadores*

Tf^(a) *Temperatura de fusión*

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis que se presentan a continuación se realizaron con el programa de análisis estadístico SPSS 15.0, para el entorno operativo Windows XP (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU). En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor $p \leq 0.05$ y los valores representan la media \pm el error estándar de la media (E.E.M). Para las comparaciones múltiples o *pos hoc* se utilizó la prueba de Tukey HSD para muestras desiguales y para las correlaciones bivariadas el coeficiente de correlación de Pearson.

- **EXPERIMENTO 1:** Para el establecimiento y caracterización de las estrategias de afrontamiento del estrés social crónico en el primer experimento se realizó una combinación de análisis cluster y análisis discriminante. Para el análisis cluster se aplicó el Método de conglomeración de Ward. Con el objetivo de estudiar y confirmar la bondad de los cluster obtenidos se realizaron un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y un análisis discriminante utilizando el método de inclusión por pasos *Lambda de Wilks*. El efecto del estrés social crónico sobre la prueba de natación forzada y sobre las variables fisiológicas se analizó mediante un ANOVA de un factor. Para el análisis de los niveles de corticosterona a lo largo del estrés social se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas.

- **EXPERIMENTO 2:** Para el establecimiento y caracterización de las diferentes estrategias de afrontamiento se realizó un análisis discriminante, utilizando la función discriminante obtenida en el primer experimento. La comparación entre las diferentes estrategias de afrontamiento en función del tiempo se realizó mediante un ANOVA de tres factores con medidas repetidas. El efecto del estrés social y el tratamiento con RS 67333 sobre las conductas manifestadas en la prueba de natación forzada y las diferentes variables fisiológicas se analizó mediante un ANOVA de dos factores. En el caso de la corticosterona, se realizó un ANOVA de tres factores con medidas repetidas.

IV. RESULTADOS

1

RESULTADOS EXPERIMENTO 1:
Estrategias de afrontamiento en respuesta
al estrés social crónico por derrota y
cambios en los niveles de corticosterona,
BDNF y sistema inmunitario

1.1. Análisis de las diferencias individuales en el afrontamiento conductual al estrés social crónico por derrota

Teniendo en cuenta que sólo el grupo de sujetos estresados es susceptible de ser evaluado y analizado conductualmente, se procedió a agrupar a los sujetos en función de las características conductuales manifestadas durante el conflicto social del día 21. Para ello, se realizó un análisis de cluster utilizando el porcentaje medio de tiempo dedicado a cada una de las conductas evaluadas y se obtuvieron dos grupos o conglomerados de sujetos derrotados, cluster 1 y cluster 2, con diferentes características conductuales. Para conocer las diferencias que presentan las variables conductuales en cada uno de los clusters obtenidos, se realizó un análisis de la varianza (Tabla R1). Ambos grupos mostraron diferencias significativas en las conductas de: *Defensa-Sumisión* ($F_{[1,55]} = 36.082$; $p < 0.02$), *Autoaseo-Escarbar* ($F_{[1,55]} = 6.083$; $p < 0.02$), *Evitación-Huida* ($F_{[1,55]} = 6.795$; $p < 0.02$), *Exploración a distancia* ($F_{[1,55]} = 11.153$; $p < 0.01$), *Exploración no social* ($F_{[1,55]} = 27.972$; $p < 0.0001$), *Inmovilidad* ($F_{[1,55]} = 58.982$; $p < 0.0001$).

Tabla R1. Porcentaje medio de tiempo (\pm E.E.M.) dedicado a cada una de las conductas analizadas en función del Cluster de pertenencia.

Conducta Social (Día 21)	Cluster 1 ACTIVO (n = 34)	Vs.	Cluster 1 PASIVO (n = 22)
Autoaseo-Escarbar	2.425 \pm 0.753	>*	0.185 \pm 0.095
Defensa-Sumisión	6.745 \pm 1.505	<*	10.694 \pm 1.505
Evitación-Huida	5.855 \pm 0.287	<*	7.208 \pm 0.465
Exploración a Distancia	33.515 \pm 1.882	>**	24.414 \pm 1.831
Exploración No Social	20.898 \pm 1.527	>***	9.883 \pm 1.184
Exploración Social	1.782 \pm 1.156	>	0
Inmovilidad	28.777 \pm 1.654	<***	47.593 \pm 1.723

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Para confirmar la validez estadística de los dos grupos obtenidos y determinar las variables conductuales más eficientes a la hora de discriminar entre ambos grupos, se aplicó un análisis discriminante utilizando el método de *Lambda de Wilks* de inclusión por pasos. La conducta de *inmovilidad* resultó ser la variable conductual que mejor discriminó entre los dos grupos, ya que fue la primera en ser seleccionada para su inclusión en el modelo discriminante. En una segunda fase del procedimiento por pasos, el modelo explicativo fue incluyendo sucesivamente las conductas de *defensa-sumisión*, *exploración social* y *exploración no social*, incrementando así la discriminación entre los dos grupos. El resto de conductas no fueron

incluidas dentro del modelo explicativo debido a que no contribuyeron significativamente en esa discriminación, en función de los valores *Lambda de Wilks* (Tabla R2).

Tabla R2. Resumen del Análisis Discriminante

Variables incluidas en el análisis	Etapa	Valor ^(a)	F		
		Lambda	para entrar	Significación	Función ^(b)
Inmovilidad	1	0.46	63.342	0.000	1.287
Defensa-Sumisión	2	0.374	44.419	0.000	0.734
Exploración Social	3	0.281	44.445	0.000	-0.819
Exploración No Social	4	0.258	36.658	0.000	-0.346

En cada etapa se introduce la variable que minimiza la Lambda de Wilks Global (F mínima para entrar: 3.84; F máxima para salir: 2.71)

^(a) La Lambda de Wilks es un estadístico que expresa el poder de discriminación del modelo.

Su valor está comprendido entre 0 y 1. Un valor de Lambda cercano a cero significa poder perfecto de discriminación. En esta columna se expresa su valor en el proceso iterativo, después de que la respectiva variable conductual ha entrado en el modelo.

^(b) Coeficiente estandarizado de la función discriminante.

El análisis discriminante también mostró una función discriminante, altamente significativa ($p < 0.0001$) que contribuye a la descripción y clasificación de los grupos. Los coeficientes estandarizados de esta función discriminante revelan que el cluster 1 lo caracterizan las conductas de *Exploración social* y *Exploración no social*, mientras que al cluster 2 lo describen las conductas de *Defensa-Sumisión* e *Inmovilidad*. Esta función discriminante también fue utilizada para confirmar la validez de los clusters obtenidos. Así, las estimaciones del modelo discriminante aplicado coinciden en el 97,6 % de los casos con la clasificación realizada por el análisis de conglomerados jerárquicos (Tabla R3).

Tabla R3. Matriz de clasificación para el análisis discriminante de dos grupos.

	n real	Grupo de pertenencia pronosticado		% Correctos
		Grupo 1	Grupo 2	
Cluster 1	34	32	2	94.1 %
Cluster 2	22	1	21	95.5 %
n predicha		33	22	94.6 %

Finalmente, una vez confirmada la descripción de los grupos mediante el análisis de la varianza y la función discriminante, procedimos a caracterizar los dos grupos de la siguiente manera (Figura R1):

Cluster 1 (n= 34): Este grupo está formado por los sujetos que exhiben bajos niveles de inmovilidad y altos niveles de conductas exploratorias, especialmente de la conducta de

Exploración no social. Además, todos aquellos sujetos que mostraron la conducta de *Exploración social* fueron clasificados en este grupo. Teniendo en cuenta estas características conductuales, este cluster agrupa a los sujetos que responde ante el estrés crónico por derrota con una estrategia de afrontamiento activa.

Cluster 2 (n= 22): Este otro grupo lo componen aquellos sujetos que frente a un oponente agresivo responden fundamentalmente con conductas de *Defensa-Sumisión*, además de permanecer la mayoría del tiempo inmóvil. Así, este segundo cluster agrupa a los sujetos que responden ante el estrés crónico por derrota con una estrategia de afrontamiento pasiva.

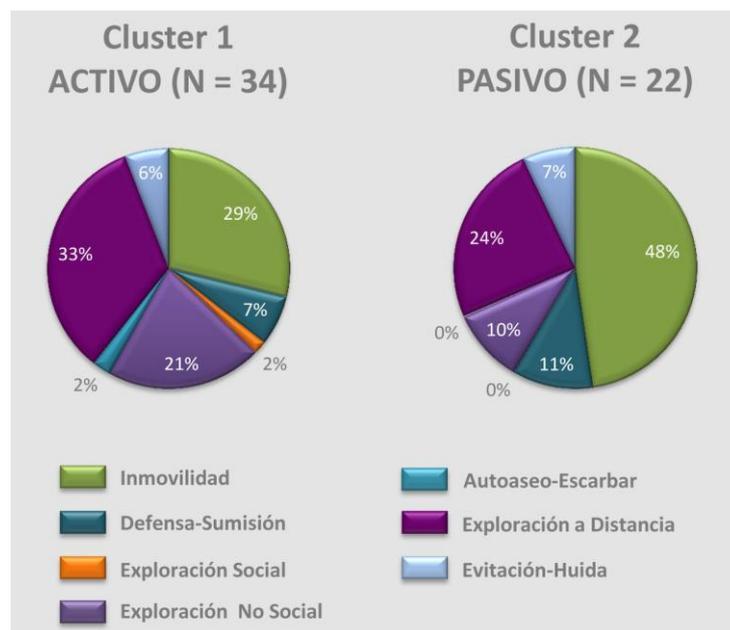


Figura R1. Clasificación de los sujetos en función del porcentaje de tiempo dedicada a cada una de las variables conductuales analizadas el día 21 de estrés social crónico en el experimento 1.

1.2. Estudio de la estabilidad de las estrategias de afrontamiento

Con el objetivo de determinar la estabilidad conductual de los grupos, activo y pasivo, obtenidos al final del periodo de estrés crónico, se volvió a aplicar un análisis discriminante con la conducta social correspondiente al día 11 de estrés. El resultado fue que el 67,9% de los casos estaban correctamente clasificados, siendo la *Inmovilidad* la conducta que más contribuía a la

discriminación entre los dos grupos. Concretamente, el 68,2% de los pasivos y el 67,6% de los activos ya estaban correctamente clasificados.

1.3. Efecto de las estrategias de afrontamiento del estrés social crónico por derrota sobre el sistema neuroendocrino

1.3.1. Niveles de corticosterona en plasma 40 minutos después de la derrota de los días 3, 11 y 21

Cuando se analizaron los datos de los niveles de corticosterona después de la derrota (días 3, 11 y 21), el ANOVA de dos factores (*tiempo de estrés* y *grupo*) con medidas repetidas, únicamente mostró un efecto significativo para el factor *grupo* ($F_{[2,61]} = 37.085$; $p < 0.0001$). Así, se observó que tanto los sujetos pasivos como los sujetos activos tenían mayores niveles de corticosterona en plasma que los sujetos control manipulados los días 3, 11 y 21 ($p < 0.0001$; en todos los casos), y que no hubo diferencias entre los sujetos pasivos y activos los días 3 y 11. Sin embargo, el último día de estrés social (día 21), los sujetos pasivos mostraron una mayor concentración de corticosterona que los sujetos activos ($p < 0.02$; Figura R2).

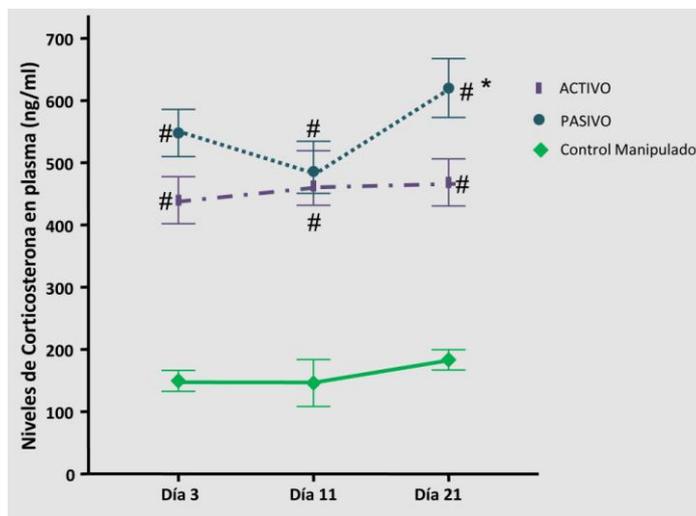


Figura R2. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción submandibular 40 minutos después de las derrotas de los días 3, 11 y 21, de los sujetos activos (■), sujetos pasivos (●) y controles manipulados (◆).
respecto a los controles manipulados $p < 0.001$
* respecto a los sujetos activos $p < 0.05$

1.3.2. Niveles de corticosterona en plasma 3 días después de la última derrota

Cuando se analizaron los niveles de corticosterona el ANOVA de un factor mostró diferencias significativas entre los *grupos* ($F_{[2,65]} = 5.486$; $p < 0.01$). Concretamente, los análisis *pos hoc* revelaron que los sujetos pasivos tenían una menor concentración de corticosterona que los controles manipulados ($p < 0.01$). Los sujetos activos no mostraron diferencias en comparación con los sujetos pasivos y los controles manipulados (Figura R3).

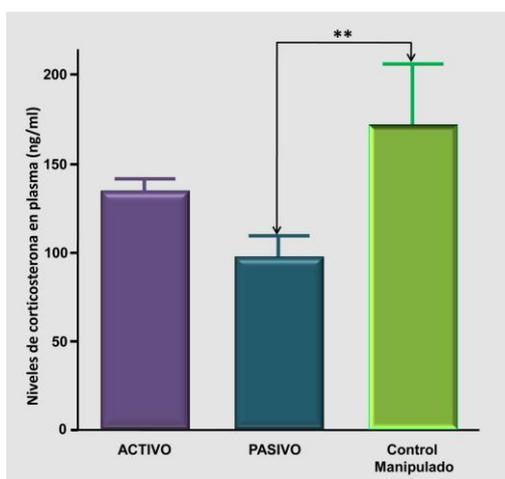


Figura R3. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción cardiaca 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. ** $p < 0.01$.

1.4. Efecto de las estrategias de afrontamiento del estrés social crónico por derrota sobre el sistema inmunitario

1.4.1. Capacidad proliferativa de las células mononucleares del bazo

El estudio de la capacidad proliferativa reveló un efecto significativo del factor *grupo* tanto en el caso de los linfocitos T ($F_{[2,66]} = 3.213$; $p < 0.05$) como en el caso de los linfocitos B ($F_{[2,66]} = 3.883$; $p < 0.03$). En cuanto a los linfocitos T, la comparación entre los grupos mediante el análisis *pos hoc* mostró, que los sujetos pasivos tenían un menor índice de proliferación (IP) que los sujetos activos ($p < 0.05$), y que los sujetos pasivos y activos no eran diferentes a los controles manipulados. Con respecto a los linfocitos B, el análisis *pos hoc* mostró que los sujetos pasivos

tenían un menor índice de proliferación (IP) que los controles manipulados ($p < 0.05$). Los sujetos activos no mostraron diferencias con respecto a los sujetos pasivos y controles manipulados en esta media (Figura R4).

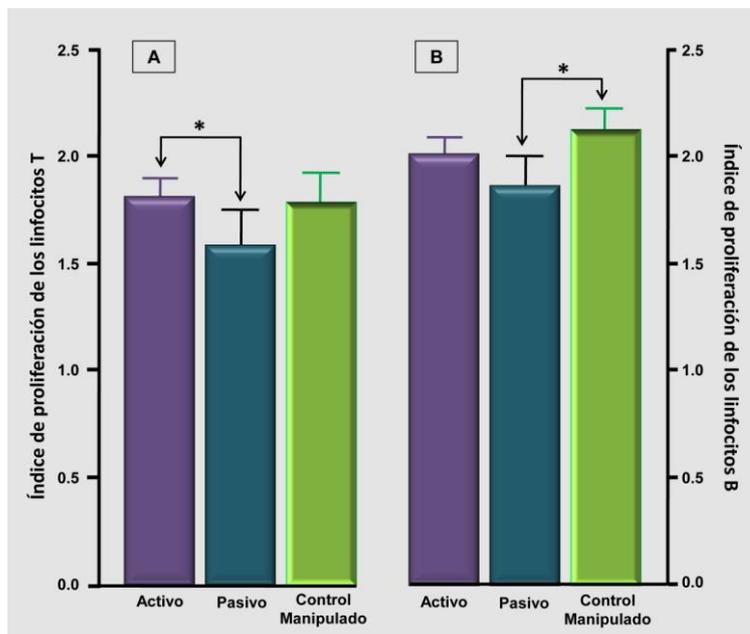


Figura R4. Índices medios (\pm E.E.M.) de proliferación de los linfocitos T [A] y los linfocitos B [B] 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * $p < 0.05$.

1.4.2. Niveles de IL-6 y TNF- α en el bazo

El análisis de los datos mostró un efecto significativo del factor *grupo* en el caso de las dos citocinas: IL-6 ($F_{[2,62]} = 8.239$; $p \leq 0.001$) y TNF- α ($F_{[2,63]} = 15.272$; $p < 0.001$). Cuando se realizó el análisis *pos hoc* para conocer las diferencias en los niveles de IL-6 entre los tres grupos, se observó que los sujetos pasivos tenían mayores niveles que los sujetos activos ($p < 0.03$) y los controles manipulados ($p \leq 0.001$). No se encontraron diferencias entre los sujetos activos y controles manipulados en los niveles de esta citocina. En el caso del TNF- α , el análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos tenían mayores niveles que los sujetos activos ($p < 0.04$) y los controles manipulados ($p < 0.0001$). Además, los sujetos activos también mostraron mayores niveles de esta citocina con respecto a los controles manipulados ($p \leq 0.001$; Figura R5).

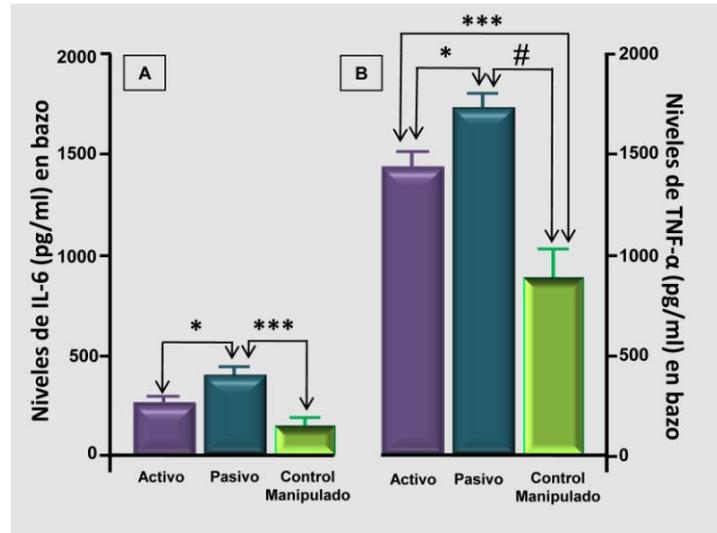


Figura R5. Niveles medios (\pm E.E.M.) de IL-6 [A] y TNF- α [B] 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. # $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

1.5.Efecto de las estrategias de afrontamiento del estrés crónico por derrota sobre los niveles de proteína BDNF hipocampales

El análisis de los datos mostró un efecto significativo para el factor *grupo* ($F_{[2,62]} = 5.239$; $p < 0.01$). La comparación entre los tres grupo mediante un análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos tenían menores niveles de proteína BDNF en el hipocampo que los sujetos activos ($p \leq 0.01$) y los controles manipulados ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias entre los sujetos activos y los controles manipulados (Figura R6).

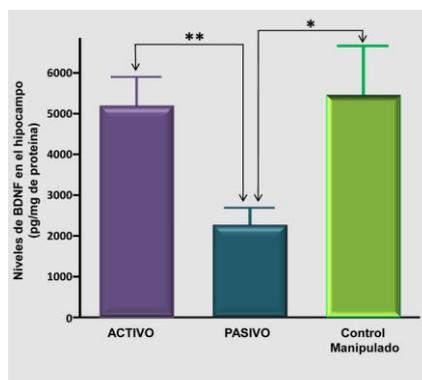


Figura R6. Niveles medios (\pm E.E.M.) de proteína BDNF hipocampal 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. ** $P < 0.01$; * $p < 0.05$.

1.6.Efecto de las estrategias de afrontamiento sobre la conducta en la prueba de natación forzada

El análisis de la varianza de los datos obtenidos el segundo día de la prueba de natación forzada mostró un efecto significativo en la *latencia de inmovilidad* ($F_{[2,65]} = 3.815$; $p < 0.03$). El análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos tuvieron una menor latencia de inmovilidad que los controles manipulados ($p < 0.03$), y no mostró diferencias en el caso de los sujetos activos (Figura R7). En el resto de las variables conductuales analizadas no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (tiempo total dedicado a la inmovilidad, la natación y la conducta de escalada).

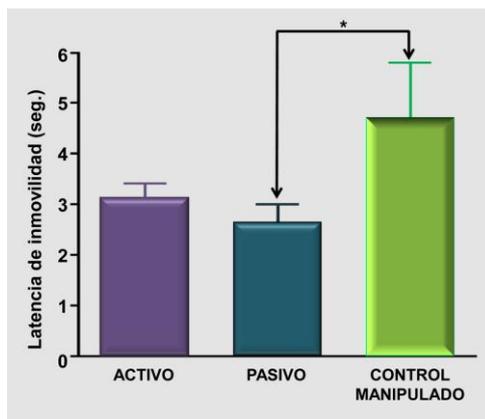


Figura R7. Niveles medios (\pm E.E.M.) de la latencia de inmovilidad en la prueba de natación forzada 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * $p < 0.05$.

1.7.Relaciones entre las variables conductuales y fisiológicas

El estudio de las correlaciones entre las variables conductuales y fisiológicas mostró que los niveles de corticosterona en plasma del día 21 correlacionaban positivamente con la conducta de *inmovilidad* ($r = 0.332, p = 0.014$) y negativamente con la conducta de *exploración no social* ($r = -0.416, p = 0.002$) del mismo día. También se encontró una relación positiva entre los niveles de corticosterona obtenidos 3 días después de la última derrota y la *latencia de inmovilidad* en la prueba de natación forzada ($r = 0.470, p \leq 0.0001$). Cuando se estudiaron las variables conductuales e inmunitarias, los niveles de ambas citocinas correlacionaron positivamente con la conducta de *inmovilidad* del día 21 (IL-6: $r = 0.327, p = 0.018$; TNF- α : $r = 0.4, p = 0.003$). Los niveles de TNF- α también correlacionaron negativamente con las conductas de *exploración social* ($r = -0.304, p = 0.027$) y *exploración no social* ($r = -0.389, p = 0.004$), ambas del día 21. Finalmente, se encontró una correlación negativa entre los niveles de BDNF hipocampales y la conducta de inmovilidad del día 21 ($r = -0.316, p = 0.021$) (Tabla R4).

El estudio de las relaciones entre las diferentes medidas fisiológicas mostró una correlación positiva entre las concentraciones de corticosterona (CORT) obtenidas en diferentes momentos: los días 3, 11 y 21 tras la derrota (CORT Día 3-CORT Día 11: $r = 0.618, p \leq 0.0001$; CORT Día 3-CORT Día 21: $r = 0.524, p \leq 0.0001$; CORT Día 11-CORT Día 21: $r = 0.520, p \leq 0.0001$). Además, también se observó que la concentración de corticosterona del día 21 correlacionaba positivamente con los niveles esplénicos de TNF- α ($r = 0.515, p \leq 0.0001$) e IL-6 ($r = 0.316, p = 0.006$). También se encontró una relación negativa entre los niveles de IL-6 y los índices de proliferación de ambas líneas linfocíticas: linfocitos T ($r = -0.406, p = \leq 0.0001$) y linfocitos B ($r = -0.462, p = \leq 0.0001$). Finalmente, no se encontró ninguna relación significativa entre los niveles de BDNF hipocampales y otras variables fisiológicas (Tabla R5).

Tabla R4. Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 1.

	CORT Día 21	CORT Día 24	TNF- α	IL-6	BDNF	Inmovilidad	Exploración No social	Exploración Social	Latencia Inmovilidad
CORT Día 21	-	-0.11	0.52**	0.32**	-0.08	0.33*	-0.42**	-0.22	-0.18
CORT Día 24	-0.11	-	-0.17	-0.22	-0.04	-0.30*	0.15	0.14	0.47**
TNF- α	0.52**	-0.17	-	0.55**	0.04	0.40**	0.39**	-0.30*	-0.14
IL-6	0.32**	-0.22	0.55**	-	0.02	0.33**	-0.18	-0.22	-0.32**
BDNF	-0.08	-0.04	0.04	0.02	-	-0.32**	0.13	-0.12	-0.21
Inmovilidad	0.33*	-0.30*	0.40**	0.33**	-0.32**	-	-0.51**	-0.47**	-0.35*
Exploración No Social	-0.42**	0.15	0.39**	-0.18	0.13	-0.51**	-	0.32*	-0.1
Exploración Social	-0.22	0.14	-0.30*	-0.22	-0.12	-0.47**	0.32*	-	0.17
Latencia Inmovilidad	-0.18	0.47**	-0.14	-0.32**	-0.21	-0.35*	0.17	-0.1	-

(CORT Día 21 = Corticosterona del día 21 tras la derrota; CORT Día 24 = Corticosterona tres días después de la derrota; Inmovilidad; Exploración No Social y Exploración social = conductas manifestadas durante la confrontación del día 21; Latencia Inmovilidad= latencia de inmovilidad en la prueba de natación forzada).

* p < 0.05

** p < 0.01

Tabla R5. Correlaciones bivariadas entre las variables fisiológicas del experimento 1.

	IP linfocitos T	IP linfocitos B	TNF- α	IL-6	CORT Día 3	CORT Día 11	CORT Día 21	CORT Día 24	BDNF
IP linfocitos T	-	0.67**	-0.11	-0.41**	0.08	-0.02	-0.07	-0.16	0.07
IP linfocitos B	0.67**	-	-0.13	-0.46**	0.08	-0.04	0.01	0.09	0.01
TNF- α	-0.11	-0.13	-	0.55**	0.43**	0.37**	0.52**	-0.17	0.04
IL-6	-0.41**	-0.46**	0.55**	-	0.26*	0.16	0.32**	-0.22	-0.02
CORT Día 3	0.08	0.08	0.43**	0.26*	-	0.62**	0.52**	-0.17	-0.23
CORT Día 11	-0.02	-0.04	0.37**	0.16	0.62**	-	0.52**	-0.13	-0.15
CORT Día 21	-0.07	0.01	0.52**	0.32**	0.52**	0.52**	-	-0.11	-0.08
CORT Día 24	-0.16	0.09	-0.17	-0.22	-0.17	-0.13	-0.11	-	-0.04
BDNF	0.07	0.01	0.04	-0.02	-0.23	-0.15	-0.08	-0.04	-

(IP linfocitos T = índice de proliferación de linfocitos T; IP linfocitos B = índice de proliferación de linfocitos B; CORT Día 3 = Corticosterona del día 3 tras la derrota; CORT Día 11 = Corticosterona del día 11 tras la derrota; CORT Día 21 = Corticosterona del día 21 tras la derrota; CORT Día 24 = Corticosterona 3 días después de la última derrota).

* p < 0.05

** p < 0.01

RESULTADOS EXPERIMENTO 2:
Estrategias de afrontamiento
en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios
en los receptores de glucocorticoides (MR y GR) y en los
receptores serotoninérgicos postsinápticos (5-HT_{1A} y 5-HT₄).
Efectos del tratamiento a corto plazo con el RS 67333

2.1. Análisis de las diferencias individuales en el afrontamiento conductual del estrés social crónico por derrota y el efecto de la administración del RS 67333

En este segundo experimento se aplicó nuevamente un análisis discriminante con el objetivo de clasificar a los sujetos en función de su estrategia de afrontamiento, activa o pasiva, al estrés crónico por derrota asignándolos a grupos preexistentes. Para ello, se realizó el análisis discriminante empleando la función discriminante obtenida en el primer experimento y teniendo en cuenta el porcentaje de tiempo dedicado a cada una de las conductas analizadas durante la confrontación social del día 18. Una vez que los animales fueron asignados a los diferentes grupos se procedió a la caracterización conductual de los mismos (Figura R8). El análisis discriminante reveló que la conducta de *Exploración no social* fue la variable conductual que mejor discriminó entre los dos grupos, seguida por las conducta de *Autoaseo-Escarbar*. Cuando se realizó un análisis de la varianza de tres factores (tiempo, grupo y tratamiento) con medidas repetidas mostró diferencias significativas para el factor grupo ($F_{[2,57]} = 9.818$; $p < 0.0001$) y para la interacción tiempo x grupo ($F_{[1,57]} = 4.565$; $p < 0.0001$). No se halló un efecto significativo del tratamiento farmacológico.

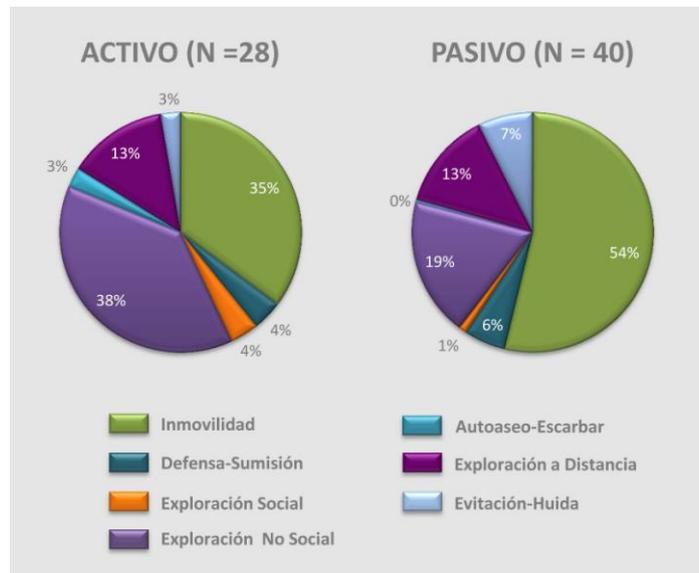


Figura R8. Clasificación de los sujetos en función del porcentaje de tiempo dedicada a cada una de las variables conductuales analizadas el día 18 de estrés social crónico en el experimento 2.

En cuanto al factor *grupo*, por un lado, el análisis de la varianza señaló que el día 18 de estrés social los sujetos pasivos, en relación a los activos, mostraron mayores niveles de *inmovilidad* ($F_{[1,67]} = 56.477$; $p < 0.0001$) y de *evitación-huida* ($F_{[1,67]} = 18.321$; $p < 0.0001$) y menores niveles de conductas de *autoaseo-escarbar* ($F_{[1,67]} = 6.728$; $p < 0.02$), de *exploración no social* ($F_{[1,67]} = 107.107$; $p < 0.0001$) y *exploración social* ($F_{[1,67]} = 7.252$; $p < 0.01$). Por otro lado, el día 21 de estrés social los sujetos pasivos en comparación con los activos mostraron mayores niveles de *inmovilidad* ($F_{[1,67]} = 4.566$; $p < 0.0001$) y menos niveles de *exploración no social* ($F_{[1,67]} = 10.274$; $p < 0.0001$) y *exploración social* ($F_{[1,67]} = 4.441$; $p < 0.0001$).

El análisis de la interacción (*tiempo x grupo*), por un lado, mostró que los sujetos activos aumentaron la conducta de *exploración no social* ($F_{[1,27]} = 4.195$; $p \leq 0.05$) del día 18 al 21 de estrés social. Por otro lado, los pasivos aumentaron la conducta de *inmovilidad* ($F_{[1,38]} = 27.547$; $p < 0.0001$) mientras que disminuyeron la conducta de *exploración no social* ($F_{[1,38]} = 17.990$; $p < 0.0001$), del día 18 al 21 de estrés social (Tabla R6).

Tabla R6. Porcentaje medio de tiempo (\pm E.E.M.) dedicado a cada una de las conductas analizadas en función del grupo de pertenencia los días 18 y 21 de estrés social crónico.

Conducta Social (Día 21)	Día 18			Día 21			Día 18 Vs. Día 21	
	ACTIVO	Vs.	PASIVO	ACTIVO	Vs.	PASIVO	ACTIVO	PASIVO
Autoaseo-Escarbar	2.64 \pm 1.04	>*	0.30 \pm 0.15	0.80 \pm 0.29	=	0.80 \pm 0.29	=	=
Defensa-Sumisión	4.06 \pm 0.92	=	5.56 \pm 0.60	3.38 \pm 0.67	=	5.13 \pm 0.57	=	=
Evitación-Huida	2.65 \pm 0.28	<***	7.37 \pm 0.41	4.26 \pm 0.58	=	6.38 \pm 0.42	=	=
Exploración a Distancia	13.46 \pm 1.44	=	13.31 \pm 1.49	14.51 \pm 1.36	=	15.16 \pm 1.36	=	=
Exploración No Social	38.30 \pm 2.82	>***	18.77 \pm 1.51	44.76 \pm 1.49	>#	12.85 \pm 1.22	>*	<†
Exploración Social	3.74 \pm 1.30	>**	1.06 \pm 0.55	4.75 \pm 1.75	>#	0.57 \pm 0.39	=	=
Inmovilidad	35.23 \pm 2.32	<***	53.95 \pm 2.51	28.02 \pm 3.49	<#	60.01 \pm 2.23	=	<***

La siguientes signos representan las diferencias entre los dos grupos el día 18 de estrés social: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

El siguiente signo representa las diferencias entre los dos grupos el día 21 de estrés social: # $p < 0.001$

El siguiente signo representa las diferencias del grupo ACTIVO entre los días 18 y 21 de estrés social: • $p < 0.001$

El siguiente signo representa las diferencias del grupo PASIVO entre los días 18 y 21 de estrés social: † $p < 0.05$; †† $p < 0.001$

2.2. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre el sistema neuroendocrino

2.2.1. Niveles de corticosterona en plasma 40 minutos después de la última derrota (día 21)

El análisis de la varianza de dos factores (*grupo y tratamiento*) únicamente mostró un efecto significativo para el factor grupo ($F_{[2,78]} = 6.944$; $p < 0.01$). Concretamente, el análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos tenían mayores niveles de corticosterona en plasma que los sujetos activos ($p < 0.02$) y controles manipulados ($p < 0.01$). No se hallaron diferencias

significativas en estos niveles de corticosterona entre los sujetos activos y los controles manipulados. No se encontró un efecto de interacción entre los factores (Figura R9).

2.2.2. Medidas repetidas de los niveles de corticosterona previos y tres días posteriores a la terminación del estrés

El ANOVA de tres factores (*tiempo*, *grupo* y *tratamiento*) con medidas repetidas mostró un efecto del factor *tiempo* ($F_{[1,80]} = 12.901$; $p \leq 0.001$) y del factor *grupo* ($F_{[2,80]} = 5.366$; $p < 0.01$), pero no del tratamiento. En el caso del factor *tiempo* el análisis reveló un aumento de los niveles de corticosterona en todos los grupos analizados y el análisis *pos hoc* reveló que el aumento fue el mismo en todos los grupos. El análisis del factor *grupo* reveló que tres días después de la última derrota los sujetos pasivos tenían menores niveles de corticosterona que los sujetos activos ($p < 0.05$) y los controles manipulados ($p < 0.04$). No se observaron diferencias entre estos últimos. El análisis no indicó diferencias entre los grupos en los niveles de corticosterona obtenidos tres días antes de la aplicación del estrés crónico. No se encontró un efecto de interacción entre los factores (Figura R10).

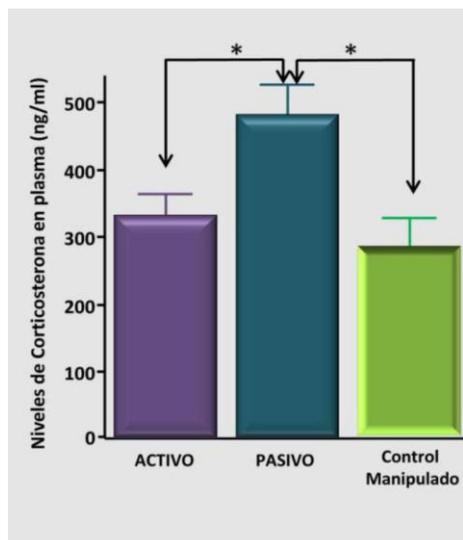


Figura R9. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos por punción submandibular 40 minutos después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * $p < 0.05$.

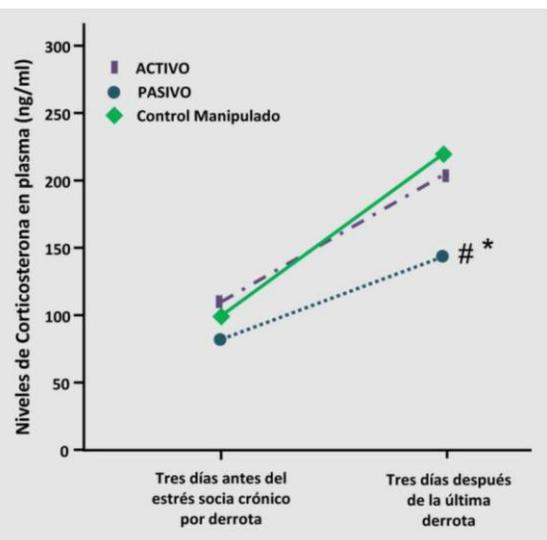


Figura R10. Niveles medios (\pm E.E.M.) de corticosterona en plasma (ng/ml) obtenidos 3 días antes y tres días después de la aplicación del estrés crónico, de los sujetos activos (■), sujetos pasivos (●) y controles manipulados (◆). # respecto a los controles manipulados $p < 0.05$; * respecto a los sujetos activos $p < 0.05$.

2.2.3. Expresión de ARNm de GRs y MRs y balance MR/GR en el hipotálamo

Por un lado, el análisis de la varianza de dos factores (*grupo* y *tratamiento*) mostró diferencias significativas en los niveles ARNm-GR en función del factor *grupo* ($F_{[2,54]} = 5.035$; $p \leq 0.01$) y del tratamiento farmacológico ($F_{[2,54]} = 6.420$; $p < 0.02$). El análisis *pos hoc* indicó que los sujetos pasivos tenían mayores niveles de ARNm-GR que los sujetos activos ($p < 0.03$) y controles manipulados ($p < 0.03$). En el caso del *tratamiento*, la administración de RS 67333 aumentó los niveles de GR ($p < 0.001$) (Figura R11). No se encontró un efecto de interacción entre los factores.

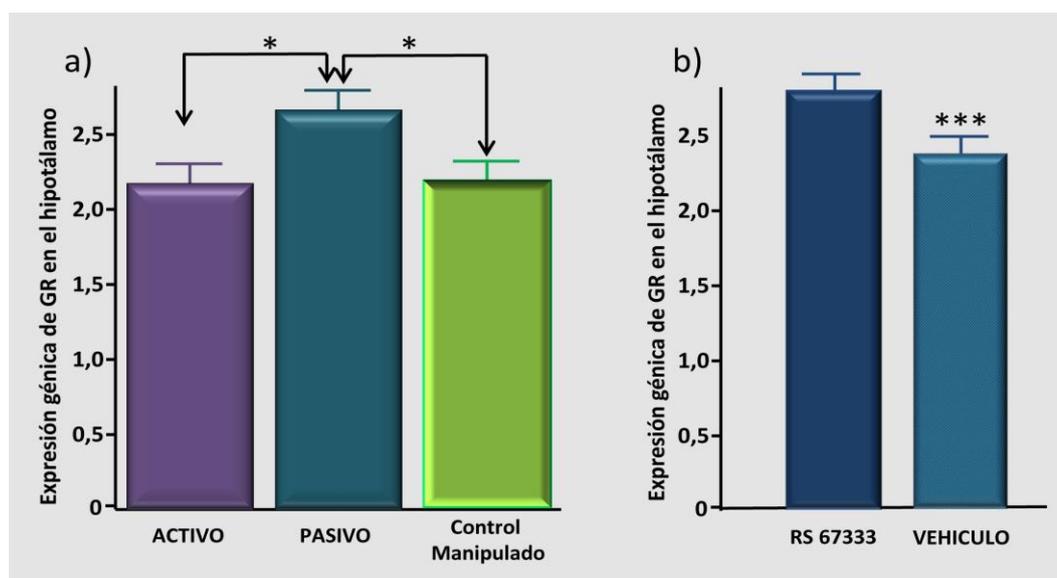


Figura R11. Niveles medios (\pm E.M.M.) de la expresión génica de GR en el hipotálamo.

- Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre la expresión génica de los GR hipotalámicos en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * $p < 0.05$.
- Se representa el efecto del tratamiento fármacológico con el RS 67333 sobre la expresión génica de los GR hipotalámicos. *** $p < 0.001$.

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm-MR en función del *tratamiento* farmacológico ($F_{[2,54]} = 80.882$; $p < 0.001$), indicando que la administración de RS 67333 redujo los niveles de ARNm-MR en comparación con la administración del vehículo ($p < 0.05$). También se observó una interacción entre los dos factores analizados (*grupo* x *tratamiento*) ($F_{[2,54]} = 4.251$; $p < 0.02$). En concreto, el análisis reveló que los sujetos activos con tratamiento tenían menores niveles de ARNm-MR que los sujetos activos sin tratamiento ($p < 0.05$), que los sujetos pasivos sin tratamiento ($p < 0.001$) y que los controles

menores niveles de ARNm-MR que los sujetos activos sin tratamiento ($p < 0.04$), que los sujetos pasivos sin tratamiento ($p < 0.001$) y que los controles manipulados sin tratamiento ($p < 0.04$). Finalmente, los sujetos pasivos sin tratamiento mostraron mayores niveles de ARNm-MR que los controles manipulados con tratamiento ($p < 0.001$) (Figura R12).

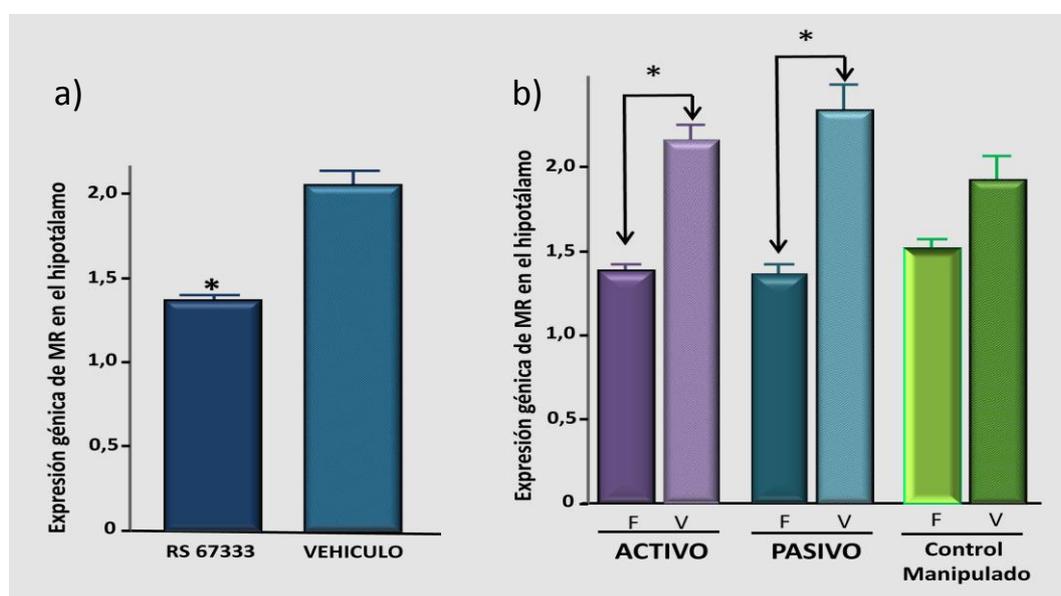


Figura R12. Niveles medios (\pm E.M.M.) de la expresión génica de MR en el hipotálamo.

- Se representa el efecto del tratamiento farmacológico con el RS 67333 sobre la expresión génica de los MR hipotalámicos. * $p < 0.05$.
- Se representa el efecto de la interacción entre el estrés crónico y el tratamiento farmacológico (F = RS 67333; V = Vehículo) sobre los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05 (se destaca el resultado de que el fármaco actúa únicamente en los sujetos estresados tanto activos como pasivos).

Respecto a la ratio MR/GR el análisis mostró un efecto del factor *grupo* ($F_{[2,54]} = 3.251$; $p < 0.05$) que indicó que los sujetos pasivos tenían la ratio disminuida en comparación con los controles manipulados ($p \leq 0.05$). No se hallaron diferencias en la ratio entre los sujetos activos y los controles manipulados. También se encontró un efecto del tratamiento sobre la ratio MR/GR ($F_{[2,54]} = 72.275$; $p < 0.001$). Concretamente, la administración del RS 67333 redujo la ratio MR/GR ($p < 0.05$) (Figura R13).

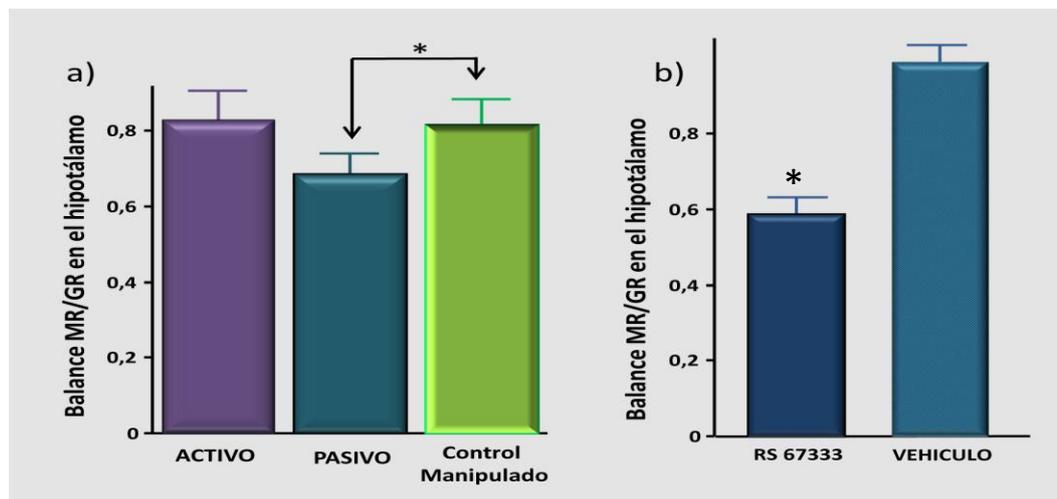


Figura R13. Niveles medios (\pm E.M.M.) del balance MR/GR en el hipotálamo.

- Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre el balance MR/GR en el hipotálamo en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * $p < 0.05$.
- Se representa el efecto del tratamiento farmacológico con el RS 67333 sobre el balance MR/GR en el hipotálamo * $p < 0.05$.

2.2.4. Expresión ARNm de GRs y MRs y balance MR/GR en el hipocampo

En el caso del ARNm-GR el análisis de la varianza de dos factores (*grupo* y *tratamiento*) únicamente mostró un efecto significativo del factor *grupo* ($F_{[2,75]} = 3.288$; $p < 0.05$) y los análisis *pos hoc* revelaron que los sujetos pasivos tenían mayores niveles de ARNm-GR que los sujetos activos ($p < 0.04$). Este análisis no mostró diferencias de los sujetos activos y pasivos con respecto a los controles manipulados (Figura R14).

En el caso del ARNm-MR sólo se observó un efecto del factor *grupo* ($F_{[2,75]} = 3.413$; $p < 0.04$) y el análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos tenían menores niveles de ARNm-MR que los sujetos activos ($p < 0.04$). No se encontraron diferencias de los sujetos activos y pasivos con respecto a los controles manipulados (Figura R15).

Finalmente, se observó un efecto del factor *grupo* respecto a la ratio MR/GR ($F_{[2,75]} = 3.632$; $p < 0.04$). Concretamente, los sujetos pasivos mostraron una disminución de la ratio en comparación con los sujetos activos ($p < 0.03$). En este caso tampoco se observaron diferencias de los sujetos activos y pasivos en comparación con los controles manipulados (Figura R16).

En ninguno de los casos se observó un efecto del tratamiento con el RS 67333 ni una interacción entre los dos factores analizados.

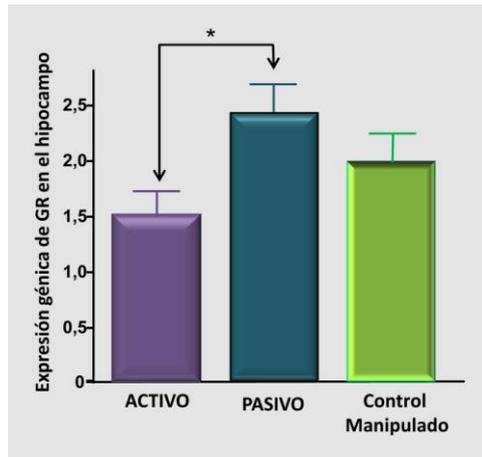


Figura R14. Niveles medios (\pm E.M.M.) de la expresión génica de GR en el hipocampo. Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre la expresión génica de los GR hipocampales en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05.

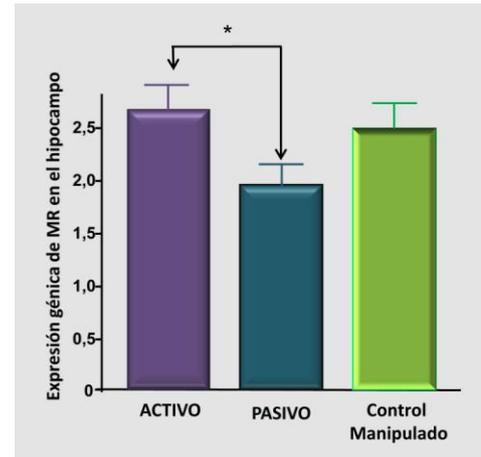


Figura R15. Niveles medios (\pm E.M.M.) de la expresión génica de MR en el hipocampo. Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre la expresión génica de los MR hipocampales en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05.

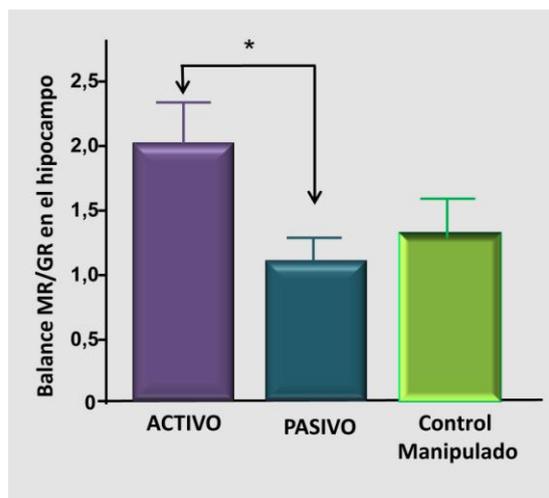


Figura R16. Niveles medios (\pm E.M.M.) del bance MR/GR en el hipocampo. Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre el balance MR/GR en el hipocampo en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05.

2.3. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en bazo

El análisis de los datos mostró un efecto significativo del factor *grupo* en el caso de las dos citocinas: IL-6 ($F_{[2,80]} = 17.052$; $p < 0.0001$) y TNF- α ($F_{[2,80]} = 18.013$; $p < 0.0001$). Cuando se realizó el análisis *pos hoc* para conocer las diferencias en los niveles de IL-6 entre los tres grupos, se observó que los sujetos pasivos tenían mayores niveles que los sujetos activos ($p < 0.02$) y los controles manipulados ($p < 0.0001$). Los sujetos activos también mostraron mayores niveles de esta citocina con respecto a los controles manipulados ($p < 0.01$). En el caso del TNF- α , el análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos tenían mayores niveles que los sujetos activos ($p < 0.04$) y los controles manipulados ($p < 0.0001$). Los sujetos activos también mostraron mayores niveles de esta citocina con respecto a los controles manipulados ($p < 0.01$) (Figura R17).

En ninguno de los casos se observó un efecto del tratamiento con el RS 67333 ni una interacción entre los dos factores analizados.

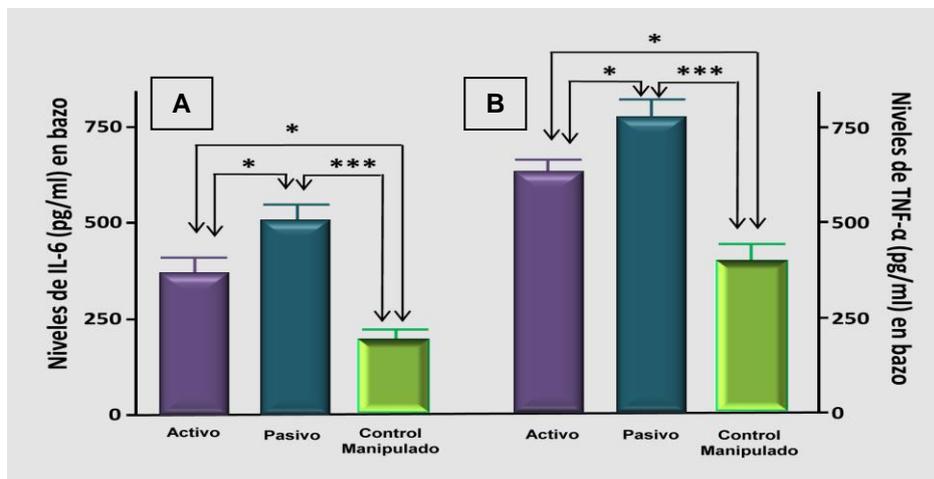


Figura R17. Niveles medios (\pm E.E.M.) de IL-6 [A] y TNF- α [B] 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados.

*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

2.4. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre los niveles de BDNF hipocampales

El análisis de la varianza de dos factores (*grupo* y *tratamiento*) únicamente mostró un efecto significativo del factor *grupo* ($F_{[2,81]} = 4.381$; $p < 0.02$). El análisis *pos hoc* indicó que los sujetos activos tenían mayores niveles de BDNF que los sujetos pasivos ($p < 0.03$) y los controles manipulados ($p < 0.04$). No se hallaron diferencias entre los sujetos pasivos y los controles manipulados (Figura R18).

No se observó un efecto del tratamiento con el RS 67333, ni una interacción entre los dos factores analizados.

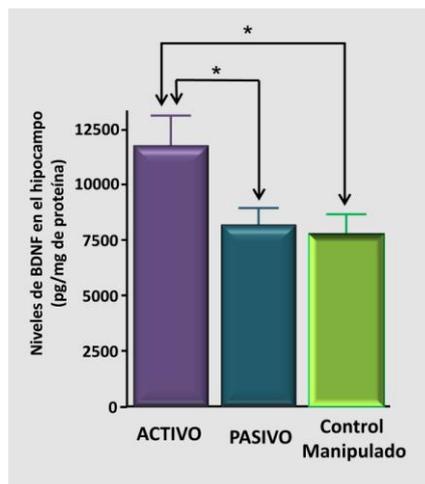


Figura R18. Niveles medios (\pm E.E.M.) de proteína BDNF hipocámpal 3 días después de la última derrota. Las barras representan a los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * $p < 0.05$.

2.5. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 sobre la expresión de receptores serotoninérgicos hipocampales: 5-HT_{1A} y 5-HT₄

El análisis de la varianza de dos factores (*grupo* y *tratamiento*) mostró un efecto significativo del factor *grupo* ($F_{[2,79]} = 3.378$; $p < 0.04$) sobre la expresión de los receptores 5-HT_{1A}. El análisis *pos hoc* indicó que los sujetos pasivos tenían un mayor ARNm-5-HT_{1A}-R que los controles manipulados ($p < 0.05$) (Figura R19). Este análisis no mostró diferencias significativas de

los sujetos pasivos y controles manipulados con respecto a los sujetos activos. No se observó un efecto del tratamiento con el RS 67333, ni una interacción entre los dos factores analizados.

El análisis de la varianza con dos factores (*grupo x tratamiento*), no mostró ningún efecto sobre la expresión génica de los receptores 5-HT_{1A}. Tampoco se halló una interacción significativa entre los dos factores analizados.

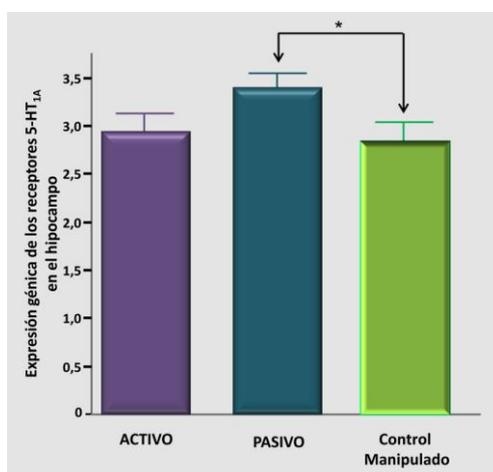


Figura R19. Niveles medios (\pm E.M.M.) de la expresión génica de receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo. Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre la expresión génica de los receptores 5-HT_{1A} hipocampales en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05.

2.6. Efecto de la estrategia de afrontamiento del estrés crónico por derrota y del tratamiento con RS 67333 en la prueba de natación forzada

Por un lado, el análisis mostró un efecto significativo del factor *grupo* en la conducta de escalada ($F_{[2,81]} = 13.432$; $p < 0.0001$). El análisis *pos hoc* indicó que los sujetos activos y pasivos invirtieron significativamente menos tiempo en esta conducta respecto a los controles manipulados ($p < 0.0001$, en ambas cosas) (Figura R20). No se hallaron diferencias entre los tres grupos en el resto de las conductas analizadas (inmovilidad y natación).

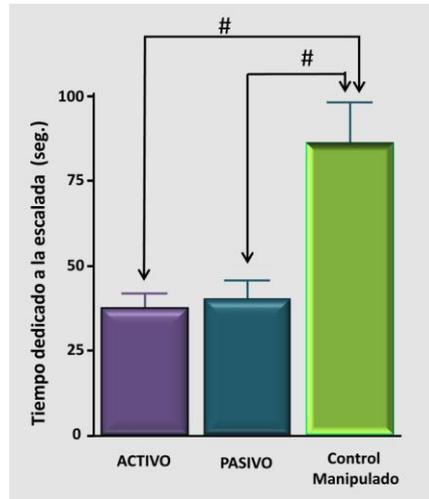


Figura R20. Tiempo medio (\pm E.M.M.) , en segundos, dedicado a la conducta de escalada en la prueba de natación forzada. Se representa el efecto del estrés crónico por derrota sobre esta conducta en los diferentes grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. # < 0.0001.

Por otro lado, aunque no se observó un efecto del tratamiento, el análisis sí mostró una interacción significativa entre los dos factores (*grupo x tratamiento*) para la conducta de inmovilidad ($F_{[2,81]} = 3.131$; $p < 0.05$) y la conducta de natación ($F_{[2,81]} = 4.895$; $p < 0.02$). En el caso de la inmovilidad, el análisis *pos hoc* indicó que los sujetos activos y pasivos sin tratamiento permanecieron más tiempo inmóvil que los controles manipulados sin tratamiento ($p < 0.04$, en ambos casos). El tratamiento disminuyó el tiempo de inmovilidad de los sujetos pasivos en comparación con los pasivos sin tratamiento ($p < 0.02$). Finalmente, no se observaron diferencias entre los sujetos activos con tratamiento y los sujetos controles. En el caso de la conducta de natación, el análisis *pos hoc* reveló que los sujetos pasivos con tratamiento permanecieron más tiempo realizando la conducta de natación que los pasivos sin tratamiento ($p < 0.02$) y que los controles manipulados con tratamiento ($p < 0.01$). Por último, también se observó que los controles manipulados con tratamiento permanecieron menos tiempo nadando que los controles manipulados sin tratamiento ($p < 0.04$) (Figura R21).

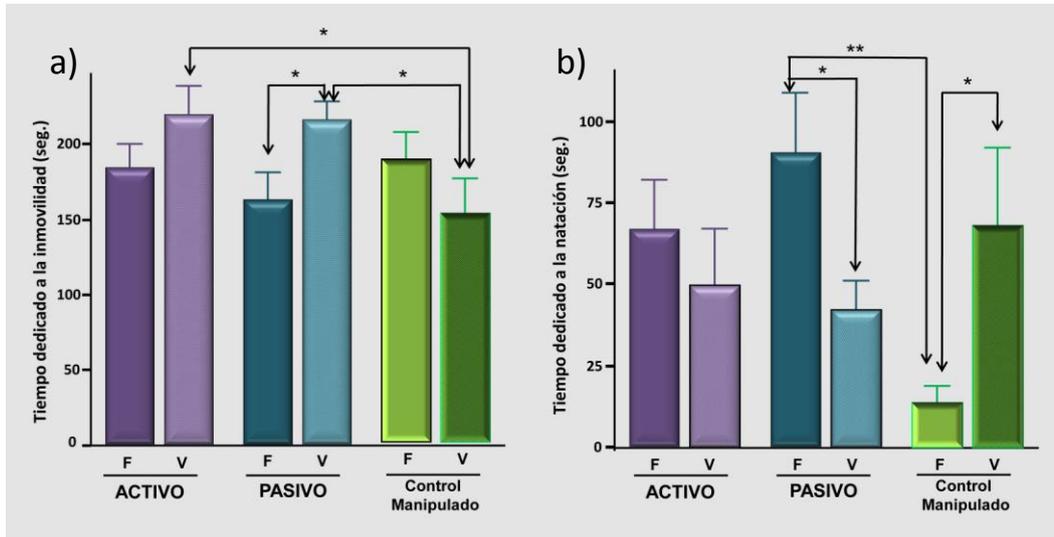


Figura R21. Tiempo medio (\pm E.M.M.) dedicado a las conductas de inmovilidad y natación en la prueba de natación forzada, efecto del tratamiento con RS 67333.

- Se representa el efecto de la interacción entre el estrés crónico y el tratamiento farmacológico (F = RS 67333; V = Vehículo) sobre la inmovilidad en la prueba de natación forzada en los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05
- Se representa el efecto de la interacción entre el estrés crónico y el tratamiento farmacológico (F = RS 67333; V = Vehículo) sobre la natación en la prueba de natación forzada en los tres grupos analizados: sujetos activos, sujetos pasivos y controles manipulados. * < 0.05; ** $p < 0.01$

2.7. Correlaciones entre las variables conductuales y fisiológicas

El estudio de las correlaciones entre las variables conductuales y fisiológicas mostró que los niveles de corticosterona en plasma del día 21 correlacionaban negativamente con la conducta de *exploración no social* ($r = -0.385$, $p = 0.001$) y *exploración social* ($r = -0.335$, $p = 0.006$), del mismo día, y positivamente con la *latencia de inmovilidad* en la prueba de natación forzada ($r = 0.409$, $p \leq 0.0001$). También se encontró una relación positiva entre los niveles de corticosterona obtenidos 3 días después de la última derrota y la conducta de *exploración no social* del día 21 ($r = 0.248$, $p = 0.043$). La ratio MR/GR hipocampal correlacionó negativamente con la conducta de *inmovilidad* del día 21 ($r = -0.273$, $p = 0.029$) y positivamente con la *exploración no social* del día 21 ($r = 0.264$, $p = 0.035$). En cuanto a los receptores glucocorticoideos hipotalámicos, los GR correlacionaron negativamente con la conducta de *exploración no social* del día 21 ($r = -0.409$, $p = 0.008$). Los niveles de IL-6 también correlacionaron negativamente con la conducta de *exploración no social* del día 21 ($r = -0.335$, $p = 0.006$) y la conducta de *escalada* de la prueba de natación forzada ($r = -0.219$, $p = 0.043$).

Finalmente, los receptores 5-HT₄ hipocampales correlacionaron positivamente con la conducta de *escalada* en la prueba de natación forzada ($r = 0.247$, $p = 0.024$). No se halló ninguna correlación para los receptores 5-HT_{1A} (Tabla R7).

El estudio de las relaciones entre las diferentes medidas fisiológicas mostró que las concentraciones de corticosterona obtenidas el día 21 correlacionaban positivamente con los niveles de IL-6 ($r = 0.263$, $p = 0.018$) y los GR hipotalámicos ($r = 0.290$, $p = 0.025$), y negativamente con los MR hipocampales ($r = -0.229$, $p = 0.041$). Así mismo, también se observó que los niveles de corticosterona hallados tres días después de la última derrota correlacionaron negativamente con la IL-6 ($r = -0.361$, $p = 0.001$) y el TNF- α ($r = -0.261$, $p = 0.015$). Por último, los receptores 5-HT₄ hipocampales correlacionaron positivamente con los GR hipotalámicos ($r = 0.256$, $p = 0.048$) y negativamente con los GR hipocampales ($r = -0.219$, $p = 0.045$). No se encontró ninguna relación significativa para los niveles de BDNF y los receptores 5-HT_{1A} hipocampales (Tabla R8).

Tabla R7. Correlaciones bivariadas entre las variables conductuales y fisiológicas del experimento 2.

	CORT Día 21		CORT Día 24		MR/GR		GR		Receptores		IL-6	Inmovilidad	Exploración		Latencia	Escala
	CORT Día 21	CORT Día 24	CORT Día 21	CORT Día 24	Hipocampo	Hipocampo	Hipocampo	Hipocampo	5-HT ₄	No social			Social	Inmovilidad		
CORT Día 21	-	-0.001	-0.175	0.29*	0.116	0.263*	0.189	-0.385**	-0.335**	0.409	0.056					
CORT Día 24	-0.001	-	0.057	-0.167	0.088	-0.361**	-0.187	0.248*	-0.096	0.043	0.061					
MR/GR Hipocampo	-0.175	0.057	-	0.038	0.053	-0.07	-0.273*	0.264*	0.17	0.124	0.000					
GR Hipocampo	0.29*	-0.167	0.038	-	0.256*	53	0.152	-0.409**	-0.245	0.232	0.13					
Receptores 5-HT ₄	0.116	0.088	0.053	0.256*	-	-0.084	0.005	-0.026	-0.187	-0.019	0.247*					
IL-6	0.263*	-0.361**	-0.07	53	-0.084	-	0.217	-0.335**	0.08	0.064	-0.219*					
Inmovilidad	0.189	-0.187	-0.273*	0.152	0.005	0.217	-	-0.802**	-0.142	-0.102	-0.102					
Exploración No Social	-0.385**	0.248*	0.264*	-0.409**	-0.026	-0.335**	-0.802**	-	0.376**	-0.059	-0.165					
Exploración Social	-0.335**	-0.096	0.17	-0.245	-0.187	0.08	-0.377**	0.376**	-	-0.144	-0.174					
Latencia Inmovilidad	0.409	0.043	0.124	0.232	-0.019	0.064	-0.142	-0.059	-0.144	-	0.074					
Escala	0.056	0.061	0.000	0.13	0.247*	-0.219*	-0.102	-0.155	-0.174	0.074	-					

(CORT Día 21 = Corticosterona del día 21 tras la derrota; CORT Día 24 = Corticosterona tres días después de la derrota; Inmovilidad, Exploración No Social y Exploración social = conductas manifestadas durante la confrontación del día 21; Latencia Inmovilidad= latencia de inmovilidad en la prueba de natación forzada).

Tabla R8. Correlaciones bivariadas entre las variables fisiológicas del experimento 2.

	CORT Día 21		CORT Día 24		MR		GR		Receptores
	CORT Día 21	CORT Día 24	CORT Día 21	CORT Día 24	Hipocampo	Hipocampo	Hipocampo	Hipocampo	
CORT Día 21	-	-0.001	0.263*	0.121	-0.229*	0.16	0.290*	0.116	
CORT Día 24	-0.001	-	-0.361**	-0.261*	0.016	-0.087	-0.167	0.088	
IL-6	0.263*	-0.361**	-	0.550**	-0.133	-0.1	0.053	-0.084	
TNF- α	0.121	-0.261*	0.550**	-	-0.018	-0.136	0.019	-0.145	
GR Hipocampo	0.290*	-0.167	0.053	0.019	0.05	97	-	0.256*	
MR Hipocampo	-0.229*	0.016	-0.133	-0.018	-	-0.351**	0.05	0.051	
GR Hipocampo	0.16	-0.087	-0.1	-0.136	-0.351**	-	97	-0.219*	
Receptores 5-HT ₄	0.116	0.088	-0.084	-0.145	0.051	-0.219*	0.256*	-	

(CORT Día 21 = Corticosterona del día 21 tras la derrota; CORT Día 24 = Corticosterona tres días después de la derrota)

* p < 0.05

** p < 0.01

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN EXPERIMENTO 1:
Estrategias de afrontamiento en respuesta
al estrés social crónico por derrota y
cambios en los niveles de corticosterona,
BDNF y sistema inmunitario

En este primer estudio los resultados derivados del análisis conductual revelan que los sujetos sometidos a estrés social crónico por derrota pueden ser divididos en dos grupos diferentes, activo y pasivo, en función de las respuestas conductuales que adoptan durante la última confrontación social. Las conductas que claramente discriminan entre ambos grupos son la *inmovilidad*, la *defensa-sumisión*, la *exploración social* y la *exploración no social*. A diferencia de los sujetos activos, los sujetos con un perfil pasivo se caracterizan, principalmente, por responder ante un oponente agresivo con conductas de inmovilidad y bajos niveles de exploración no social, además de no manifestar conductas de exploración social. Estas características conductuales ya han sido previamente descritas por otros autores como parte de un estilo de afrontamiento pasivo que representan un patrón alternativo de respuestas a los estresores (Koolhaas y cols., 1999). Así, en este estudio, se han identificado dos estilos diferentes de afrontar la situación de derrota crónica mediante el empleo de diferentes respuestas conductuales, que a su vez permiten estudiar las características biológicas asociadas a estos perfiles.

Aunque es sabido que los diferentes estilos de afrontamiento van acompañados por una serie de características neuroendocrinas, el conocimiento sobre sus relaciones causales es escaso. Recientemente se ha propuesto que las diferencias neuroendocrinas probablemente son más una consecuencia que la causa de las diferencias conductuales (Koolhaas y cols., 2010). En este primer experimento, todos los sujetos estresados muestran una activación del eje HPA en los diferentes momentos analizados tras la derrota (días 3, 11 y 21), indicando que el estrés social no resulta en una habituación, tal y como también indican otros autores (Pardon y cols., 2004; Tidey y Miczek, 1997; Tornatzky y Miczek, 1993). Los días 3 y 11 los animales activos y pasivos no difieren en su respuesta de corticosterona. Sin embargo, la prolongación del estrés hasta 21 días, puso de manifiesto en los sujetos pasivos un incremento de los niveles de corticosterona con respecto a los días anteriores, que dio lugar a diferencias significativas con respecto a los sujetos activos. Por lo tanto, estos datos indican que es necesario un periodo de estrés prolongado para que estas diferencias se manifiesten, aunque factores como la heterogeneidad genética (Veenema y cols., 2003a) y los eventos tempranos de la vida (Meaney, 2001) pueden contribuir a estas diferencias. Así, a pesar de que los datos muestran que ambas estrategias conductuales ya estaban establecidas el día 11 en un 67,9 % de los sujetos, fue necesario un periodo de estrés más prolongado para que se manifestaran las diferencias en corticosterona, apoyando la idea de que las diferencias conductuales, en interacción con el estrés, podrían ser las promotoras de las

diferencias neuroendocrinas. La correlación significativa entre los altos niveles de corticosterona del día 21 y la alta inmovilidad y la baja exploración no social, ambas características de los sujetos pasivos, indica que las características conductuales que más discriminan ambos grupos, activo y pasivo, están asociadas a una diferente respuesta fisiológica ante la derrota. Esto también muestra una mayor reactividad al estrés de los sujetos pasivos y que un perfil activo modera la respuesta aguda de glucocorticoides inducida por el estrés crónico por derrota (Walker y cols., 2009), tal y como también se ha observado en otros parámetros biológicos, tales como la función inmunitaria (Stefanski, 1998), los biorritmos (Meerlo y cols., 1999) y las respuestas de miedo condicionadas (Walker y cols., 2008).

Cuando los niveles de corticosterona fueron medidos 3 días después de la última derrota, los sujetos pasivos presentaron niveles significativamente menores que los controles, indicando una posible alteración en el funcionamiento del eje HPA en los sujetos pasivos producida por el estrés. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio también se observaron menores niveles de corticosterona 24 horas después de la última derrota en sujetos sometidos al mismo protocolo de estrés crónico (Beitia y cols., 2005), por lo que podemos inferir que son los sujetos con un perfil pasivo los que contribuyen principalmente a esa menor concentración de corticosterona en los sujetos derrotados. A la vista de estos resultados, podemos concluir que el perfil pasivo se caracteriza por una exagerada respuesta de corticosterona, cuando el estrés por derrota se prolonga, y también por bajos niveles de corticosterona al cesar el estrés. En humanos, también se ha encontrado una hipocortisolemia después de un prolongado periodo de estrés que cursa con una hiperactividad de eje HPA y una excesiva liberación de glucocorticoides (Fries y cols., 2005; Hellhammer y Wade, 1993). La hipocortisolemia también ha sido descrita como una característica propia de la depresión atípica que la diferencia de otros subtipos de depresión (Antonijevic, 2006; Gold y Chrousos, 2002). Es posible que en el caso de los sujetos pasivos la capacidad de autorregulación del eje HPA esté alterada a consecuencia de una repetida y excesiva liberación de corticosterona en respuesta a la derrota social. Se cree que este tipo de alteraciones son debidas a un aumento del feedback negativo del eje HPA pero el mecanismo responsable de esta disfunción todavía se desconoce. Es posible que el aumento de la inhibición de la actividad del eje HPA sea debido a cambios en los receptores glucocorticoides tanto a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo como a nivel del hipocampo (De Kloet y cols., 1998; Gupta y cols., 2007). Alternativamente, también se ha propuesto que un déficit en la actividad del CRH podría reducir la liberación adrenocortical

(Stenberg y cols., 1989) o también que una alteración de la señal simpática podría disminuir la sensibilidad de las adrenales a la ACTH (Kalsbeek y cols., 1996).

A la vista de la diferente reactividad del eje HPA de los dos perfiles, y teniendo en cuenta que los glucocorticoides son potentes reguladores de la actividad inmunitaria, es de esperar que también se observen diferencias entre la función inmunitaria de los sujetos activos y pasivos. Así, los datos muestran mayores cambios en la actividad inmunitaria de los sujetos pasivos, ya que presentan mayores niveles de IL-6 y TNF- α en el bazo, en comparación con los sujetos activos y control. Este incremento de interleucinas observado tras la estimulación *in vitro* de las células del bazo puede ser el reflejo de un aumento de la capacidad de producción de estas mismas citocinas *in vivo*, de manera que sus efectos a nivel cerebral podrían contribuir al patrón conductual exhibido por los sujetos pasivos, que se caracteriza por mayores niveles de inmovilidad y menores niveles de exploración no social. Dichos cambios conductuales forman parte de un repertorio conductual conocido como “conducta de enfermedad” que es inducido por las citocinas y que son similares a aquellas conductas que se observan en algunos trastornos como por ejemplo la depresión severa (Anisman y Merali, 2002; Dantzer y cols., 2008b). De acuerdo con esto, se encontró una correlación negativa entre los niveles de interleucinas del bazo y las conductas de exploración social y exploración no social. Las diferencias observadas en los niveles de interleucinas entre los sujetos activos y pasivos pueden ser explicadas en parte por la diferente reactividad del eje HPA que muestran ambos perfiles. Existen numerosos trabajos que han descrito la relación que existe entre los glucocorticoides y las interleucinas, aunque todavía no se entiende completamente el mecanismo implicado en esta relación. Se ha propuesto que una baja señalización de glucocorticoides, bien debida a una resistencia a los efectos de estas hormonas en las células inmunitarias o bien por una disminución de sus niveles, puede ser la responsable del aumento de citocinas proinflamatorias (Avitsur y cols., 2001; Raison y Miller, 2003; Sorrells y Sapolsky, 2007; Stark y cols., 2001). Por otro lado, también hay autores que proponen que los niveles bajos de estas hormonas pueden ejercer efectos permisivos sobre la activación inmunitaria durante el estrés (Sorrells y Sapolsky, 2010). Nuestros datos parecen indicar la existencia de una baja señalización de glucocorticoides, tal y como sugiere la relación positiva encontrada entre los niveles de TNF- α y los niveles de corticosterona medidos tras la última derrota. Sin embargo, no hemos encontrado una relación significativa entre los altos niveles de ambas interleucinas y los bajos niveles de corticosterona hallados tres días después de la última derrota, por lo que es posible que haya otros factores que estén modulando la

respuesta inmunitaria además de los glucocorticoides. En cuanto a la capacidad proliferativa de las células mononucleares del bazo, los sujetos pasivos muestran una menor respuesta proliferativa de los linfocitos T en comparación con los sujetos activos, indicando que cada perfil conductual está asociado a una diferente respuesta inmunitaria. En el caso de los linfocitos B, no se encontraron diferencias entre los dos perfiles conductuales, aunque sí se observó una menor capacidad proliferativa de los sujetos pasivos en relación a los controles. Aunque existen muchos trabajos que han encontrado un efecto inmunosupresor, atribuido a los glucocorticoides, en sujetos derrotados (Bartolomucci y cols., 2001; Beitia y cols., 2005; Raab y cols., 1986; Stefanski, 1998), en nuestro caso este efecto no es claro, ya que la única diferencia encontrada con respecto a los sujetos controles fue en el caso de los sujetos pasivos y sólo en la capacidad proliferativa de los linfocitos B.

Debido al creciente interés en la relación entre el estrés y los factores neurotróficos como el BDNF, nos propusimos estudiar el efecto de las diferentes estrategias de afrontamiento del estrés social sobre esta neurotrofina. Los resultados muestran que los sujetos derrotados con un perfil pasivo tienen menores niveles de BDNF hipocampal en comparación con los sujetos control y los sujetos con un perfil conductual activo. Estos datos están de acuerdo con los resultados de un trabajo reciente en el que se ha observado que los ratones que muestran una mayor reactividad al estrés tienen los niveles de BDNF disminuidos en comparación con aquellos sujetos menos reactivos (Knapman y cols., 2010). Algunos datos indican que las citocinas (Dantzer y cols., 2008b) y los glucocorticoides (Barbany y Persson, 1992; Schaaf y cols., 1998; Jacobsen y Mørk, 2006) pueden mediar en los efectos que tiene el estrés sobre los niveles de BDNF. En el presente trabajo, los altos niveles de interleucinas como de corticosterona presentes en los sujetos pasivos en respuesta a la derrota, podrían ser los responsables de la reducción observada de los niveles de BDNF hipocampales. Sin embargo, no hemos encontrado una relación significativa, entre estas dos variables fisiológicas y los niveles de BDNF, que apoye esta idea. Por lo tanto, podemos pensar que hay otros factores implicados, ya que hay datos que indican que la adrenalectomía no evita del todo los efectos que tiene el estrés sobre esta neurotrofina (Smith y cols., 1995a) y que otras hormonas como las catecolaminas también pueden afectar a los niveles de BDNF (Chen y cols., 2007). En el caso de los sujetos activos, los niveles de BDNF en el hipocampo no difieren de los niveles de los controles, indicando que una estrategia activa en el afrontamiento del estrés social, a través de la activación de diferentes sistemas neurales, pueda contrarrestar los efectos de una regulación a la baja del BDNF

producida por el estrés. En este sentido, existen evidencias que indican que un estrés crónico por inmovilización durante 7 semanas incrementa los niveles ARNm-CREB (Butterweck y cols., 2001), una proteína fundamental para la regulación de la expresión de BDNF (Kato-Semba y cols., 2001). Así, es posible que en el caso de aquellos sujetos cuya conducta sea más activa en respuesta al estrés social, y que presentan niveles de BDNF similares a los controles, estos mecanismos compensatorios sean particularmente relevantes.

Con el objetivo de determinar si los sujetos con diferente estrategia de afrontamiento en el estrés social también presentaban diferentes características conductuales que podrían ser indicativas de un estado de depresión se realizó la prueba de natación forzada (Bielajew y cols., 2003; Koolhaas y cols., 2010; Rygula y cols., 2005; Veenema y cols., 2005). Los sujetos pasivos no fueron diferentes a los activos en la latencia de inmovilidad, pero sí mostraron una disminución de este parámetro en comparación con los sujetos control, que además correlacionaba positivamente con los niveles de corticosterona medidos tres días después de la última derrota. Sin embargo, no podemos concluir que los sujetos pasivos presenten una clara alteración conductual debido a que otros parámetros analizados, como por ejemplo el tiempo de inmovilidad, no han sido significativamente diferentes. Por otro lado, los datos existentes sobre los efectos de la derrota social en la conducta de los ratones en la prueba de natación forzada no son consistentes, ya que se ha observado que después de una serie de encuentros agresivos la inmovilidad puede tanto aumentar como no variar (Kinsey y cols., 2008). Probablemente estos datos contradictorios sean debidos a los diferentes procedimientos utilizados en distintos laboratorios por lo que se requieren más estudios para conocer las consecuencias de la derrota social en la prueba de natación forzada.

En conclusión, los datos muestran que cuando los sujetos son expuestos a derrota crónica, las conductas que manifiestan pueden ser divididas en dos perfiles diferentes, activo y pasivo, que a su vez están asociados a diferentes perfiles fisiológicos. Los sujetos pasivos, en comparación con los activos, muestran una mayor alteración de los niveles de corticosterona en plasma, mayores niveles de citocinas proinflamatorias, una menor capacidad de respuesta proliferativa de los linfocitos T, y menores niveles de BDNF en el hipocampo. Los sujetos con un perfil activo en comparación con los controles no difieren en la mayoría de las variables fisiológicas estudiadas. Así, los resultados indican que un perfil conductual pasivo, a diferencia del activo, presenta unas características fisiológicas que han sido previamente asociadas a trastornos depresivos.

DISCUSIÓN EXPERIMENTO 2:
Estrategias de afrontamiento
en respuesta al estrés social crónico por derrota y cambios
en los receptores de glucocorticoides (MR y GR) y en los
receptores serotoninérgicos postsinápticos (5-HT_{1A} y 5-HT₄).
Efectos del tratamiento a corto plazo con el RS 67333

Los resultados de este segundo estudio corroboran la existencia de dos perfiles conductuales diferentes en respuesta al estrés social crónico por derrota que están asociados a diferentes características biológicas. Después de 18 días de derrota, los sujetos con un perfil conductual pasivo se diferencian del activo, principalmente, por responder ante la situación de conflicto social con altos niveles de inmovilidad y bajos niveles tanto de exploración no social como de exploración social. Tres días después, el día 21, los resultados muestran que estas diferencias conductuales además de mantenerse se hacen más pronunciadas. Así, encontramos que estos dos perfiles conductuales alternativos en respuesta al estrés crónico son similares a los descritos en el estudio previo ya que están constituidos por las mismas características conductuales, e indican la existencia de unos patrones de conducta estables.

En este segundo experimento al igual que en el anterior, los sujetos pasivos, a diferencia de los activos y controles, muestran mayores niveles de corticosterona tras la última derrota (día 21), indicando una mayor reactividad de los sujetos pasivos en respuesta al estrés social crónico. El hecho de que los niveles de corticosterona de los sujetos activos en respuesta al estrés no sean diferentes a los niveles mostrados por los sujetos controles manipulados podría indicar una habituación al estrés por parte de los sujetos activos, sin embargo creemos que esta posibilidad es poco probable. Los datos obtenidos previamente en el primer experimento no muestran una habituación de los sujetos activos en respuesta a la derrota repetida ya que sus niveles de corticosterona se mantuvieron estables en respuesta al estrés a lo largo de los 21 días, coincidiendo con otros datos que indican que el estrés social no produce una habituación (Pardon y cols., 2004; Tidey y Miczek, 1997; Tornatzky y Miczek, 1993). Hay que tener en cuenta que en este segundo experimento, a diferencia del primero, se ha administrado un tratamiento farmacológico y que en respuesta a la inyección haya podido aumentar los niveles de corticosterona de los sujetos controles. Por otra parte, los sujetos pasivos mostraron menores niveles de corticosterona que los sujetos activos y controles tres días después de la última derrota, corroborando los resultados encontrados en el primer experimento. Los datos de los niveles de corticosterona previos a la aplicación del estrés social revelan que los tres grupos no diferían en sus niveles iniciales de corticosterona, por lo que es razonable atribuir a los efectos de la derrota repetida las diferencias observadas en los sujetos pasivos.

Con el objetivo de estudiar el posible mecanismo implicado en la alteración del eje HPA observada en los sujetos con una estrategia de afrontamiento pasiva, se midió la expresión de los receptores glucocorticoides, MR y GR, tanto en el hipotálamo como en el hipocampo. A nivel

hipotalámico, los resultados mostraron que los sujetos pasivos tenían mayores niveles de ARNm-GR que los sujetos activos y controles. Estos datos pueden ser interpretados de acuerdo con el modelo explicativo de la regulación del eje HPA que ha sido propuesto recientemente por Gupta y colaboradores (2007). Según este modelo, el incremento de corticosterona tras un periodo corto de estrés produce un ligero aumento de la concentración de GRs que contrarrestan el aumento de glucocorticoides y sus posibles efectos deletéreos. Seguidamente, la concentración de GRs retorna a sus niveles normales de una manera rápida. Por el contrario, los niveles elevados de corticosterona, tras prolongados y repetidos periodos de estrés, producirían una alta y persistente concentración de GRs que no retornarían a su línea basal, forzando así al eje HPA a un estado de niveles bajos de glucocorticoides. Así, podemos pensar que en los sujetos pasivos, expuestos a altos niveles de glucocorticoides durante las repetidas experiencias de derrota, se produce un incremento de la expresión de GR hipotalámicos que da lugar a un aumento del feedback negativo del eje HPA, responsable de los bajos niveles de corticosterona. La relación negativa encontrada entre el ARNm-GR en el hipotálamo y la conducta de exploración no social sugiere una asociación entre estos receptores y la conducta que más discrimina entre los dos perfiles conductuales. Por otro lado, la ausencia de diferencias en la expresión de los MR hipotalámicos entre los diferentes grupos, probablemente es debida a que en situaciones de estrés los receptores principalmente involucrados en la regulación del eje HPA son los GR (De Kloet y cols., 1998). Los sujetos pasivos presentaron un menor ratio MR/GR hipotalámico que los sujetos control, indicando una alteración del equilibrio entre los receptores que ha sido relacionada con una mayor vulnerabilidad individual a padecer enfermedades relacionadas con el estrés (De Kloet y cols., 2005; Oitzl y cols., 1994; Oitzl y cols., 2010). A nivel del hipocampo, los sujetos pasivos, respecto a los activos, presentaron mayores niveles de ARNm-GR y menores niveles de ARNm-MR, y también mostraron una disminución de la ratio MR/GR. La inexistencia de diferencias con respecto a los controles indica que el estrés crónico no ha causado una alteración de estos receptores en el hipocampo. No obstante, podemos destacar que el estrés ha afectado de manera diferente a los sujetos activos y pasivos, siendo estos últimos los que presentan cambios que se han asociado a una mayor vulnerabilidad al estrés (De Kloet y cols., 1998).

En este segundo experimento tanto los sujetos pasivos como los activos mostraron una mayor actividad del sistema inmunitario que los controles presentando niveles más elevados de IL-6 y TNF- α . Así mismo, dentro del grupo de los derrotados, los sujetos pasivos, en comparación

con los activos, tuvieron mayores niveles de éstas mismas interleucinas. Así, una vez más, encontramos que un estilo de afrontamiento pasivo en respuesta a la derrota crónica se asocia a una mayor respuesta inflamatoria. La relación negativa entre los niveles de IL-6 y la conducta de exploración no social tras 21 días de estrés, apoya la idea de que esta citocina está implicada en la manifestación de características conductuales propias de la conducta de enfermedad. El aumento de las interleucinas en los sujetos pasivos podría ser explicado mediante los cambios observados en los receptores de glucocorticoides. Nuestros datos muestran un aumento en la expresión de los GR hipotalámicos en estos sujetos, lo cual indica que no existe una resistencia al efecto de los glucocorticoides. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de la misma en las células inmunitarias del bazo ya que es sabido que la resistencia a estas hormonas es dependiente del tejido. Por otro parte, tal y como proponíamos previamente, puede haber otros factores implicados ya que los sujetos activos y controles no difieren en sus niveles de corticosterona el día 21 después de la derrota y tampoco en los niveles medidos tres días después, pero sin embargo presentan una diferente actividad inmunitaria.

El estudio de los niveles de BDNF hipocampales mostró que los sujetos con un perfil activo, tienen mayores niveles de esta neurotrofina en comparación con los sujetos pasivos y controles, mientras que los niveles de estos últimos no difieren entre sí. Aunque la mayoría de los trabajos muestran una reducción de los niveles de BDNF hipocampales producidos por el estrés crónico (Duman, 2004; Duman y Monteggia, 2006), también hay trabajos que indican un aumento tras un estrés crónico (Li y cols., 2007; Naert y cols., 2011; Pardon y cols., 2005). Se ha sugerido que el incremento del BDNF inducido por el estrés constituye un mecanismo de aumento de la plasticidad a la hora de afrontar el reto que suponen las situaciones ambientales (Marmigliere, 2003). Esto apoyaría la idea sugerida en el experimento anterior, de que este mecanismo adaptativo está particularmente presente en aquellos sujetos que muestran un repertorio conductual y una estrategia de afrontamiento más activa.

Dada la importancia de los efectos del estrés sobre la serotonina y su implicación en los diferentes trastornos relacionados con el estrés, nos propusimos estudiar los efectos del estrés social por derrota sobre diferentes receptores serotoninérgicos. El análisis de los datos revela que los sujetos pasivos, a diferencia de los activos, tienen mayores niveles de ARNm-5-HT_{1A} hipocampales que los controles. Así, podemos decir que el estrés crónico por derrota ha causado una regulación al alza de estos receptores postsinápticos, únicamente en aquellos sujetos con una estrategia de afrontamiento pasiva. Otros trabajos también han encontrado un aumento de

estos receptores tanto en modelos animales de depresión (Overstreet y cols., 1994; Shively y cols., 2007) como en pacientes deprimidos (Parsey y cols., 2006). La implicación de los glucocorticoides ha sido uno de los mecanismos más estudiados a la hora de explicar las alteraciones de los receptores 5-HT_{1A} en el estrés (De Kloet y cols., 1986; Jöels y cols., 1991; López y cols., 1998). Así, en la mayoría de los estudios la reducción de los receptores 5-HT_{1A} hipocampales se ha asociado a una hiperactividad del eje HPA (Savitz, 2009). En nuestro caso, podemos pensar que los niveles bajos de corticosterona hallados tres días después de la última derrota han podido facilitar la regulación al alza de los receptores 5-HT_{1A} hipocampales. En este sentido, se ha observado que el ARNm-5-HT_{1A} hipocampal incrementa 24 horas después de la eliminación de corticosterona por adenolectomía (Biegon y cols., 1985; Chalmers y cols., 1993; Meijer y De Kloet, 1994). El aumento de citocinas observado en los sujetos pasivos podría haber contribuido a la reducción de la disponibilidad de serotonina tal y como han encontrado otros trabajos (Raison y cols., 2010; Zhu y cols., 2006). A su vez, el déficit de serotonina, que ha sido asociado a la depresión, se ha relacionado con el aumento de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos (Franklin y cols., 1999; Miquel y cols., 1992; Parsey y cols., 2010; Pranzatelli y cols., 1994; Sijbesma y cols., 1991). En definitiva, el aumento de la expresión de los receptores 5-HT_{1A} hipocampales en los sujetos con una estrategia de afrontamiento pasiva ante el estrés, podría reflejar alteraciones en diferentes sistemas que harían a estos sujetos más susceptibles a padecer trastornos como la depresión (Antilla y cols., 2007; Kraus y cols., 2007).

Cuando se midieron los receptores 5-HT₄ en el hipocampo, nuestros resultados no mostraron diferencias entre los tres grupos analizados. En la actualidad existen pocos trabajos que hayan estudiado el efecto del estrés sobre estos receptores. La mayoría de los trabajos disponibles se han realizado utilizando diferentes modelos animales de depresión en ratas y ratones. Los datos en general indican que no todos estos modelos tienen capacidad de alterar estos receptores y que dichas alteraciones son dependientes de las diferentes zonas hipocampales (Licth y cols., 2009; Licth y cols., 2010). Todavía son necesarios más estudios para dilucidar la implicación de estos receptores en los efectos del estrés y trastornos asociados.

La administración de un tratamiento farmacológico durante 5 días con un agonista parcial de los receptores 5-HT₄ (RS 67333) únicamente produjo efectos a nivel fisiológico sobre los receptores glucocorticoides hipotalámicos. Concretamente, se observó un aumento de la expresión génica de los GR y una disminución tanto de los MR como de la ratio MR/GR independientemente del grupo. Por lo que parece ser que éste es un efecto característico del

fármaco. En la actualidad no existen trabajos que hayan analizado el efecto de este fármaco sobre la actividad del eje HPA. Otros trabajos que han utilizado antidepresivos indican que éstos aumentan los GR hipotalámicos restableciendo el déficit de estos receptores y el balance MR/GR asociado a la depresión melancólica (Okugawa y cols., 1999; Peiffer y cols., 1991; Pepin y cols., 1989). En nuestro caso, el fármaco también produjo un aumento de estos receptores, pero dado que el estrés también incrementó los GR, ésta podría ser la causa por la que el fármaco no revierte los efectos producidos por el estrés, por lo que en este caso el bloqueo de estos receptores podría ser un mecanismo más apropiado. Existen evidencias de que la administración de fármacos antagonistas de los receptores GR revierten algunos síntomas depresivos (DeBattista y cols., 2006; Flores y cols., 2006; Papolos y cols., 1993). En cualquier caso, son necesarios más estudios para conocer la mediación de los receptores glucocorticoides en los efectos que producen los antidepresivos. El tratamiento no produjo cambios en los receptores 5-HT_{1A} hipocampales, por lo que el aumento de la actividad serotoninérgica que produce este fármaco a corto plazo, tal y como describen otros trabajos (Lucas y cols., 2007), no ha sido suficiente para producir cambios en el número de receptores. Así mismo, ésta también puede ser la causa de la ausencia de efectos del tratamiento sobre el resto de variables fisiológicas analizadas.

A nivel conductual, 3 días de tratamiento con el RS 67333 no produjo cambios en la conducta social manifestada durante la derrota el día 21. Otros trabajos que han utilizado modelos animales de depresión, como el estrés medio crónico y la bulbectomía olfatoria, indican que la administración de este fármaco durante 3 días produce efectos sobre algunas variables conductuales alteradas por estos modelos. Sin embargo, también indican que es necesario un tratamiento más prolongado para revertir completamente estas alteraciones. Por lo tanto, es posible que en nuestro caso, también sea necesario un tratamiento más largo para observar un efecto antidepresivo sobre los cambios inducidos por la derrota crónica.

Los datos obtenidos en la prueba de natación forzada indicaron que el estrés produjo una reducción de la conducta de escalada tanto en los sujetos activos como en los pasivos. Los resultados también revelaron un aumento de la inmovilidad producida por el estrés en aquellos grupos que no recibieron tratamiento farmacológico, indicando una alteración conductual que ha sido relacionada con el estado depresivo (Becker y cols., 2008; Keeney y cols., 2006). Estos datos, junto con los obtenidos en el primer experimento, apoyan la idea de que los efectos del estrés en esta prueba son independientes de la estrategia de afrontamiento adoptada en la derrota. Por otro lado, el tratamiento farmacológico durante 5 días con el RS 67333 tuvo un efecto positivo

sobre las conductas de inmovilidad y natación, lo cual, de acuerdo con otros autores, predeciría cierto potencial terapéutico de este compuesto (Cryan y cols., 2002). Los resultados indican que el fármaco redujo el tiempo de inmovilidad en los sujetos pasivos en comparación con los sujetos pasivos que no recibieron tratamiento, señalando un efecto antidepresivo en aquel grupo que resultó más afectado por el estrés. Además, también se observó un efecto de éste fármaco sobre la inmovilidad de los sujetos activos, ya que tras la aplicación del tratamiento desaparecen las diferencias entre los sujetos activos y los controles en esta conducta. Recientemente se ha propuesto que en la prueba de natación forzada las conductas activas como la natación son una variable importante a la hora de analizar los efectos antidepresivos de los fármacos agonistas de los receptores serotoninérgicos (Cryan y Mombereau, 2005). En este sentido, observamos que los sujetos pasivos con tratamiento invirtieron significativamente más tiempo en la conducta de natación que los pasivos sin tratamiento. Este aumento de la natación inducido por el fármaco podría ser debido a una activación de la neurotransmisión serotoninérgica (Tamburella y cols., 2009), la cual, tal y como hemos discutido anteriormente, podría estar disminuida en estos sujetos. Por otra parte, es sabido que los efectos de los fármacos agonistas parciales varían en función de los niveles de serotonina, y considerando que estos pueden ser diferentes en los tres grupos analizados, podríamos explicar el diferente efecto del fármaco encontrado en estos grupos.

En conclusión, este segundo experimento apoya los resultados obtenidos en el primer experimento indicando la existencia de dos estrategias de afrontamiento diferentes ante el estrés crónico por derrota que van acompañadas también por un perfil fisiológico diferente en las mismas variables analizadas. También hemos encontrado que el aumento de los GR hipotalámicos producido por el estrés se asocia a la estrategia de afrontamiento pasiva, lo que explicaría los bajos niveles de corticosterona hallados en estos sujetos mediante un aumento del feedback negativo. Todos los cambios, junto con el aumento de la expresión de los receptores 5-HT_{1A} que también presentan los sujetos pasivos, reflejan una mayor vulnerabilidad a los efectos del estrés. El aumento de la inmovilidad producido por el estrés en la prueba de natación forzada en los sujetos derrotados indica una alteración conductual que ha sido asociada con el estado depresivo, y que fue independiente de la estrategia de afrontamiento adoptada. El fármaco revirtió este efecto producido por el estrés indicando un potencial antidepresivo de este compuesto. Sin embargo, teniendo en cuenta las alteraciones producidas por este modelo de estrés, como por ejemplo el aumento de GRs, y que este fármaco actuó incrementando estos

receptores, no parece que su mecanismo sea el más adecuado para revertir los efectos del estrés en este modelo. Ésta también podría ser la causa de la ausencia de efectos sobre otras variables biológicas. Aunque no se puede descartar que un tratamiento más prolongado fuera más efectivo.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en nuestra investigación podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Los sujetos expuestos a derrota crónica manifiestan dos estrategias de afrontamiento diferentes, activa y pasiva. La estrategia activa se caracteriza por bajos niveles de inmovilidad y altos niveles de conductas exploratorias, especialmente de la conducta de *exploración no social*. La estrategia pasiva se caracteriza por bajos niveles de conductas exploratorias y altos niveles de inmovilidad.
2. La activación del eje HPA producida por el estrés social crónico en los sujetos derrotados induce una respuesta de corticosterona que no se habitúa.
3. El estrés crónico por derrota durante 21 días produce una mayor alteración de la actividad del eje HPA en los sujetos con una estrategia de afrontamiento pasiva, evidenciada por mayores niveles de corticosterona tras la última derrota y menores niveles tres días después de ésta. Esta disminución se asocia a un aumento de la expresión de GRs hipotalámicos en estos mismos sujetos.
4. Los sujetos pasivos muestran una mayor actividad inmunitaria presentando mayores niveles de IL-6 y TNF- α en respuesta al estrés social crónico, que podrían ser responsables del patrón conductual característico de estos sujetos y que es similar al descrito como síndrome de conducta de enfermedad.
5. El aumento de BDNF observado en los sujetos con una estrategia de afrontamiento activa podría ser un mecanismo adaptativo de neuroplasticidad que no se ha manifestado en los sujetos con un afrontamiento pasivo.
6. La regulación al alza de los receptores 5-HT_{1A} hipocámpales en los sujetos con una estrategia de afrontamiento pasiva podría ser el reflejo de un déficit serotoninérgico que ha sido asociado a la depresión.
7. El tratamiento durante 5 días con el RS 67333 produce un aumento de la expresión de GRs hipotalámicos al igual que varios fármacos antidepresivos.

8. El tratamiento farmacológico a corto plazo no tuvo efectos en el resto de variables fisiológicas analizadas.
9. El tratamiento durante 3 días con el RS 67333 no produjo cambios en la conducta social.
10. El aumento de inmovilidad producido por el estrés en la prueba de natación forzada en los sujetos derrotados indica una alteración conductual que ha sido asociada con el estado depresivo, y que fue independiente de la estrategia de afrontamiento adoptada.
11. La reducción del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada en los sujetos derrotados que recibieron tratamiento farmacológico predice cierto potencial terapéutico de este compuesto.
12. En conjunto podemos concluir que las diferentes estrategias conductuales en respuesta a la derrota crónica están asociadas con diferentes perfiles fisiológicos y que un perfil pasivo presenta características fisiológicas que han sido previamente asociadas con la depresión.
13. La ausencia de efectos del tratamiento farmacológico en la mayoría de las variables evaluadas podría ser debida a que el aumento de GRs hipotalámicos que produce el fármaco no revierte los efectos producidos por el estrés en este modelo, o bien que sea necesario un tratamiento más prolongado.

VII. REFERENCIAS

- Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hollis, J. H., y Lowry, C. A. (2004). Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*, 1018, 46-57.
- Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J. D., Shekhar, A., y Lowry, C. A. (2005). Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*, 133(4), 983-997.
- Ader, R. (1981). *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press.
- Ader, R. y Cohen, N. (1975). Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom Med*, 37(4), 333-340.
- Aghajanian, G. K. (1995). Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. En: Bloom, F. R., y Kupfer, D. J., (Eds). *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* (pp. 1451-1459). New York: Raven Press, 1995.
- Allan, S. M., y Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2(10), 734-744.
- Alleva, E., y Francia, N. (2009). Psychiatric vulnerability: suggestions from animal models and role of neurotrophins. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(4), 525-536.
- Almawi, W. Y., Beyhum, H. N., Rahme, A. A., y Rieder, M. J. (1996). Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol*, 60(5), 563-572.
- Aloisi, F., Borsellino, G., Care, A., Testa, U., Gallo, P., Russo, G., Peschle, C., y Levi, G. (1995). Cytokine regulation of astrocyte function: in-vitro studies using cells from the human brain. *Int J Dev Neurosci*, 13(3-4), 265-274.
- Amargos-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M. V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., Toth, M., Mengod, G., y Artigas, F. (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 14(3), 281-299.
- Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci*, 8(3), 365-371.
- Andersen, B. L., Kiecolt-Glaser, J. K., y Glaser, R. (1994). A biobehavioral model of cancer stress and disease course. *Am Psychol*, 49(5), 389-404.
- Anderson, K. D., Alderson, R. F., Altar, C. A., DiStefano, P. S., Corcoran, T. L., Lindsay, R. M., y Wiegand, S. J. (1995). Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. *J Comp Neurol*, 357(2), 296-317.
- Andrade, R., y Chaput, Y. (1991). 5-Hydroxytryptamine4-like receptors mediate the slow excitatory response to serotonin in the rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*, 257(3), 930-937.

- Anisman, H., y Merali, Z. (1999). Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv Exp Med Biol*, 461, 199-233.
- Anisman, H., Ravindran, A. V., Griffiths, J., y Merali, Z. (1999). Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features. *Mol Psychiatry*, 4(2), 182-188.
- Anisman, H., y Merali, Z. (2002). Cytokines, stress, and depressive illness. *Brain Behav Immun*, 16(5), 513-524.
- Anisman, H., y Matheson, K. (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 525-546.
- Anisman, H., Du, L., Palkovits, M., Faludi, G., Kovacs, G. G., Szontagh-Kishazi, P., Merali, Z., y Poulter, M.O. (2008a). Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects. *J Psychiatry Neurosci*, 33(2), 131-141.
- Anisman, H., Gibb, J., y Hayley, S. (2008b). Influence of continuous infusion of interleukin-1beta on depression-related processes in mice: corticosterone, circulating cytokines, brain monoamines, and cytokine mRNA expression. *Psychopharmacology (Berl)*, 199(2), 231-244.
- Anisman, H., Merali, Z., y Hayley, S. (2008c). Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 85(1), 1-74.
- Anisman, H. (2009). Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*, 34(1), 4-20.
- Ansorge, M. S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., y Gingrich, J. A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*, 306(5697), 879-881.
- Antonijevic, I. A. (2006). Depressive disorders: is it time to endorse different pathophysiologies? *Psychoneuroendocrinology*, 31(1), 1-15.
- Anttila, S., Huuhka, K., Huuhka, M., Rontu, R., Hurme, M., Leinonen, E., y Lehtimäki, T. (2007). Interaction between 5-HT1A and BDNF genotypes increases the risk of treatment-resistant depression. *J Neural Transm*, 114(8), 1065-1068.
- Arango, V., Underwood, M. D., Gubbi, A. V., y Mann, J. J. (1995). Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res*, 688(1-2), 121-133.
- Arango, V., Underwood, M. D., Boldrini, M., Tamir, H., Kassir, S. A., Hsiung, S., Chen, J. J., y Mann, J. J. (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*, 25(6), 892-903.

- Arato, M., Banki, C. M., Bissette, G., y Nemeroff, C. B. (1989). Elevated CSF CRF in suicide victims. *Biol Psychiatry*, 25(3), 355-359.
- Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., y Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*, 160(1), 1-12.
- Arborelius, L., Hawks, B. W., Owens, M. J., Plotsky, P. M., y Nemeroff, C. B. (2004). Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology (Berl)*, 176(3-4), 248-255.
- Armario, A., Hernandez, J., Bluethmann, H., y Hidalgo, J. (1998). IL-6 deficiency leads to increased emotionality in mice: evidence in transgenic mice carrying a null mutation for IL-6. *J Neuroimmunol*, 92(1-2), 160-169.
- Arranz, B., Eriksson, A., Mellerup, E., Plenge, P., y Marcusson, J. (1994). Brain 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, and 5-HT₂ receptors in suicide victims. *Biol Psychiatry*, 35(7), 457-463.
- Artigas, F., Nutt, D. J., y Shelton, R. (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol Bull*, 36 Suppl 2, 123-132.
- Asberg, M., Nordstrom, P., y Traskman-Bendz, L. (1986). Cerebrospinal fluid studies in suicide. An overview. *Ann N Y Acad Sci*, 487, 243-255.
- Avgustinovich, D., Lipina, T., Alekseyenko, O., y Kudryavtseva, N. (1999). Changes in brain serotonergic activity in anxious losers. *Biogenic Amines*, 15(4), 395-404.
- Avgustinovich, D. F., Kovalenko, I. L., y Kudryavtseva, N. N. (2005). A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. *Neurosci Behav Physiol*, 35(9), 917-924.
- Avitsur, R., Stark, J. L., y Sheridan, J. F. (2001). Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Horm Behav*, 39(4), 247-257.
- Aydemir, O., Deveci, A., y Taneli, F. (2005). The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(2), 261-265.
- Azpiroz, A., De Miguel, Z., Fano, E., y Vegas, O. (2008). Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice. *Brain Behav Immun*, 22(5), 690-698.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, 347(12), 911-920.
- Balkowiec, A., y Katz, D. M. (2000). Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J Neurosci*, 20(19), 7417-7423.

- Banki, C. M., Karmacs, L., Bissette, G., y Nemeroff, C. B. (1992). CSF corticotropin releasing hormone, somatostatin, and thyrotropin releasing hormone in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 43(1), 13-21.
- Banks, W. A., y Kastin, A. J. (1991). Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems. *Life Sci*, 48(25), PL117-PL121.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., y Broadwell, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2(4), 241-248.
- Barbany, G., y Persson, H. (1992). Regulation of Neurotrophin mRNA Expression in the Rat Brain by Glucocorticoids. *Eur J Neurosci*, 4(5), 396-403.
- Barber, A. E., Coyle, S. M., Marano, M. A., Fischer, E., Calvano, S. E., Fong, Y., Moldawer, L. L., y Lowry, S. F. (1993). Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J Immunol*, 150(5), 1999-2006.
- Barnum, C. J., Blandino, P., Jr., y Deak, T. (2008). Social status modulates basal IL-1 concentrations in the hypothalamus of pair-housed rats and influences certain features of stress reactivity. *Brain Behav Immun*, 22(4), 517-527.
- Barrientos, R. M., Sprunger, D. B., Campeau, S., Higgins, E. A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., y Maier, S. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience*, 121(4), 847-853.
- Barrientos, R. M., Sprunger, D. B., Campeau, S., Watkins, L. R., Rudy, J. W., y Maier, S. F. (2004). BDNF mRNA expression in rat hippocampus following contextual learning is blocked by intrahippocampal IL-1beta administration. *J Neuroimmunol*, 155(1-2), 119-126.
- Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limiroli, E., Panerai, A. E., Ceresini, G., Poli, M. D., y Parmigiani, S. (2001). Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. *Physiol Behav*, 73(3), 401-410.
- Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Panerai, A. E., Sgoifo, A., Dantzer, R., y Parmigiani, S. (2005). Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(1), 67-81.
- Bartrop, R. W., Luckhurst, E., Lazarus, L., Kiloh, L. G., y Penny, R. (1977). Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet*, 1(8016), 834-836.
- Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S., y Malenka, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science*, 295(5563), 2282-2285.
- Becker, C., Zeau, B., Rivat, C., Blugeot, A., Hamon, M., y Benoliel, J. J. (2008). Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Mol Psychiatry*, 13(12), 1079-1092.

- Beitia, G., Garmendia, L., Azpiroz, A., Vegas, O., Brain, P. F., y Arregi, A. (2005). Time-dependent behavioral, neurochemical, and immune consequences of repeated experiences of social defeat stress in male mice and the ameliorative effects of fluoxetine. *Brain Behav Immun*, 19(6), 530-539.
- Bellinger, D. L., Lorton, D., Lubahn, C., y Felten, D. L. (2001). Innervation of lymphoid organs - Association of nerves with cells of the immune system and their implications in disease. En: Ader, R., Felten, D. L., y Cohen, N. (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 3ª Edn (pp. 55-111). New York: Academic Press.
- Ben Menachem-Zidon, O., Goshen, I., Kreisel, T., Ben Menahem, Y., Reinhartz, E., Ben Hur, T., y Yirmiya, R. (2008). Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 33(9), 2251-2262.
- Benus, R. F., Bohus, B., Koolhaas, J. M., y Van Oortmerssen, G. A. (1991). Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia*, 47(10), 1008-1019.
- Benveniste, E. N. (1998). Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9(3-4), 259-275.
- Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kessler, J. P., y Cotman, C. W. (2005). Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 133(3), 853-861.
- Bernardino, L., Agasse, F., Silva, B., Ferreira, R., Grade, S., y Malva, J. O. (2008). Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. *Stem Cells*, 26(9), 2361-2371.
- Berton, O., Aguerre, S., Sarrieau, A., Mormede, P., y Chaouloff, F. (1998). Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 82(1), 147-159.
- Berton, O., y Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, 7(2), 137-151.
- Besedovsky, H., Del Rey, A., Sorkin, E., y Dinarello, C. A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 233(4764), 652-654.
- Biegon, A., Rainbow, T. C., y McEwen, B. S. (1985). Corticosterone modulation of neurotransmitter receptors in rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*, 332(2), 309-314.
- Bielajew, C., Konkle, A. T., Kentner, A. C., Baker, S. L., Stewart, A., Hutchins, A. A., Santa-Maria Barbagallo, L., y Fouriez, G. (2003). Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress*, 6(4), 269-280.

- Bierhaus, A., Wolf, J., Andrassy, M., Rohleder, N., Humpert, P. M., Petrov, D., Ferstl, R., Von Eynatten, M., Wendt, T., Rudofsky, G., Joswig, M., Morcos, M., Schwaninger, M., McEwen, B., Kirschbaum, C., y Nawroth, P. P. (2003). A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(4), 1920-1925.
- Bijak, M., Zahorodna, A., y Tokarski, K. (2001). Opposite effects of antidepressants and corticosterone on the sensitivity of hippocampal CA1 neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT₄ receptor activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *363*(5), 491-498.
- Biondi, M., y Picardi, A. (1996). Clinical and biological aspects of bereavement and loss-induced depression: a reappraisal. *Psychother Psychosom*, *65*(5), 229-245.
- Birmaher, B., Rabin, B. S., Garcia, M. R., Jain, U., Whiteside, T. L., Williamson, D. E., al-Shabbout, M., Nelson, B. C., Dahl, R. E., y Ryan, N. D. (1994). Cellular immunity in depressed, conduct disorder, and normal adolescents: role of adverse life events. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, *33*(5), 671-678.
- Björkqvist, K. (2001). Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav*, *73*(3), 435-442.
- Black, P. H. (2006). The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. *Med Hypotheses*, *67*(4), 879-891.
- Blakely, R. D., Berson, H. E., Fremeau, R. T., Jr., Caron, M. G., Peek, M. M., Prince, H. K., y Bradley, C. C. (1991). Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature*, *354*(6348), 66-70.
- Blanchard, D. C., Cholvanich, P., Blanchard, R. J., Clow, D. W., Hammer, R. P., Jr., Rowlett, J. K., y Bardo, M. T. (1991). Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. *Brain Res*, *568*(1-2), 61-66.
- Blanchard, D. C., Spencer, R. L., Weiss, S. M., Blanchard, R. J., McEwen, B., y Sakai, R. R. (1995). Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. *Psychoneuroendocrinology*, *20*(2), 117-134.
- Blanchard, R. J., Yudko, E., Dulloog, L., y Blanchard, D. C. (2001). Defense changes in stress nonresponsive subordinate males in a visible burrow system. *Physiol Behav*, *72*(5), 635-642.
- Blanchard, D. C., Mckittrick, C. R., Hardy, M. P., y Blanchard, R. J. (2002). Effects of social stress on hormones, brain and behavior. En: Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E., y Rubin, R. T., (Eds.) *Hormones, brain and behaviour*, (pp. 735-772.) Academic Press: San Diego, CA.
- Bland, S. T., Hargrave, D., Pepin, J. L., Amat, J., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (2003). Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-

- induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 28(9), 1589-1596.
- Blandino, P., Jr., Barnum, C. J., y Deak, T. (2006). The involvement of norepinephrine and microglia in hypothalamic and splenic IL-1beta responses to stress. *J Neuroimmunol*, 173(1-2), 87-95.
- Blandino, P., Jr., Barnum, C. J., Solomon, L. G., Larish, Y., Lankow, B. S., y Deak, T. (2009). Gene expression changes in the hypothalamus provide evidence for regionally-selective changes in IL-1 and microglial markers after acute stress. *Brain Behav Immun*, 23(7), 958-968.
- Blier, P., De Montigny, C., y Chaput, Y. (1987). Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. *J Clin Psychopharmacol*, 7(6 Supl), S24-S35.
- Blier, P., y De Montigny, C. (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*, 15(7), 220-226.
- Blier, P., y De Montigny, C. (1999). Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology*, 21(2 Supl), S91-S98.
- Bocchio-Chiavetto, L., Zanardini, R., Bortolomasi, M., Abate, M., Segala, M., Giacopuzzi, M., Riva, M. A., Marchina, E., Pasqualetti, P., Perez, J., y Gennarelli, M. (2006). Electroconvulsive Therapy (ECT) increases serum Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in drug resistant depressed patients. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16(8), 620-624.
- Bockaert, J., y Dumuis, A. (1997). Localization of 5-HT₄ receptors in vertebrate brain and their potential behavioral roles. En: Bioscience, L. (Ed.), *5-HT₄ Receptor in the Brain and Periphery*. (pp. 63-86). Austin, TX, USA.
- Bockaert, J., Fagni, L., y Dumuis, A. (1997). 5-HT₄ receptors: an update. En: Baumgarten, H.G., y Göthert, M. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology: Serotonergic Neurons and 5-HT receptors in the CNS*. (pp. 439-465). Springer-Verla, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., y Dumuis, A. (2004). 5-HT₄ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3(1), 39-51.
- Bohus, B., Benus, R. F., Fokkema, D. S., Koolhaas, J. M., Nyakas, C., Van Oortmerssen, G. A., Prins, A. J., De Ruiter, A. J., Scheurink, A. J., y Steffens, A. B. (1987). Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. En: De Kloet, E. R., Wiegant, V. M., y De Wied, D. (Eds.) *Progress in brain research: Neuropeptides and brain function*. (pp. 57-70). Elsevier, Amsterdam.
- Bohus, B., y Koolhaas, J. M. (1993). Stress and the cardiovascular system: Central and peripheral physiological mechanisms. En: Stanford, S. C., y Salmon, P. (Eds.) *Stress: From synapse to*

- syndrome*. (pp. 75-117). Academic Press Ltd, Harcourt Brace & Company, London.
- Bohus, B., Koolhaas, J. M., Heijnen, C. J., y De Boer, O. (1993). Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology*, 28(1-2), 95-99.
- Boldrini, M., Underwood, M. D., Mann, J. J., y Arango, V. (2008). Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res*, 42(6), 433-442.
- Bolhuis, J. E., Parmentier, H. K., Schouten, W. G., Schrama, J. W., y Wiegant, V. M. (2003). Effects of housing and individual coping characteristics on immune responses of pigs. *Physiol Behav*, 79(2), 289-296.
- Bonaventure, P., Hall, H., Gommeren, W., Cras, P., Langlois, X., Jurzak, M., y Leysen, J. E. (2000). Mapping of serotonin 5-HT(4) receptor mRNA and ligand binding sites in the post-mortem human brain. *Synapse*, 36(1), 35-46.
- Bortolozzi, A., Amargos-Bosch, M., Toth, M., Artigas, F., y Adell, A. (2004). In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT1A receptor knockout mice. *J Neurochem*, 88(6), 1373-1379.
- Bowen, D. M., Najlerahim, A., Procter, A. W., Francis, P. T., y Murphy, E. (1989). Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23), 9504-9508.
- Bradbury, M. J., Akana, S. F., y Dallman, M. F. (1994). Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology*, 134(3), 1286-1296.
- Brady, L. S., Gold, P. W., Herkenham, M., Lynn, A. B., y Whitfield, H. J., Jr. (1992). The antidepressants fluoxetine, idazoxan and phenelzine alter corticotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain: therapeutic implications. *Brain Res*, 572(1-2), 117-125.
- Brain, P. (1972). Endocrine and behavioural differences between dominant and subordinate male house mice in pairs. *Psychonomic Science*, 28, 260-262.
- Brattsand, R., y Linden, M. (1996). Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther*, 10 (Supl 2), 81-90.
- Breder, C. D., Tsujimoto, M., Terano, Y., Scott, D. W., y Saper, C. B. (1993). Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol*, 337(4), 543-567.
- Breder, C. D., Dinarello, C. A., y Saper, C. B. (1988). Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science*, 240(4850), 321-324.

- Bull, S. J., Huez-Diaz, P., Binder, E. B., Cubells, J. F., Ranjith, G., Maddock, C., Miyazaki, C., Alexander, N., Hotopf, M., Cleare, A. J., Norris, S., Cassidy, E., Aitchison, K. J., Miller, A. H., y Pariante, C. M. (2009). Functional polymorphisms in the interleukin-6 and serotonin transporter genes, and depression and fatigue induced by interferon-alpha and ribavirin treatment. *Mol Psychiatry*, *14*(12), 1095-1104.
- Buntinx, M., Moreels, M., Vandenabeele, F., Lambrichts, I., Raus, J., Steels, P., Stinissen, P., y Ameloot, M. (2004). Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res*, *76*(6), 834-845.
- Buske-Kirschbaum, A., Geiben, A., y Hellhammer, D. (2001). Psychobiological aspects of atopic dermatitis: an overview. *Psychother Psychosom*, *70*(1), 6-16.
- Butterweck, V., Winterhoff, H., y Herkenham, M. (2001). St John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short-term and long-term administration in normal and stressed rats. *Mol Psychiatry*, *6*(5), 547-564.
- Butterweck, V., Prinz, S., y Schwaninger, M. (2003). The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behav Brain Res*, *144*(1-2), 49-56.
- Buwalda, B., De Boer, S. F., Schmidt, E. D., Felszeghy, K., Nyakas, C., Sgoifo, A., Van der Vegt, B. J., Tilders, F. J., Bohus, B., y Koolhaas, J. M. (1999). Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. *J Neuroendocrinol*, *11*(7), 513-520.
- Buwalda, B., Felszeghy, K., Horvath, K. M., Nyakas, C., De Boer, S. F., Bohus, B., y Koolhaas, J. M. (2001a). Temporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat. *Physiol Behav*, *72*(3), 349-354.
- Buwalda, B., Blom, W. A., Koolhaas, J. M., y Van Dijk, G. (2001b). Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. *Physiol Behav*, *73*(3), 371-377.
- Cacho, R., Fano, E., Areso, P., Garmendia, L., Vegas, O., Brain, P. F., y Azpiroz, A. (2003). Endocrine and lymphoproliferative response changes produced by social stress in mice. *Physiol Behav*, *78*(3), 505-512.
- Calabrese, F., Molteni, R., Maj, P. F., Cattaneo, A., Gennarelli, M., Racagni, G., y Riva, M. A. (2007). Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts and in the subcellular localization of the neurotrophin protein. *Neuropsychopharmacology*, *32*(11), 2351-2359.
- Cannon, W. B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*, New York: Appleton.
- Cannon, W. B. (1929a). *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage*. New York: Appleton.

- Cannon, W. B. (1929b). Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev*, 9, 399-431.
- Cannon, W. B. (1939). *The Wisdom of the Body*. New York: Norton.
- Capuron, L., Neurauder, G., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Nemeroff, C. B., Fuchs, D., y Miller, A. H. (2003). Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry*, 54(9), 906-914.
- Capuron, L., y Miller, A. H. (2004). Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biol Psychiatry*, 56(11), 819-824.
- Cardone, J., Le Friec, G., Vantourout, P., Roberts, A., Fuchs, A., Jackson, I., Suddason, T., Lord, G., Atkinson, J.P., Cope, A., Hayday, A., y Kemper, C. (2010). Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat Immunol*, 11(9), 862-871.
- Carr, D. J. J., y Blalock, J. E. (1991). Neuropeptide hormones and receptors common to the immune and neuroendocrine systems: Bidirectional pathway of intersystem communication. En: Ader, R., Felten, D. L., y Cohen, N. (Eds.). *Psychoneuroimmunology*, 2ª Edn. (pp. 573-588). New York: Academic Press.
- Carroll, J. C., Boyce-Rustay, J. M., Millstein, R., Yang, R., Wiedholz, L. M., Murphy, D. L., y Holmes, A. (2007). Effects of mild early life stress on abnormal emotion-related behaviors in 5-HTT knockout mice. *Behav Genet*, 37(1), 214-222.
- Carver, C. S., Scheier, M. F., y Weintraub, J. K. (1989). Assessing coping strategies: a theoretically based approach. *J Pers Soc Psychol*, 56(2), 267-283.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., y Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301(5631), 386-389.
- Castren, E. (2005). Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*, 6(3), 241-246.
- Castren, E., Voikar, V., y Rantamaki, T. (2007). Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*, 7(1), 18-21.
- Cato, A. C., y Wade, E. (1996). Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*, 18(5), 371-378.
- Cavigelli, S. A., y McClintock, M. K. (2003). Fear of novelty in infant rats predicts adult corticosterone dynamics and an early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 16131-16136.
- Celada, P., Siuciak, J. A., Tran, T. M., Altar, C. A., y Tepper, J. M. (1996). Local infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies the firing pattern of dorsal raphe serotonergic neurons. *Brain Research*, 712(2), 293-298.

- Chalmers, D. T., Kwak, S. P., Mansour, A., Akil, H., y Watson, S. J. (1993). Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT_{1A} receptor mRNA expression. *J Neurosci*, *13*(3), 914-923.
- Chalmers, D. T., López, J. F., Vázquez, D. M., Akil, H., y Watson, S. J. (1994). Regulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptor gene expression by dexamethasone. *Neuropsychopharmacology*, *10*(3), 215-222.
- Chan, J. P., Unger, T. J., Byrnes, J., y Ríos, M. (2006). Examination of behavioral deficits triggered by targeting Bdnf in fetal or postnatal brains of mice. *Neuroscience*, *142*(1), 49-58.
- Chao, H. M., Choo, P. H., y McEwen, B. S. (1989). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neuroendocrinology*, *50*(4), 365-371.
- Chao, H. M., Sakai, R. R., Ma, L. Y., y McEwen, B. S. (1998). Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology*, *139*(7), 3112-3118.
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, *4*(4), 299-309.
- Chaput, Y., De Montigny, C., y Blier, P. (1991). Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat. *Neuropsychopharmacology*, *5*(4), 219-229.
- Charney, D. S. (1998). Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry*, *59* (Supl 14), 11-14.
- Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., y Young, L. T. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, *50*(4), 260-265.
- Chen, M. J., Nguyen, T. V., Pike, C. J., y Russo-Neustadt, A. A. (2007). Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. *Cell Signal*, *19*(1), 114-128.
- Cherry, N. M., Chen, Y., y McDonald, J. C. (2006). Reported incidence and precipitating factors of work-related stress and mental ill-health in the United Kingdom (1996-2001). *Occup Med (Lond)*, *56*(6), 414-421.
- Chrousos, G. P., y Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, *267*(9), 1244-1252.
- Churchill, L., Taishi, P., Wang, M., Brandt, J., Cearley, C., Rehman, A., y Krueger, J. M. (2006). Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1 β or tumor necrosis factor α . *Brain Res*, *1120*(1), 64-73.
- Cintra, A., Solfrini, V., Agnati, L. F., Gustafsson, J. A., y Fuxe, K. (1991). Strongly glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the neonatal rat brain. *Neuroreport*, *2*(2), 85-88.

- Clark, J., Vagenas, P., Panesar, M., y Cope, A. P. (2005). What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann Rheum Dis*, 64 (Supl 4), iv70-iv76.
- Clement, H. W., Schafer, F., Ruwe, C., Gemsa, D., y Wesemann, W. (1993). Stress-induced changes of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations followed in the nucleus raphe dorsalis and the frontal cortex of the rat. *Brain Res*, 614(1-2), 117-124.
- Clifford, E. M., Gartside, S. E., Umbers, V., Cowen, P. J., Hajos, M., y Sharp, T. (1998). Electrophysiological and neurochemical evidence that pindolol has agonist properties at the 5-HT_{1A} autoreceptor in vivo. *Br J Pharmacol*, 124(1), 206-212.
- Cocke, R., Moynihan, J. A., Cohen, N., Grotta, L. J., y Ader, R. (1993). Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune responses in BALB/c mice. *Brain Behav Immun*, 7(1), 36-46.
- Cohen, J. J. (1987). Methodological issues in behavioral immunology. *Immunology Today*, 8, 33-34.
- Cohen, S., y Williamson, G. M. (1991). Stress and infectious disease in humans. *Psychol Bull*, 109(1), 5-24.
- Cohen, S., y Herbert, T. B. (1996). Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol*, 47, 113-142.
- Cohen, S., Miller, G. E., y Rabin, B. S. (2001). Psychological stress and antibody response to immunization: a critical review of the human literature. *Psychosom Med*, 63(1), 7-18.
- Cohen, S., y Hamrick, N. (2003). Stable individual differences in physiological response to stressors: implications for stress-elicited changes in immune related health. *Brain Behav Immun*, 17(6), 407-414.
- Compan, V., Daszuta, A., Salin, P., Sebben, M., Bockaert, J., y Dumuis, A. (1996). Lesion study of the distribution of serotonin 5-HT₄ receptors in rat basal ganglia and hippocampus. *Eur J Neurosci*, 8(12), 2591-2598.
- Compan, V., Zhou, M., Grailhe, R., Gazzara, R. A., Martin, R., Gingrich, J., Dumuis, A., Brunner, D., Bockaert, J., y Hen, R. (2004). Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT₄ receptor knock-out mice. *J Neurosci*, 24(2), 412-419.
- Conductier, G., Dusticier, N., Lucas, G., Cote, F., Debonnel, G., Daszuta, A., Dumuis, A., Nieoullon, A., Hen, R., Bockaert, J., y Compan, V. (2006). Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT₄ receptor knock-out mouse. *Eur J Neurosci*, 24(4), 1053-1062.
- Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., y Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*, 17(7), 2295-2313.

- Connor, B., Young, D., Yan, Q., Faull, R. L., Synek, B., y Dragunow, M. (1997). Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 49(1-2), 71-81.
- Connor, T. J., Brewer, C., Kelly, J. P., y Harkin, A. (2005). Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 beta independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. *J Neuroimmunol*, 159(1-2), 119-128.
- Constantino, R. E., Sekula, L. K., Rabin, B., y Stone, C. (2000). Negative life experiences, depression, and immune function in abused and nonabused women. *Biol Res Nurs*, 1(3), 190-198.
- Cope, A. P. (2003). Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42(6), 716-731.
- Coppell, A. L., Pei, Q., y Zetterstrom, T. S. (2003). Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*, 44(7), 903-910.
- Crusio, W. E., Schwegler, H., y Van Abeelen, J. H. (1991). Behavioural and neuroanatomical divergence between two sublines of C57BL/6J inbred mice. *Behav Brain Res*, 42(1), 93-97.
- Cryan, J. F., Markou, A., y Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 23(5), 238-245.
- Cryan, J. F., y Mombereau, C. (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*, 9(4), 326-357.
- Dahlstrom, A., y Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7), 398-399.
- Dallman, M. F., Levin, N., Cascio, C. S., Akana, S. F., Jacobson, L., y Kuhn, R. W. (1989). Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropic secretion by corticosteroids is mediated via type I corticosterone-preferring receptors. *Endocrinology*, 124(6), 2844-2850.
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Walker, C. D., Strack, A. M., y Cascio, C. S. (1992). Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 4 (5), 517-526.
- Dalvi, A., y Lucki, I. (1999). Murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 147(1), 14-16.
- Danese, A., Moffitt, T. E., Pariante, C. M., Ambler, A., Poulton, R., y Caspi, A. (2008). Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment. *Arch Gen Psychiatry*, 65(4), 409-415.
- Dantzer, R., Wollman, E., Vitkovic, L., y Yirmiya, R. (1999). Cytokines and depression: fortuitous or

causative association? *Mol Psychiatry*, 4(4), 328-332.

- Dantzer, R., Capuron, L., Irwin, M. R., Miller, A. H., Ollat, H., Perry, V. H., Rousey, S., y Yirmiya, R. (2008a). Identification and treatment of symptoms associated with inflammation in medically ill patients. *Psychoneuroendocrinology*, 33(1), 18-29.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., y Kelley, K. W. (2008b). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 46-56.
- Daws, L. C., Munn, J. L., Valdez, M. F., Frosto-Burke, T., y Hensler, J. G. (2007). Serotonin transporter function, but not expression, is dependent on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): in vivo studies in BDNF-deficient mice. *J Neurochem*, 101(3), 641-651.
- De Boer, S. F., y Koolhaas, J. M. (2005). 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol*, 526(1-3), 125-139.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., y Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, 24(4), 488-522.
- De Goeij, D. C., Binnekade, R., y Tilders, F. J. (1992). Chronic stress enhances vasopressin but not corticotropin-releasing factor secretion during hypoglycemia. *Am J Physiol*, 263(2 Pt 1), E394-399.
- De Kloet, E. R., Sybesma, H., y Reul, H. M. (1986). Selective control by corticosterone of serotonin1 receptor capacity in raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology*, 42(6), 513-521.
- De Kloet, E. R., y Reul, J. M. (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, 12(2), 83-105.
- De Kloet, E. R. (1991). Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol*, 12, 95-164.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S., y Jöels, M. (1993). Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol*, 13(4), 433-455.
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., y Jöels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19(3), 269-301.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S., y Jöels, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*, 22(10), 422-426.
- De Kloet, E. R., Jöels, M., y Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6(6), 463-475.

- De Kloet, E. R., Derijk, R. H., y Meijer, O. C. (2007). Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3(2), 168-179.
- Deak, T., Bordner, K. A., McElderry, N. K., Barnum, C. J., Blandino, P., Jr., Deak, M. M., y Tammariello, S. P. (2005). Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. *Brain Res Bull*, 64(6), 541-556.
- DeBattista, C., Belanoff, J., Glass, S., Khan, A., Horne, R. L., Blasey, C., Carpenter, L. L., y Alva, G. (2006). Mifepristone versus placebo in the treatment of psychosis in patients with psychotic major depression. *Biol Psychiatry*, 60(12), 1343-1349.
- Deltheil, T., Tanaka, K., Reperant, C., Hen, R., David, D. J., y Gardier, A. M. (2009). Synergistic neurochemical and behavioural effects of acute intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor and antidepressants in adult mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-11.
- Den Boer, J. A., Bosker, F. J., y Slaap, B. R. (2000). Serotonergic drugs in the treatment of depressive and anxiety disorders. *Hum Psychopharmacol*, 15(5), 315-336.
- Deuschle, M., Schmider, J., Weber, B., Standhardt, H., Korner, A., Lammers, C. H., Schweiger, U., Hartmann, A., y Heuser, I. (1997). Pulse-dosing and conventional application of doxepin: effects on psychopathology and hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) system. *J Clin Psychopharmacol*, 17(3), 156-160.
- Deutch, A. Y., y Roth, R. H. (1990). The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system. *Prog Brain Res*, 85, 367-402.
- Devoino, L. V., Al'perina, E. L., Podgornaya, E. K., Polyakov, O. V., Idova, G. V., y Il'yuchenok, R. Y. (2003). Nature of the distribution of serotonin and a serotonin metabolite in brain structures and the development of immunosuppression in submissive mice. *Neurosci Behav Physiol*, 33(5), 473-477.
- Dhabhar, F. S., y McEwen, B. S. (1996). Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol*, 156(7), 2608-2615.
- Dhabhar, F. S., y McEwen, B. S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun*, 11(4), 286-306.
- Dhabhar, F. S., y McEwen, B. S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3), 1059-1064.
- Dhabhar, F. S., Satoskar, A. R., Bluethmann, H., David, J. R., y McEwen, B. S. (2000). Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2846-2851.
- Dhabhar, F. S., y McEwen, B. S. (2001). Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: Possible explanations for paradoxical observations. En: Ader, R.,

- Felten, D. L., y Cohen, N. (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 3ª Edn. (pp. 301-338). San Diego, CA: Academic Press.
- Dhabhar, F. S. (2009). Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 300-317.
- Di Stefano, P. S., Friedman, B., Radziejewski, C., Alexander, C., Boland, P., Schick, C. M., Lindsay, R. M., y Wiegand, S. J. (1992). The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*, 8(5), 983-993.
- Dias, B. G., Banerjee, S. B., Duman, R. S., y Vaidya, V. A. (2003). Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*, 45(4), 553-563.
- Dickerson, S. S., Kemeny, M. E., Aziz, N., Kim, K. H., y Fahey, J. L. (2004). Immunological effects of induced shame and guilt. *Psychosom Med*, 66(1), 124-131.
- Dijkstra, H., Tilders, F. J., Hiehle, M. A., y Smelik, P. G. (1992). Hormonal reactions to fighting in rat colonies: prolactin rises during defence, not during offence. *Physiol Behav*, 51(5), 961-968.
- Dinan, T. G. (1994). Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry*, 164(3), 365-371.
- Djalali, S., Holtje, M., Grosse, G., Rothe, T., Stroh, T., Grosse, J., Deng, D. R., Hellweg, R., Grantyn, R., Hörtnagl, H., y Ahnert-Hilger, G. (2005). Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem*, 92(3), 616-627.
- Donovan, M. J., Miranda, R. C., Kraemer, R., McCaffrey, T. A., Tessarollo, L., Mahadeo, D., Sharif, S., Kaplan, D. R., Tsoulfas, P., Parada, L., Toran-Allerand, C. D., Hajjar, D. P., y Hempstead, B. L. (1995). Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol*, 147(2), 309-324.
- Dopp, J. M., Miller, G. E., Myers, H. F., y Fahey, J. L. (2000). Increased natural killer-cell mobilization and cytotoxicity during marital conflict. *Brain Behav Immun*, 14(1), 10-26.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., y Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, 67(5), 446-457.
- Duarte, F. S., Andrade, E. S., Vieira, R. A., Uieara, M., Nunes, R. J., y De Lima, T. C. (2006). Synthesis and antidepressant-like action of stereoisomers of imidobenzene-sulfonylaziridines in mice evaluated in the forced swimming test. *Bioorg Med Chem*, 14(15), 5397-5401.

- Duman, R. S. (2004a). Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, 56(3), 140-145.
- Duman, R. S. (2004b). Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med*, 5(1), 11-25.
- Duman, R. S. (2007). A silver bullet for the treatment of depression? *Neuron*, 55(5), 679-681.
- Duman, R. S., y Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59(12), 1116-1127.
- Dunn, A. J., Wang, J., y Ando, T. (1999). Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol*, 461, 117-127.
- Durany, N., Michel, T., Zochling, R., Boissl, K. W., Cruz-Sanchez, F. F., Riederer, P., y Thome, J. (2001). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr Res*, 52(1-2), 79-86.
- Dwivedi, Y., Rao, J. S., Rizavi, H. S., Kotowski, J., Conley, R. R., Roberts, R. C., Tamminga, C.A., y Pandey, G.N. (2003). Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 60(3), 273-282.
- Eaton, M. J., y Whitemore, S. R. (1996). Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol*, 140(2), 105-114.
- Eglen, R. M., Wong, E. H., Dumuis, A., y Bockaert, J. (1995a). Central 5-HT₄ receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 16(11), 391-398.
- Eglen, R. M., Bonhaus, D. W., Johnson, L. G., Leung, E., y Clark, R. D. (1995b). Pharmacological characterization of two novel and potent 5-HT₄ receptor agonists, RS 67333 and RS 67506, in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 115(8), 1387-1392.
- Eleftheriadis, T., Kartsios, C., Yiannaki, E., Kazila, P., Antoniadis, G., Liakopoulos, V., y Markala, D. (2008). Chronic inflammation and CD16⁺ natural killer cell zeta-chain downregulation in hemodialysis patients. *Blood Purif*, 26(4), 317-321.
- Eleftheriadis, T., Kartsios, C., Yiannaki, E., Antoniadis, G., Kazila, P., Pliakos, K., Liakopoulos, V., y Markala, D. (2009). Decreased CD3⁺CD16⁺ natural killer-like T-cell percentage and zeta-chain expression accompany chronic inflammation in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*, 14(5), 471-475.
- Engel, G. L., y Schmale, A. H. (1972). Conservation-withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis. *Ciba Found Symp*, 8, 57-75.
- Evans, D. L., Ten Have, T. R., Douglas, S. D., Gettes, D. R., Morrison, M., Chiappini, M. S., Brinker-Spence, P., Job, C., Mercer, D.E., Wang, Y.L., Cruess, D., Dube, B., Dalen, E.A., Brown, T., Bauer, R., y Petitto, J.M. (2002). Association of depression with viral load, CD8 T

lymphocytes, and natural killer cells in women with HIV infection. *Am J Psychiatry*, 159(10), 1752-1759.

- Evans, D. L., Charney, D. S., Lewis, L., Golden, R. N., Gorman, J. M., Krishnan, K. R., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., Carney, R.M., Coyne, J.C., DeLong, M.R., Frasure-Smith, N., Glassman, A.H., Gold, P.W., Grant, I., Gwyther, L., Ironson, G., Johnson, R.L., Kanner, A.M., Katon, W.J., Kaufmann, P.G., Keefe, F.J., Ketter, T., Laughren, T.P., Leserman, J., Lyketsos, C.G., McDonald, W.M., McEwen, B.S., Miller, A.H., Musselman, D., O'Connor, C., Petitto, J.M., Pollock, B.G., Robinson, R.G., Roose, S.P., Rowland, J., Sheline, Y., Sheps, D.S., Simon, G., Spiegel, D., Stunkard, A., Sunderland, T., Tibbits Jr., P., y Valvo, W.J. (2005). Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry*, 58(3), 175-189.
- Fabre, L. F. (1990). Buspirone in the management of major depression: a placebo-controlled comparison. *J Clin Psychiatry*, 51, S55-S61.
- Fairchild, G., Leitch, M. M., y Ingram, C. D. (2003). Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT1A receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 45(7), 925-934.
- Fano, E., Sanchez-Martin, J. R., Arregi, A., Castro, B., Alonso, A., Brain, P., y Azpiroz, A. (2001). Social stress paradigms in male mice: Variations in behavior, stress and immunology. *Physiol Behav*, 73(1-2), 165-173.
- Fawcett, J. P., Bamji, S. X., Causing, C. G., Aloyz, R., Ase, A. R., Reader, T. A., McLean, J.H., y Miller, F.D. (1998). Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neurosci*, 18(8), 2808-2821.
- Felger, J. C., Alagbe, O., Hu, F., Mook, D., Freeman, A. A., Sanchez, M. M., Kalin, N.H., Ratti, E., Nemeroff, C.B., y Miller, A.H. (2007). Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry*, 62(11), 1324-1333.
- Fessel, W. J., y Solomon, G. F. (1960). Psychosis and systemic lupus erythematosus: a review of the literature and case reports. *Calif Med*, 92, 266-270.
- Flores, B. H., Kenna, H., Keller, J., Solvason, H. B., y Schatzberg, A. F. (2006). Clinical and biological effects of mifepristone treatment for psychotic depression. *Neuropsychopharmacology*, 31(3), 628-636.
- Flugge, G. (1995). Dynamics of central nervous 5-HT1A-receptors under psychosocial stress. *J Neurosci*, 15(11), 7132-7140.
- Flugge, G., Kramer, M., Rensing, S., y Fuchs, E. (1998). 5HT1A-receptors and behaviour under chronic stress: selective counteraction by testosterone. *Eur J Neurosci*, 10(8), 2685-2693.
- Folkman, S., y Lazarus, R. S. (1985). If it changes it must be a process: study of emotion and coping during three stages of a college examination. *J Pers Soc Psychol*, 48(1), 150-170.

- Fontana, D. J., Daniels, S. E., Wong, E. H., Clark, R. D., y Eglén, R. M. (1997). The effects of novel, selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptor ligands in rat spatial navigation. *Neuropharmacology*, 36(4-5), 689-696.
- Fox, M. A., Andrews, A. M., Wendland, J. R., Lesch, K. P., Holmes, A., y Murphy, D. L. (2007). A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)*, 195(2), 147-166.
- Frank, E., Kupfer, D. J., Perel, J. M., Cornes, C., Jarrett, D. B., Mallinger, A. G., Thase, M.E., McEachran, A.B., y Grochocinski, V.J. (1990). Three-year outcomes for maintenance therapies in recurrent depression. *Arch Gen Psychiatry*, 47(12), 1093-1099.
- Frank, M. G., Miguel, Z. D., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (2010). Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*, 24(1), 19-30.
- Franklin, M., Craven, R. D., Dowling, B., Campling, G., Elliott, J. M., y Cowen, P. J. (1999). Effect of a long-term low tryptophan diet on the prolactin responses to the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} agonists, 8-OH-DPAT and mCPP in the male rat. *J Psychopharmacol*, 13(1), 58-63.
- Freidin, M., Bennett, M. V., y Kessler, J. A. (1992). Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(21), 10440-10443.
- Fries, E., Hesse, J., Hellhammer, J., y Hellhammer, D. H. (2005). A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10), 1010-1016.
- Froger, N., Palazzo, E., Boni, C., Hanoun, N., Saurini, F., Joubert, C., Dutriez-Casteloot, I., Enache, M., Maccari, S., Barden, N., Cohen-Salmon, C., Hamon, M., y Lanfumey, L. (2004). Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. *J Neurosci*, 24(11), 2787-2796.
- Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., y Seishima, M. (2006). The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem*, 139(4), 655-662.
- Fumagalli, F., Racagni, G., Colombo, E., y Riva, M. A. (2003). BDNF gene expression is reduced in the frontal cortex of dopamine transporter knockout mice. *Mol Psychiatry*, 8(11), 898-899.
- Fumagalli, F., Bedogni, F., Perez, J., Racagni, G., y Riva, M. A. (2004). Corticostriatal brain-derived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. *Eur J Neurosci*, 20(5), 1348-1354.

- Galea, E., Heneka, M. T., Dello Russo, C., y Feinstein, D. L. (2003). Intrinsic regulation of brain inflammatory responses. *Cell Mol Neurobiol*, 23(4-5), 625-635.
- Galter, D., y Unsicker, K. (2000a). Sequential activation of the 5-HT₁(A) serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci*, 15(5), 446-455.
- Galter, D., y Unsicker, K. (2000b). Brain-derived neurotrophic factor and trkB are essential for cAMP-mediated induction of the serotonergic neuronal phenotype. *J Neurosci Res*, 61(3), 295-301.
- Garcia-Bueno, B., Madrigal, J. L., Perez-Nievas, B. G., y Leza, J. C. (2008). Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation after stress in rats. *Endocrinology*, 149(4), 1969-1978.
- Gaspar, P., Cases, O., y Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 1002-1012.
- Gasparotto, O. C., Ignacio, Z. M., Lin, K., y Goncalves, S. (2002). The effect of different psychological profiles and timings of stress exposure on humoral immune response. *Physiol Behav*, 76(2), 321-326.
- Gass, P., Kretz, O., Wolfer, D. P., Berger, S., Tronche, F., Reichardt, H. M., Kellendonk, C., Lipp, H.P., Schmid, W., y Schütz, G. (2000). Genetic disruption of mineralocorticoid receptor leads to impaired neurogenesis and granule cell degeneration in the hippocampus of adult mice. *EMBO Rep*, 1(5), 447-451.
- Gatti, S., y Bartfai, T. (1993). Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res*, 624(1-2), 291-294.
- Gavillet, M., Allaman, I., y Magistretti, P. J. (2008). Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *GLIA*, 56(9), 975-989.
- Gentry, J. J., Barker, P. A., y Carter, B. D. (2004). The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res*, 146, 25-39.
- Gershon, M. D. (2005). Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*, 39(5 Supl 3), S184-S193.
- Gervasoni, N., Aubry, J. M., Bondolfi, G., Osiek, C., Schwald, M., Bertschy, G., y Karege, F. (2005). Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. *Neuropsychobiology*, 51(4), 234-238.
- Giovacchini, G., Lang, L., Ma, Y., Herscovitch, P., Eckelman, W. C., y Carson, R. E. (2005). Differential effects of paroxetine on raphe and cortical 5-HT_{1A} binding: a PET study in monkeys. *Neuroimage*, 28(1), 238-248.
- Givalois, L., Naert, G., Rage, F., Ixart, G., Arancibia, S., y Tapia-Arancibia, L. (2004). A single brain-

- derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci*, 27(3), 280-295.
- Glaser, R., y Kiecolt-Glaser, J. K. (1998). Stress-associated immune modulation: relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. *Am J Med*, 105(3A), S35-42.
- Goggi, J., Pullar, I. A., Carney, S. L., y Bradford, H. F. (2002). Modulation of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in rat brain striatal slices in vitro. *Brain Res*, 941(1-2), 34-42.
- Gold, P. W., y Chrousos, G. P. (1985). Clinical studies with corticotropin releasing factor: implications for the diagnosis and pathophysiology of depression, Cushing's disease, and adrenal insufficiency. *Psychoneuroendocrinology*, 10(4), 401-419.
- Gold, P. W., Goodwin, F. K., y Chrousos, G. P. (1988a). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N Engl J Med*, 319(6), 348-353.
- Gold, P. W., Kling, M. A., Whitfield, H. J., Rabin, D., Margioris, A., Kalogeras, K., Demitrack, M., Loriaux, D.L., y Chrousos, G.P. (1988b). The clinical implications of corticotropin-releasing hormone. *Adv Exp Med Biol*, 245, 507-519.
- Gold, P. W., Goodwin, F. K., y Chrousos, G. P. (1988c). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *N Engl J Med*, 319(7), 413-420.
- Gold, P. W., y Chrousos, G. P. (1999). The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(1), 22-34.
- Gold, P. W., y Chrousos, G. P. (2002). Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry*, 7(3), 254-275.
- Golde, W. T., Gollobin, P., y Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal*, 34(9), 39-43.
- Goldstein, D. S. (2001). *The Autonomic Nervous System in Health and Disease*. New York: Marcel Bekker.
- Goldstein, D. S., y McEwen, B. (2002). Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*, 5(1), 55-58.
- Goncalvesova, E., Micutkova, L., Mravec, B., Ksinantova, L., Krizanova, O., Fabian, J., y Kvetnansky, R. (2004). Changes in gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in the transplanted human heart. *Ann N Y Acad Sci*, 1018, 430-436.
- Gonul, A. S., Akdeniz, F., Taneli, F., Donat, O., Eker, C., y Vahip, S. (2005). Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 255(6), 381-386.

- Gorbunova, A. V. (1998). Catecholamines in rabbit nodose ganglion following exposure to an acute emotional stressor. *Stress*, 2(3), 231-236.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., y Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 1106-1115.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ben-Menachem-Zidon, O., Licht, T., Weidenfeld, J., Ben-Hur, T., y Yirmiya, R. (2008). Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*, 13(7), 717-728.
- Gould, E., Woolley, C. S., y McEwen, B. S. (1990). Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience*, 37(2), 367-375.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., y McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 12(9), 3642-3650.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., y Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 17(7), 2492-2498.
- Graeff, F. G., Silveira, M. C., Nogueira, R. L., Audi, E. A., y Oliveira, R. M. (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res*, 58(1-2), 123-131.
- Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G., y Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1), 129-141.
- Grahn, R. E., Will, M. J., Hammack, S. E., Maswood, S., McQueen, M. B., Watkins, L. R., y Maier, S.F. (1999). Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res*, 826(1), 35-43.
- Greenwood, B. N., Foley, T. E., Day, H. E., Campisi, J., Hammack, S. H., Campeau, S., Maier, S.F., y Fleshner, M. (2003). Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*, 23(7), 2889-2898.
- Grippo, A. J., Francis, J., Beltz, T. G., Felder, R. B., y Johnson, A. K. (2005). Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav*, 84(5), 697-706.
- Groves, J. O. (2007). Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry*, 12(12), 1079-1088.
- Gunther, L., Liebscher, S., Jahkel, M., y Oehler, J. (2008). Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in group- and isolation-housed mice. *Eur J Pharmacol*, 593(1-3), 49-61.

- Gupta, S., Aslakson, E., Gurbaxani, B. M., y Vernon, S. D. (2007). Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability. *Theor Biol Med Model*, 4, 8.
- Hale, K. D., Weigent, D. A., Gauthier, D. K., Hiramoto, R. N., y Ghanta, V. K. (2003). Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. *Life Sci*, 72(13), 1495-1508.
- Harfstrand, A., Fuxe, K., Cintra, A., Agnati, L. F., Zini, I., Wikstrom, A. C., Okret, S., Yu, Z. Y., Goldstein, M., y Steinbusch, H. (1986). Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(24), 9779-9783.
- Hart, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*, 12(2), 123-137.
- Hayley, S., Poulter, M. O., Merali, Z., y Anisman, H. (2005). The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*, 135(3), 659-678.
- He, M., Sibille, E., Benjamin, D., Toth, M., y Shippenberg, T. (2001). Differential effects of 5-HT_{1A} receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis. *Brain Res*, 902(1), 11-17.
- Heerssen, H. M., y Segal, R. A. (2002). Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci*, 25(3), 160-165.
- Hegde, S. S., y Eglén, R. M. (1996). Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB J*, 10(12), 1398-1407.
- Heinrichs, S. C., Pich, E. M., Miczek, K. A., Britton, K. T., y Koob, G. F. (1992). Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res*, 581(2), 190-197.
- Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., y Tecott, L. H. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25), 15049-15054.
- Hellhammer, D. H., y Wade, S. (1993). Endocrine correlates of stress vulnerability. *Psychother Psychosom*, 60(1), 8-17.
- Henry, J. P., y Stephens, P. M. (1977). *Stress, Health and the social environment: a sociobiological approach to medicine*. Berlin: Springer.
- Henry, J. P., Liu, Y. Y., Nadra, W. E., Qian, C. G., Mormede, P., Lemaire, V., Ely, D., y Hendley, E. D. (1993). Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. *Hypertension*, 21(5), 714-723.
- Hensler, J. G., Advani, T., y Monteggia, L. M. (2007). Regulation of serotonin-1A receptor function in inducible brain-derived neurotrophic factor knockout mice after administration of

corticosterone. *Biol Psychiatry*, 62(5), 521-529.

- Herbert, T. B., y Cohen, S. (1993a). Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med*, 55(4), 364-379.
- Herbert, T. B., y Cohen, S. (1993b). Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull*, 113(3), 472-486.
- Hessing, M. J., Coenen, G. J., Vaiman, M., y Renard, C. (1995). Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 45(1-2), 97-113.
- Heuser, I., Yassouridis, A., y Holsboer, F. (1994). The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*, 28(4), 341-356.
- Heuser, I. J., Schweiger, U., Gotthardt, U., Schmider, J., Lammers, C. H., Dettling, M., Yassouridis, A., y Holsboer, F. (1996). Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects. *Am J Psychiatry*, 153(1), 93-99.
- Heuser, I., Bissette, G., Dettling, M., Schweiger, U., Gotthardt, U., Schmider, J., Lammers, C. H., Nemeroff, C. B., y Holsboer, F. (1998). Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and somatostatin in depressed patients and healthy controls: response to amitriptyline treatment. *Depress Anxiety*, 8(2), 71-79.
- Higley, J. D., Mehlman, P. T., Taub, D. M., Higley, S. B., Suomi, S. J., Vickers, J. H., y Linnoila, M. (1992). Cerebrospinal fluid monoamine and adrenal correlates of aggression in free-ranging rhesus monkeys. *Arch Gen Psychiatry*, 49(6), 436-441.
- Hinton, J. W., Rotheiler, E. A., Gemmell, M., y Shewan, D. (1991). Heart rate, anxiety, anger, and arousal reactions to enforced time-wasting: dependence on reactive uncontrol, work involvement, and dominance factors of 'type A'. *Int J Psychophysiol*, 11(2), 115-124.
- Hirschfeld, R. M. (2000). History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry*, 61 (Supl 6), 4-6.
- Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., y Barde, Y. A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*, 9(8), 2459-2464.
- Holmes, A., Murphy, D. L., y Crawley, J. N. (2002). Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)*, 161(2), 160-167.
- Holmes, A., Lit, Q., Murphy, D. L., Gold, E., y Crawley, J. N. (2003a). Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes Brain Behav*, 2(6), 365-380.
- Holmes, A., Yang, R. J., Lesch, K. P., Crawley, J. N., y Murphy, D. L. (2003b). Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for

- anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 28(12), 2077-2088.
- Holmes, T. H., y Rahe, R. H. (1967). The Social Readjustment Rating Scale. *J Psychosom Res*, 11(2), 213-218.
- Holoubek, G., Noldner, M., Treiber, K., y Muller, W. E. (2004). Effect of chronic antidepressant treatment on beta-receptor coupled signal transduction cascade. Which effect matters most? *Pharmacopsychiatry*, 37 (Suppl 2), S113-S119.
- Holsboer, F., y Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*, 17(2), 187-205.
- Holsboer, F. (1999). The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res*, 33(3), 181-214.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477-501.
- Howren, M. B., Lamkin, D. M., y Suls, J. (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, 71(2), 171-186.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., y Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4), 533-554.
- Hu, F., Pace, T. W., y Miller, A. H. (2009). Interferon-alpha inhibits glucocorticoid receptor-mediated gene transcription via STAT5 activation in mouse HT22 cells. *Brain Behav Immun*, 23(4), 455-463.
- Huang, E. J., y Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736.
- Huang, Y. Y., y Kandel, E. R. (2007). 5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala. *J Neurosci*, 27(12), 3111-3119.
- Huhman, K. L., Bunnell, B. N., Mougey, E. H., y Meyerhoff, J. L. (1990). Effects of social conflict on POMC-derived peptides and glucocorticoids in male golden hamsters. *Physiol Behav*, 47(5), 949-956.
- Huhman, K. L., Moore, T. O., Ferris, C. F., Mougey, E. H., y Meyerhoff, J. L. (1991). Acute and repeated exposure to social conflict in male golden hamsters: increases in plasma POMC-peptides and cortisol and decreases in plasma testosterone. *Horm Behav*, 25(2), 206-216.
- Hukelbridge, F. H., Gamal-El-Din, L., y Brain, P. F. (1981). Social status and the adrenal medulla in the house mouse (*Mus musculus*). *Behavioral and Neural Biology*, 33, 345-363.
- Ida, T., Hara, M., Nakamura, Y., Kozaki, S., Tsunoda, S., y Ihara, H. (2008). Cytokine-induced

enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neurosci Lett*, 432(3), 232-236.

Inoue, T., Tsuchiya, K., y Koyama, T. (1994). Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*, 49(4), 911-920.

Invernizzi, R., Bramante, M., y Samanin, R. (1994). Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: role of presynaptic 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol*, 260(2-3), 243-246.

Irving, H. R., Tan, Y. Y., Tochon-Danguy, N., Liu, H., Chetty, N., Desmond, P. V., Pouton, C.W., y Coupar, I.M. (2007). Comparison of 5-HT4 and 5-HT7 receptor expression and function in the circular muscle of the human colon. *Life Sci*, 80(13), 1198-1205.

Irwin, M., Patterson, T., Smith, T. L., Caldwell, C., Brown, S. A., Gillin, J. C., y Grant, I. (1990a). Reduction of immune function in life stress and depression. *Biol Psychiatry*, 27(1), 22-30.

Irwin, M., Caldwell, C., Smith, T. L., Brown, S., Schuckit, M. A., y Gillin, J. C. (1990b). Major depressive disorder, alcoholism, and reduced natural killer cell cytotoxicity. Role of severity of depressive symptoms and alcohol consumption. *Arch Gen Psychiatry*, 47(8), 713-719.

Irwin, M. R., y Miller, A. H. (2007). Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*, 21(4), 374-383.

Isaacson, R. L. (1974). *The limbic system*. Plenum press, New York.

Ishigami, T. (1919). The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. *American Review of Tuberculosis*, 2, 470-484.

Ison, M., Fachinelli, C., y Rodriguez Echandia, E. L. (1996). Effect of the i.c.v. injection of 5,7-dihydroxytryptamine on the aggressive behavior of dominant and submissive pigeons (*Columba livia*). *Pharmacol Biochem Behav*, 53(4), 951-955.

Jacobsen, J. P., y Mørk, A. (2006). Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat. *Brain Res*, 1110(1), 221-225.

Jacobson, L., y Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*, 12(2), 118-134.

Jakeman, L. B., To, Z. P., Eglén, R. M., Wong, E. H., y Bonhaus, D. W. (1994). Quantitative autoradiography of 5-HT4 receptors in brains of three species using two structurally distinct radioligands, [3H]GR113808 and [3H]BIMU-1. *Neuropharmacology*, 33(8), 1027-1038.

Janczak, A. M., Pedersen, L. J., y Gage, F. H. (2003). Aggression, fearfulness and coping styles in

- female pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 81, 13-28.
- Janeway, C. A., y Travers, P. (1997). *The immune system in health and disease*, 3ª Edn. Current Biology/Garland Publishing, New York.
- Jeanneteau, F., Garabedian, M. J., y Chao, M. V. (2008). Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(12), 4862-4867.
- Jennings, K. A., Loder, M. K., Sheward, W. J., Pei, Q., Deacon, R. M., Benson, M. A., Olverman, H.J., Hastie, N.D., Harmar, A.J., Shen, S., y Sharp, T. (2006). Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci*, 26(35), 8955-8964.
- Jensen, P., Rushen, J., y Forkman, B. (1995). Behavioural strategies or just individual variation in behaviour? A lack of evidence for active and passive piglets. *Appl Anim Behav Sci* 43, 135-139.
- Jöels, M., Heslen, W., y De Kloet, E. R. (1991). Mineralocorticoid hormones suppress serotonin-induced hyperpolarization of rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*, 11(8), 2288-2294.
- Jöels, M., y De Kloet, E. R. (1992). Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci*, 15(1), 25-30.
- Jöels, M., y De Kloet, E. R. (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*, 43(1), 1-36.
- Jöels, M., Karst, H., Krugers, H. J., y Lucassen, P. J. (2007). Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol*, 28 (2-3), 72-96.
- Johnson, J. D., O'Connor, K. A., Deak, T., Stark, M., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (2002). Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun*, 16(4), 461-476.
- Juric, D. M., Miklic, S., y Carman-Krzan, M. (2006). Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res*, 1108(1), 54-62.
- Kale-Pradhan, P. B., y Wilhelm, S. M. (2007). Tegaserod for constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Pharmacotherapy*, 27(2), 267-277.
- Kalsbeek, A., Van Heerikhuize, J. J., Wortel, J., y Buijs, R. M. (1996). A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci*, 16(17), 5555-5565.
- Kalueff, A. V., Fox, M. A., Gallagher, P. S., y Murphy, D. L. (2007). Hypolocomotion, anxiety and

serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav*, 6(4), 389-400.

Kaplan, D. R., y Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10(3), 381-391.

Kar, N., y Bastia, B. K. (2006). Post-traumatic stress disorder, depression and generalised anxiety disorder in adolescents after a natural disaster: a study of comorbidity. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*, 2, 17.

Karege, F., Schwald, M., y Cisse, M. (2002a). Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*, 328(3), 261-264.

Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., y Aubry, J. M. (2002b). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*, 109(2), 143-148.

Karege, F., Bondolfi, G., Gervasoni, N., Schwald, M., Aubry, J. M., y Bertschy, G. (2005a). Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*, 57(9), 1068-1072.

Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., y La Harpe, R. (2005b). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*, 136(1-2), 29-37.

Karten, Y. J., Nair, S. M., Van Essen, L., Sibug, R., y Jöels, M. (1999). Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13456-13461.

Katoh-Semba, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsumoto, T., Iwai, M., Mikoshiba, K., y Kato, K. (2001). Induction of brain-derived neurotrophic factor by convulsant drugs in the rat brain: involvement of region-specific voltage-dependent calcium channels. *J Neurochem*, 77(1), 71-83.

Kavelaars, A., y Heijnen, C. J. (2006). Stress, genetics, and immunity. *Brain Behav Immun*, 20(4), 313-316.

Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., y Tanaka, M. (1993). Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett*, 162(1-2), 81-84.

Keeney, A., Jessop, D. S., Harbuz, M. S., Marsden, C. A., Hogg, S., y Blackburn-Munro, R. E. (2006). Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol*, 18(5), 330-338.

Kennett, G. A., Bright, F., Trail, B., Blackburn, T. P., y Sanger, G. J. (1997). Anxiolytic-like actions of

- the selective 5-HT₄ receptor antagonists SB 204070A and SB 207266A in rats. *Neuropharmacology*, 36(4-5), 707-712.
- Kent, S., Bluthé, R. M., Kelley, K. W., y Dantzer, R. (1992). Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci*, 13(1), 24-28.
- Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Zhao, S., Nelson, C. B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H. U., y Kendler, K. S. (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 51(1), 8-19.
- Khansari, D. N., Murgo, A. J., y Faith, R. E. (1990). Effects of stress on the immune system. *Immunol Today*, 11(5), 170-175.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Glaser, R., Gravenstein, S., Malarkey, W. B., y Sheridan, J. (1996). Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7), 3043-3047.
- Kiecolt-Glaser, J. K., y Glaser, R. (2002). Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. *J Psychosom Res*, 53(4), 873-876.
- Kiecolt-Glaser, J. K., McGuire, L., Robles, T. F., y Glaser, R. (2002). Psychoneuroimmunology and psychosomatic medicine: back to the future. *Psychosom Med*, 64(1), 15-28.
- Kinsey, S. G., Bailey, M. T., Sheridan, J. F., y Padgett, D. A. (2008). The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. *Physiol Behav*, 93(3), 628-636.
- Kirby, L. G., Chou-Green, J. M., Davis, K., y Lucki, I. (1997). The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res*, 760(1-2), 218-230.
- Kirchgessner, A. L., Liu, M. T., Howard, M. J., y Gershon, M. D. (1993). Detection of the 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat bowel and pancreas: comparison with 5-HT_{1P} receptors. *J Comp Neurol*, 327(2), 233-250.
- Klaassen, T., Riedel, W. J., Van Praag, H. M., Menheere, P. P., y Griez, E. (2002). Neuroendocrine response to meta-chlorophenylpiperazine and ipsapirone in relation to anxiety and aggression. *Psychiatry Res*, 113(1-2), 29-40.
- Klein, F., Lemaire, V., Sandi, C., Vitiello, S., Van der Logt, J., Laurent, P. E., Neveu, P., Le Moal, M., y Mormède, P. (1992). Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. *Life Sci*, 50(10), 723-731.
- Knapman, A., Heinzmann, J. M., Hellweg, R., Holsboer, F., Landgraf, R., y Touma, C. (2010). Increased stress reactivity is associated with cognitive deficits and decreased hippocampal brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of affective disorders. *J Psychiatr Res*, 44(9), 566-575.
- Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Tsurugizawa, T., Mukai, H., Tanabe, N., Mitsuhashi, K., Kawata,

- M., Kimoto, T., Ooishi, Y., y Kawato, S. (2005). Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*, 335(4), 1002-1007.
- Koo, J. W., y Duman, R. S. (2008). IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(2), 751-756.
- Koolhaas, J. M., Hermann, P. M., Kemperman, C., Bohus, B., Van de Hoofdakker, R. H., y Beersma, D. G. M. (1990). Single social defeat in male rats induces a gradual but long lasting behavioural change: A model of depression? *Neurosci Res Communications*, 7, 35-41.
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., De Rutter, A. J., Meerlo, P., y Sgoifo, A. (1997a). Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl*, 640, 69-72.
- Koolhaas, J. M., Meerlo, P., De Boer, S. F., Strubbe, J. H., y Bohus, B. (1997b). The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(6), 775-782.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A., y Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev*, 23(7), 925-935.
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., Buwalda, B., Van der Vegt, B. J., Carere, C., y Groothuis, A. G. G. (2001). How and why coping systems vary among individuals. En: D.M. Broom (Ed.) *Coping with challenge: Welfare in animals including humans* (pp. 197-209). Dahlem University Press, Berlin.
- Koolhaas, J. M. (2008). Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain Behav Immun*, 22(5), 662-667.
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., Coppens, C. M., y Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles: towards understanding the biology of individual variation. *Front Neuroendocrinol*, 31(3), 307-321.
- Korte, S. M., Beuving, G., Ruesink, W., y Blokhuis, H. J. (1997). Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. *Physiol Behav*, 62(3), 437-441.
- Korte, S. M., Buwalda, B., Meijer, O., De Kloet, E. R., y Bohus, B. (1995). Socially defeated male rats display a blunted adrenocortical response to a low dose of 8-OH-DPAT. *Eur J Pharmacol*, 272(1), 45-50.
- Korte, S. M., Meijer, O. C., De Kloet, E. R., Buwalda, B., Keijser, J., Sluyter, F., Van Oortmerssen, G., y Bohus, B. (1996). Enhanced 5-HT1A receptor expression in forebrain regions of aggressive house mice. *Brain Res*, 736(1-2), 338-343.
- Korte, S. M., Ruesink, W., y Blokhuis, H. J. (1999). Heart rate variability during manual restraint in

- chicks from high- and low-feather pecking lines of laying hens. *Physiol Behav*, 65(4-5), 649-652.
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C., y McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(1), 3-38.
- Kozisek, M. E., Middlemas, D., y Bylund, D. B. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther*, 117(1), 30-51.
- Kraus, M. R., Al-Taie, O., Schafer, A., Pfersdorff, M., Lesch, K. P., y Scheurlen, M. (2007). Serotonin-1A receptor gene HTR1A variation predicts interferon-induced depression in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 132(4), 1279-1286.
- Kravitz, E. A., y Huber, R. (2003). Aggression in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol*, 13(6), 736-743.
- Kreiss, D. S., y Lucki, I. (1995). Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 274(2), 866-876.
- Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., Lee, F. S., Tamminga, C. A., Cooper, D. C., Gershenfeld, H. K., y Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131(2), 391-404.
- Kronfol, Z., y House, J. D. (1984). Depression, cortisol, and immune function. *Lancet*, 1(8384), 1026-1027.
- Kronfol, Z., y Remick, D. G. (2000). Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, 157(5), 683-694.
- Krueger, R., Lewy, E., y Cathcart, E. (1984). Lymphocyte subsets in patients with mayor depression: preliminary findings. *Advances*, 1, 5-9.
- Krugers, H. J., Koolhaas, J. M., Medema, R. M., y Korf, J. (1996). Prolonged subordination stress increases Calbindin-D28k immunoreactivity in the rat hippocampal CA1 area. *Brain Res*, 729(2), 289-293.
- Kudielka, B. M., Hellhammer, D. H., y Wust, S. (2009). Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1), 2-18.
- Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V., y Koryakina, L. A. (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav*, 38(2), 315-320.
- Kunz-Ebrecht, S. R., Mohamed-Ali, V., Feldman, P. J., Kirschbaum, C., y Steptoe, A. (2003). Cortisol

responses to mild psychological stress are inversely associated with proinflammatory cytokines. *Brain Behav Immun*, 17(5), 373-383.

- Kuroda, Y., y McEwen, B. S. (1998). Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 59(1), 35-39.
- Kwon, M. S., Seo, Y. J., Lee, J. K., Lee, H. K., Jung, J. S., Jang, J. E., Park, S. H., y Suh, H. W. (2008). The repeated immobilization stress increases IL-1beta immunoreactivities in only neuron, but not astrocyte or microglia in hippocampal CA1 region, striatum and paraventricular nucleus. *Neurosci Lett*, 430(3), 258-263.
- Laaris, N., Haj-Dahmane, S., Hamon, M., y Lanfumey, L. (1995). Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT1A autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 34(9), 1201-1210.
- Laaris, N., Le Poul, E., Hamon, M., y Lanfumey, L. (1997). Stress-induced alterations of somatodendritic 5-HT1A autoreceptor sensitivity in the rat dorsal raphe nucleus--in vitro electrophysiological evidence. *Fundam Clin Pharmacol*, 11(3), 206-214.
- Laaris, N., Le Poul, E., Laporte, A. M., Hamon, M., y Lanfumey, L. (1999). Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*, 91(3), 947-958.
- Lacosta, S., Merali, Z., y Anisman, H. (2000). Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. *Neuroimmunomodulation*, 8(2), 83-90.
- Lamirault, L., y Simon, H. (2001). Enhancement of place and object recognition memory in young adult and old rats by RS 67333, a partial agonist of 5-HT4 receptors. *Neuropharmacology*, 41(7), 844-853.
- Lanfumey, L., Pardon, M. C., Laaris, N., Joubert, C., Hanoun, N., Hamon, M., y Cohen-Salmon, C. (1999). 5-HT1A autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport*, 10(16), 3369-3374.
- Lanfumey, L., y Hamon, M. (2004). 5-HT1 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3(1), 1-10.
- Laske, C., Stransky, E., Leyhe, T., Eschweiler, G. W., Maetzler, W., Wittorf, A., Soekadar, S., Richartz, E., Koehler N., Bartels, M., Buchkremer, G., y Schot, K. (2007). BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res*, 41(5), 387-394.
- Laudenslager, M. L., Ryan, S. M., Drugan, R. C., Hyson, R. L. y Maier, S. F. (1983). Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science*, 221 (4610), 568-570.
- Laye, S., Parnet, P., Goujon, E., y Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of

- lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 27(1), 157-162.
- Lazarus, R., y Cohen, J. (1977). *Environmental stress. Human Behavior and the environment: current research*. . Alman, I. and Wohill, J.F. (Eds.). New York, Plenum, 88-127.
- Lee, T. H., Yang, J. T., Kato, H., Wu, J. H., y Chen, S. T. (2004). Expression of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in the hippocampal CA1 and cortical areas after chronic ischemia in rats. *J Neurosci Res*, 76(5), 705-712.
- Leitch, M. M., Ingram, C. D., Young, A. H., McQuade, R., y Gartside, S. E. (2003). Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT_{1A} autoreceptor function in the rat: relevance for depression. *Neuropsychopharmacology*, 28(1), 119-125.
- Lelong, V., Dauphin, F., y Boulouard, M. (2001). RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacology*, 41(4), 517-522.
- Lelong, V., Lhonneur, L., Dauphin, F., y Boulouard, M. (2003). BIMU 1 and RS 67333, two 5-HT₄ receptor agonists, modulate spontaneous alternation deficits induced by scopolamine in the mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367(6), 621-628.
- Lerer, B., Gelfin, Y., Gorfine, M., Allolio, B., Lesch, K. P., y Newman, M. E. (1999). 5-HT_{1A} receptor function in normal subjects on clinical doses of fluoxetine: blunted temperature and hormone responses to ipsapirone challenge. *Neuropsychopharmacology*, 20(6), 628-639.
- Lesch, K. P., y Merschdorf, U. (2000). Impulsivity, aggression, and serotonin: a molecular psychobiological perspective. *Behav Sci Law*, 18(5), 581-604.
- Lesch, K. P., y Gutknecht, L. (2004). Focus on The 5-HT_{1A} receptor: emerging role of a gene regulatory variant in psychopathology and pharmacogenetics. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7(4), 381-385.
- Leserman, J., Petitto, J. M., Golden, R. N., Gaynes, B. N., Gu, H., Perkins, D. O., Silva, S. G., Folds, J. D., y Evans, D. L. (2000). Impact of stressful life events, depression, social support, coping, and cortisol on progression to AIDS. *Am J Psychiatry*, 157(8), 1221-1228.
- Leserman, J., Petitto, J. M., Gu, H., Gaynes, B. N., Barroso, J., Golden, R. N., Perkins, D. O., Folds, J. D., y Evans, D. L. (2002). Progression to AIDS, a clinical AIDS condition and mortality: psychosocial and physiological predictors. *Psychol Med*, 32(6), 1059-1073.
- Lewin, G. R., y Barde, Y. A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19, 289-317.
- Li, X. H., Liu, N. B., Zhang, M. H., Zhou, Y. L., Liao, J. W., Liu, X. Q., y Chen, H. W. (2007). Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. *Chin Med J*, 120(8), 669-674.

- Li, S., Wang, C., Wang, W., Dong, H., Hou, P., y Tang, Y. (2008). Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sciences*, 82(17-18), 934-942.
- Licht, C. L., Marcussen, A. B., Wegener, G., Overstreet, D. H., Aznar, S., y Knudsen, G. M. (2009). The brain 5-HT₄ receptor binding is down-regulated in the Flinders Sensitive Line depression model and in response to paroxetine administration. *J Neurochem*, 109(5), 1363-1374.
- Licht, C. L., Knudsen, G. M., y Sharp, T. (2010). Effects of the 5-HT₄ receptor agonist RS67333 and paroxetine on hippocampal extracellular 5-HT levels. *Neurosci Lett*, 476(2), 58-61.
- Licinio, J., y Wong, M. L. (2002). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in stress and affective disorders. *Mol Psychiatry*, 7(6), 519.
- Linkowski, P., Mendlewicz, J., Kerkhofs, M., Leclercq, R., Golstein, J., Brasseur, M., Copinschi, G., y Van Cauter, E. (1987). 24-hour profiles of adrenocorticotropin, cortisol, and growth hormone in major depressive illness: effect of antidepressant treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 65(1), 141-152.
- Linnarsson, S., Bjorklund, A., y Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci*, 9(12), 2581-2587.
- Linthorst, A. C., Flachskamm, C., Muller-Preuss, P., Holsboer, F., y Reul, J. M. (1995). Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci*, 15(4), 2920-2934.
- Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansorge, M. S., Gordon, J. A., Francis, J. H., Moore, M. B., Liraa, J., Underwood, M., Arangoc, V., Kunge, H., Hofer, M., Hen, R., y Gingrich, J. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*, 54(10), 960-971.
- López, J. F., Chalmers, D. T., Little, K. Y., y Watson, S. J. (1998). A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry*, 43(8), 547-573.
- López-Figueroa, A. L., Norton, C. S., López-Figueroa, M. O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., López, J.F., y Watson, S. (2004). Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 55(3), 225-233.
- Lotrich, F. E., Rabinovitz, M., Gironda, P., y Pollock, B. G. (2007). Depression following pegylated interferon-alpha: characteristics and vulnerability. *J Psychosom Res*, 63(2), 131-135.
- Lowry, C. A. (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 14(11), 911-923.

- Lowther, S., De Paermentier, F., Cheetham, S. C., Crompton, M. R., Katona, C. L., y Horton, R. W. (1997). 5-HT_{1A} receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls. *J Affect Disord*, 42(2-3), 199-207.
- Lowy, M. T. (1989). Quantification of type I and II adrenal steroid receptors in neuronal, lymphoid and pituitary tissues. *Brain Res*, 503(2), 191-197.
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*, 10(2), 86-98.
- Lu, B., y Woo, N. B. (2006). Trophic factors in synaptic plasticity and memory. *Neuroscientist*, 12, 43-56.
- Lucas, G., y Debonnel, G. (2002). 5-HT₄ receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. *Eur J Neurosci*, 16(5), 817-822.
- Lucas, G., Compan, V., Charnay, Y., Neve, R. L., Nestler, E. J., Bockaert, J., Barrote, M., y Debonnel, G. (2005). Frontocortical 5-HT₄ receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT₄ agonists. *Biol Psychiatry*, 57(8), 918-925.
- Lucas, G., Rymar, V. V., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., Manta, S., Lambas-Senas, L., Wiborg, O., Haddjeri, N., Piñeyro, G., Sadikot, A. F., y Debonnel, G. (2007). Serotonin(4) (5-HT₄) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55(5), 712-725.
- Lucas, G., Du, J., Romeas, T., Mnie-Filali, O., Haddjeri, N., Pineyro, G., y Debonnel, G. (2010). Selective serotonin reuptake inhibitors potentiate the rapid antidepressant-like effects of serotonin₄ receptor agonists in the rat. *PLoS One*, 5(2), e9253.
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., Wihler C., Koliatsos, V. E., y Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15239-15244.
- Lyte, M., Nelson, S. G., y Baissa, B. (1990). Examination of the neuroendocrine basis for the social conflict-induced enhancement of immunity in mice. *Physiol Behav*, 48(5), 685-691.
- Maddock, C., Landau, S., Barry, K., Maulayah, P., Hotopf, M., Cleare, A. J., Norris, S., y Pariante, C.M. (2005). Psychopathological symptoms during interferon-alpha and ribavirin treatment: effects on virologic response. *Mol Psychiatry*, 10(4), 332-333.
- Madhav, T. R., Pei, Q., y Zetterstrom, T. S. (2001). Serotonergic cells of the rat raphe nuclei express mRNA of tyrosine kinase B (trkB), the high-affinity receptor for brain derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res*, 93(1), 56-63.
- Maes, M., Stevens, W., Peeters, D., DeClerck, L., Scharpe, S., Bridts, C., Schotte, C., y Cosyns, P. (1992). A study on the blunted natural killer cell activity in severely depressed patients. *Life Sci*, 50(7), 505-513.

- Maes, M. (1993). A review on the acute phase response in major depression. *Rev Neurosci*, 4(4), 407-416.
- Maes, M., Bosmans, E., Meltzer, H. Y., Scharpe, S., y Suy, E. (1993a). Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am J Psychiatry*, 150(8), 1189-1193.
- Maes, M., Scharpe, S., Meltzer, H. Y., Bosmans, E., Suy, E., Calabrese, J., y Cosyns, P. (1993b). Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res*, 49(1), 11-27.
- Maes, M., Meltzer, H. Y., Scharpe, S., Bosmans, E., Suy, E., De Meester, I., Calabrese, J., y Cosyns, P. (1993c). Relationships between lower plasma L-tryptophan levels and immune-inflammatory variables in depression. *Psychiatry Res*, 49(2), 151-165.
- Maes, M., Scharpe, S., Meltzer, H. Y., Okayli, G., Bosmans, E., D'Hondt, P., Vanden-Bossche, B.V., y Cosyns, P. (1994). Increased neopterin and interferon-gamma secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression: further evidence for an immune response. *Psychiatry Res*, 54(2), 143-160.
- Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 19(1), 11-38.
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., y Maj, M. (2009). The inflammatory y neurodegenerative (IyND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*, 24(1), 27-53.
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Flugge, G., y Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*, 16(10), 3534-3540.
- Maier, S. F., Watkins, L. R., y Fleshner, M. (1994). Psychoneuroimmunology. The interface between behavior, brain, and immunity. *Am Psychol*, 49(12), 1004-1017.
- Maier, S. F., y Watkins, L. R. (1998). Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev*, 105(1), 83-107.
- Maier, S. F., y Watkins, L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 829-841.
- Malberg, J. E., y Duman, R. S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 28(9), 1562-1571.
- Mamounas, L. A., Blue, M. E., Siuciak, J. A., y Altar, C. A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor

- promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci*, 15(12), 7929-7939.
- Mamounas, L. A., Altar, C. A., Blue, M. E., Kaplan, D. R., Tessarollo, L., y Lyons, W. E. (2000). BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J Neurosci*, 20(2), 771-782.
- Manuel-Apolinar, L., Rocha, L., Pascoe, D., Castillo, E., Castillo, C., y Meneses, A. (2005). Modifications of 5-HT₄ receptor expression in rat brain during memory consolidation. *Brain Res*, 1042(1), 73-81.
- Marchetti, C., y Drent, P. J. (2000). Individual differences in the use of social information in foraging by captive great tits. *Anim Behav*, 60(1), 131-140.
- Marchetti, E., Dumuis, A., Bockaert, J., Soumireu-Mourat, B., y Roman, F. S. (2000). Differential modulation of the 5-HT₄ receptor agonists and antagonist on rat learning and memory. *Neuropharmacology*, 39(11), 2017-2027.
- Maren, S., y Quirk, G. J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci*, 5(11), 844-852.
- Marmigere, F., Givalois, L., Rage, F., Arancibia, S., y Tapia-Arancibia, L. (2003). Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*, 13(5), 646-655.
- Marshall, G. D. Jr., Agarwal, S. K., Lloyd, C., Cohen, L., Henninger, E. M., y Morris, G. J. (1998). Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun*, 12(4), 297-307.
- Marsland, A. L., Bachen, E. A., Cohen, S., Rabin, B., y Manuck, S. B. (2002). Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. *Physiol Behav*, 77(4-5), 711-716.
- Martin, C., Duclos, M., Mormede, P., Manier, G., y Chaouloff, F. (2000). Hippocampal and striatal [(3)H]5-HT reuptake under acute stressors in two rat strains differing for their emotivity. *Neurosci Lett*, 288(3), 246-248.
- Martínez, M., Calvo-Torrent, A., y Pico-Alfonso, M. A. (1998). Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. *Aggressive Behavior*, 24, 241-256.
- Martinowich, K., Manji, H., y Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*, 10(9), 1089-1093.
- Marucha, P. T., Kiecolt-Glaser, J. K., y Favagehi, M. (1998). Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosom Med*, 60(3), 362-365.
- Mason, J. W. (1971). A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res*, 8(3), 323-333.

- Maswood, S., Barter, J. E., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (1998). Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*, 783(1), 115-120.
- Matheson, F. I., Moineddin, R., Dunn, J. R., Creatore, M. I., Gozdyra, P., y Glazier, R. H. (2006). Urban neighborhoods, chronic stress, gender and depression. *Soc Sci Med*, 63(10), 2604-2616.
- Matheson, K., y Anisman, H. (2003). Systems of coping associated with dysphoria, anxiety and depressive illness: a multivariate profile perspective. *Stress*, 6(3), 223-234.
- Mathews, T. A., Fedele, D. E., Coppelli, F. M., Avila, A. M., Murphy, D. L., y Andrews, A. M. (2004). Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *J Neurosci Methods*, 140(1-2), 169-181.
- Matsubara, S., Arora, R. C., y Meltzer, H. Y. (1991). Serotonergic measures in suicide brain: 5-HT_{1A} binding sites in frontal cortex of suicide victims. *J Neural Transm Gen Sect*, 85(3), 181-194.
- Matsumoto, M., Togashi, H., Mori, K., Ueno, K., Ohashi, S., Kojima, T., y Yoshioka, M. (2001). Evidence for involvement of central 5-HT₄ receptors in cholinergic function associated with cognitive processes: behavioral, electrophysiological, and neurochemical studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(3), 676-682.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., y Lo, D. C. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22, 295-318.
- McAllister-Williams, R. H., Anderson, A. J., y Young, A. H. (2001). Corticosterone selectively attenuates 8-OH-DPAT-mediated hypothermia in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 4(1), 1-8.
- McAllister-Williams, R. H., Massey, A. E., y Fairchild, G. (2007). Repeated cortisol administration attenuates the EEG response to buspirone in healthy volunteers: evidence for desensitization of the 5-HT_{1A} autoreceptor. *J Psychopharmacol*, 21(8), 826-832.
- McEwen, B. S., Weiss, J. M., y Schwartz, L. S. (1968). Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*, 220(5170), 911-912.
- McEwen, B. S. (1987). Glucocorticoid-biogenic amine interactions in relation to mood and behavior. *Biochem Pharmacol*, 36(11), 1755-1763.
- McEwen, B. S. (1994). Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann N Y Acad Sci*, 746, 134-142.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 840, 33-44.
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22, 105-122.

- McEwen, B. S. (2000). Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, 22(2), 108-124.
- McEwen, B. S. (2003). Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry*, 54(3), 200-207.
- McEwen, B. S., y Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*, 43(1), 2-15.
- McEwen, B. S. (2004). Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 1032, 1-7.
- McEwen, B. S. (2005). Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*, 54(5 Supl 1), 20-23.
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, 87(3), 873-904.
- McEwen, B. S. (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol*, 583(2-3), 174-185.
- McGeer, P. L., y McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 21(2), 195-218.
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Fanselow, M.S., Wilson, M. A., y Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*, 317(5834), 94-99.
- McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., y Sakai, R. R. (1995). Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry*, 37(6), 383-393.
- McKittrick, C. R., Magariños, A. M., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., y Sakai, R. R. (2000). Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse*, 36(2), 85-94.
- McTigue, D. M., y Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem*, 107(1), 1-19.
- Meaney, M. J., Viau, V., Bhatnagar, S., Betito, K., Iny, L. J., O'Donnell, D., y Mitchell, J. B. (1991). Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 39(2), 265-274.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual

differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*, 24, 1161-1192.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.

Meerlo, P., Overkamp, G. J., Daan, S., Van Den Hoofdakker, R. H., y Koolhaas, J. M. (1996). Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress*, 1(1), 21-32.

Meerlo, P., Overkamp, G. J., y Koolhaas, J. M. (1997). Behavioural and physiological consequences of a single social defeat in Roman high- and low-avoidance rats. *Psychoneuroendocrinology*, 22(3), 155-168.

Meerlo, P., Sgoifo, A., De Boer, S. F., y Koolhaas, J. M. (1999). Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behav Neurosci*, 113(6), 1283-1290.

Meijer, O. C., y De Kloet, E. R. (1994). Corticosterone suppresses the expression of 5-HT1A receptor mRNA in rat dentate gyrus. *Eur J Pharmacol*, 266(3), 255-261.

Meijer, O. C., y De Kloet, E. R. (1998). Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol*, 12(1-2), 1-20.

Merali, Z., Lacosta, S., y Anisman, H. (1997). Effects of interleukin-1beta and mild stress on alterations of norepinephrine, dopamine and serotonin neurotransmission: a regional microdialysis study. *Brain Res*, 761(2), 225-235.

Merlio, J. P., Ernfors, P., Jaber, M., y Persson, H. (1992). Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 51(3), 513-532.

Metalnikov, S., y Chorine, V. (1926). Rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité. *Annales de l'Institut Pasteur*, 40, 893-900.

Micale, V., Leggio, G. M., Mazzola, C., y Drago, F. (2006). Cognitive effects of SL65.0155, a serotonin 5-HT4 receptor partial agonist, in animal models of amnesia. *Brain Res*, 1121(1), 207-215.

Miczek, K. A., Fish, E. W., De Bold, J. F., y De Almeida, R. M. (2002). Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology (Berl)*, 163(3-4), 434-458.

Miller, A. H. (2009). Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: Psychoneuroimmunology at the translational interface. *Brain Behav Immun*, 23(2), 149-158.

- Miller, A. H., Maletic, V., y Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, *65*(9), 732-741.
- Miller, A. H. (2010). Depression and immunity: a role for T cells? *Brain Behav Immun*, *24*(1), 1-8.
- Miller, G. E., Cohen, S., y Herbert, T. B. (1999). Pathways linking major depression and immunity in ambulatory female patients. *Psychosom Med*, *61*(6), 850-860.
- Miller, J. M., Brennan, K. G., Ogden, T. R., Oquendo, M. A., Sullivan, G. M., Mann, J. J., y Parsey, R. V. (2009a). Elevated serotonin 1A binding in remitted major depressive disorder: evidence for a trait biological abnormality. *Neuropsychopharmacology*, *34*(10), 2275-2284.
- Miquel, M. C., Doucet, E., Riad, M., Adrien, J., Verge, D., y Hamon, M. (1992). 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*(4), 357-362.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Takeda, S., Aburada, M., y Tabira, T. (2004). Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J Neurosci*, *24*(24), 5492-5499.
- Mlinar, B., Mascalchi, S., Mannaioni, G., Morini, R., y Corradetti, R. (2006). 5-HT₄ receptor activation induces long-lasting EPSP-spike potentiation in CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*, *24*(3), 719-731.
- Molteni, R., Lipska, B. K., Weinberger, D. R., Racagni, G., y Riva, M. A. (2001). Developmental and stress-related changes of neurotrophic factor gene expression in an animal model of schizophrenia. *Mol Psychiatry*, *6*(3), 285-292.
- Molteni, R., Calabrese, F., Cattaneo, A., Mancini, M., Gennarelli, M., Racagni, G., y Riva, M. A. (2009). Acute stress responsiveness of the neurotrophin BDNF in the rat hippocampus is modulated by chronic treatment with the antidepressant duloxetine. *Neuropsychopharmacology*, *34*(6), 1523-1532.
- Montañez, S., Owens, W. A., Gould, G. G., Murphy, D. L., y Daws, L. C. (2003). Exaggerated effect of fluvoxamine in heterozygote serotonin transporter knockout mice. *J Neurochem*, *86*(1), 210-219.
- Montkowski, A., Barden, N., Wotjak, C., Stec, I., Ganster, J., Meaney, M., Engelmann, M., Reul, J. M. H. M., Landgraf, R., y Holsboer, F. (1995). Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J Neuroendocrinol*, *7*(11), 841-845.
- Moraska, A., Campisi, J., Nguyen, K. T., Maier, S. F., Watkins, L. R., y Fleshner, M. (2002). Elevated IL-1 β contributes to antibody suppression produced by stress. *J Appl Physiol*, *93*(1), 207-215.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., y Kawata, M. (1996). Distribution of

glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26(3), 235-269.

- Moser, P. C., Bergis, O. E., Jegham, S., Lothead, A., Duconseille, E., Terranova, J. P., Caille, D., Berque-Bestel, I., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., Dumuis, A., Bockaert, J., George, P., Soubrie, P., y Scatton, B. (2002). SL65.0155, a novel 5-hydroxytryptamine(4) receptor partial agonist with potent cognition-enhancing properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 302(2), 731-741.
- Mössner, R., Mikova, O., Koutsilieri, E., Saoud, M., Ehlis, A. C., Müller, N., Fallgatter, A. J., y Riederer, P. (2007). Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. *World J Biol Psychiatry*, 8(3), 141-174.
- Müller, N., y Ackenheil, M. (1998). Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22(1), 1-33.
- Muñoz-Fernandez, M. A., y Fresno, M. (1998). The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*, 56(3), 307-340.
- Murray, C. A., y Lynch, M. A. (1998). Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci*, 18(8), 2974-2981.
- Murray, K. T., Mace, L. C., y Yang, Z. (2007). Nonantiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 4(3), 88-90.
- Naert, G., Ixart, G., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L., y Givalois, L. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Mol Cell Neurosci*, 46(1), 55-66.
- Nair, A., Vadodaria, K. C., Banerjee, S. B., Benekareddy, M., Dias, B. G., Duman, R. S., y Vaidya, V. A. (2007). Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 32(7), 1504-1519.
- Nakahashi, T., Fujimura, H., Altar, C. A., Li, J., Kambayashi, J., Tandon, N. N., y Sun, B. (2000). Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*, 470(2), 113-117.
- Naudon, L., El Yacoubi, M., Vaugeois, J. M., Leroux-Nicollet, I., y Costentin, J. (2002). A chronic treatment with fluoxetine decreases 5-HT(1A) receptors labeling in mice selected as a genetic model of helplessness. *Brain Res*, 936(1-2), 68-75.
- Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P.T., y Vale, W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, 226(4680), 1342-1344.

- Nemeroff, C. B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*, 1(4), 336-342.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., y Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13-25.
- Nguyen, K. T., Deak, T., Owens, S. M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L. R., y Maier, S. F. (1998). Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci*, 18(6), 2239-2246.
- Nibuya, M., Morinobu, S., y Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 15(11), 7539-7547.
- Nibuya, M., Nestler, E. J., y Duman, R. S. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*, 16(7), 2365-2372.
- Nibuya, M., Takahashi, M., Russell, D. S., y Duman, R. S. (1999). Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 267(2), 81-84.
- Noga, O., Englmann, C., Hanf, G., Grutzkau, A., Seybold, J., y Kunkel, G. (2003). The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy*, 33(5), 649-654.
- Novikova, L., Novikov, L., y Kellerth, J. O. (1997). Effects of neurotransplants and BDNF on the survival and regeneration of injured adult spinal motoneurons. *Eur J Neurosci*, 9(12), 2774-2777.
- O'Connor, J. C., Lawson, M. A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., y Dantzer, R. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*, 14(5), 511-522.
- Oitzl, M. S., y De Kloet, E. R. (1992). Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci*, 106(1), 62-71.
- Oitzl, M. S., Fluttert, M., y De Kloet, E. R. (1994). The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur J Neurosci*, 6(7), 1072-1079.
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., Van Der Veen, R., y De Kloet, E. R. (2010). Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev*, 34(6), 853-866.
- Okugawa, G., Omori, K., Suzukawa, J., Fujiseki, Y., Kinoshita, T., y Inagaki, C. (1999). Long-term treatment with antidepressants increases glucocorticoid receptor binding and gene expression in cultured rat hippocampal neurones. *J Neuroendocrinol*, 11(11), 887-895.

- Ou, X. M., Storring, J. M., Kushwaha, N., y Albert, P. R. (2001). Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem*, 276(17), 14299-14307.
- Øverli, O., Harris, C. A., y Winberg, S. (1999). Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav Evol*, 54(5), 263-275.
- Øverli, O., Sorensen, C., Pulman, K. G., Pottinger, T. G., Korzan, W., Summers, C. H., y Nilsson, G.E. (2007). Evolutionary background for stress-coping styles: relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neurosci Biobehav Rev*, 31(3), 396-412.
- Overstreet, D. H., Janowsky, D. S., Pucilowski, O., y Rezvani, A. H. (1994). Swim test immobility co-segregates with serotonergic but not cholinergic sensitivity in cross-breeds of Flinders Line rats. *Psychiatr Genet*, 4(2), 101-107.
- Overstreet, D. H., Friedman, E., Mathe, A. A., y Yadid, G. (2005). The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 739-759.
- Owens, M. J., y Nemeroff, C. B. (1993). The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. *Ciba Found Symp*, 172, 296-308.
- Pace, T. W., Mletzko, T. C., Alagbe, O., Musselman, D. L., Nemeroff, C. B., Miller, A. H., y Heim, C. M. (2006). Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry*, 163(9), 1630-1633.
- Pace, T. W., Hu, F., y Miller, A. H. (2007). Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun*, 21(1), 9-19.
- Padgett, D. A., Marucha, P. T., y Sheridan, J. F. (1998). Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav Immun*, 12(1), 64-73.
- Pan, W., Banks, W. A., Fasold, M. B., Bluth, J., y Kastin, A. J. (1998). Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*, 37(12), 1553-1561.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W., Hempstead, B. L. y Lu B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695), 487-491.
- Pang, T. Y., Stam, N. C., Nithianantharajah, J., Howard, M. L., y Hannan, A. J. (2006). Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*, 141(2), 569-584.

- Papolos, D. F., Edwards, E., Marmur, R., Lachman, H. M., y Henn, F. A. (1993). Effects of the antigluocorticoid RU 38486 on the induction of learned helpless behavior in Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, *615*(2), 304-309.
- Pardon, M. C., Kendall, D. A., Perez-Diaz, F., Duxon, M. S., y Marsden, C. A. (2004). Repeated sensory contact with aggressive mice rapidly leads to an anticipatory increase in core body temperature and physical activity that precedes the onset of aversive responding. *Eur J Neurosci*, *20*(4), 1033-1050.
- Pardon, M. C., Roberts, R. E., Marsden, C. A., Bianchi, M., Latif, M. L., Duxon, M. S., y Kendall D.A. (2005). Social threat and novel cage stress-induced sustained extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation but differential modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of NMRI mice. *Neuroscience*, *132*(3), 561-574.
- Pariante, C. M., y Miller, A. H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, *49*(5), 391-404.
- Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T., y Toth, M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(18), 10734-10739.
- Parsey, R. V., Oquendo, M. A., Ogden, R. T., Olvet, D. M., Simpson, N., Huang, Y. Y., Van Heertum, R. L., Arango, V., y Mann, J. J. (2006). Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*, *59*(2), 106-113.
- Parsey, R. V., Ogden, R. T., Miller, J. M., Tin, A., Hesselgrave, N., Goldstein, E., Mikhno, A., Milak, M., Zanderigo, F., Sullivan, G. M., Oquendo, M. A. y Mann, J. J. (2010). Higher serotonin 1A binding in a second major depression cohort: modeling and reference region considerations. *Biol Psychiatry*, *68*(2), 170-178.
- Patel, S., Roberts, J., Moorman, J., y Reavill, C. (1995). Localization of serotonin-4 receptors in the striatonigral pathway in rat brain. *Neuroscience*, *69*(4), 1159-1167.
- Pauli, S., Linthorst, A. C., y Reul, J. M. (1998). Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Eur J Neurosci*, *10*(3), 868-878.
- Pav, M., Kovaru, H., Fiserova, A., Havrdova, E., y Lisa, V. (2008). Neurobiological aspects of depressive disorder and antidepressant treatment: role of glia. *Physiol Res*, *57*(2), 151-164.
- Peeters, B. W., Van Der Heijden, R., Gubbels, D. G., y Vanderheyden, P. M. (1994). Effects of chronic antidepressant treatment on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of Wistar rats. *Ann N Y Acad Sci*, *746*, 449-452.
- Pei, Q., Zetterstrom, T., y Fillenz, M. (1990). Tail pinch-induced changes in the turnover and

release of dopamine and 5-hydroxytryptamine in different brain regions of the rat. *Neuroscience*, 35(1), 133-138.

- Peiffer, A., Veilleux, S., y Barden, N. (1991). Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain. *Psychoneuroendocrinology*, 16(6), 505-515.
- Pepin, M. C., Beaulieu, S., y Barden, N. (1989). Antidepressants regulate glucocorticoid receptor messenger RNA concentrations in primary neuronal cultures. *Brain Res Mol Brain Res*, 6(1), 77-83.
- Pepin, M. C., Govindan, M. V., y Barden, N. (1992a). Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment. *Mol Pharmacol*, 41(6), 1016-1022.
- Pepin, M. C., Pothier, F., y Barden, N. (1992b). Antidepressant drug action in a transgenic mouse model of the endocrine changes seen in depression. *Mol Pharmacol*, 42(6), 991-995.
- Pérez-García, G., Gonzalez-Espinosa, C., y Meneses, A. (2006). An mRNA expression analysis of stimulation and blockade of 5-HT7 receptors during memory consolidation. *Behav Brain Res*, 169(1), 83-92.
- Persoons, J. H., Berkenbosch, F., Schornagel, K., Thepen, T., y Kraal, G. (1995). Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. *J Allergy Clin Immunol*, 95(3), 765-770.
- Peyron, C., Petit, J. M., Rampon, C., Jouvet, M., y Luppi, P. H. (1998). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82(2), 443-468.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9), e45.
- Pflanz, S. E., y Ogle, A. D. (2006). Job stress, depression, work performance, and perceptions of supervisors in military personnel. *Mil Med*, 171(9), 861-865.
- Pich, E. M., Heinrichs, S. C., Rivier, C., Miczek, K. A., Fisher, D. A., y Koob, G. F. (1993). Blockade of pituitary-adrenal axis activation induced by peripheral immunoneutralization of corticotropin-releasing factor does not affect the behavioral response to social defeat stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 18(7), 495-507.
- Pineyro, G., y Blier, P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*, 51(3), 533-591.
- Pittenger, C., y Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 88-109.

- Pizarro, J. M., Lumley, L. A., Medina, W., Robison, C. L., Chang, W. E., Alagappan, A., Bah, M. J., Dawood, M. Y., Shah, J. D., Mark, B., Kendall, N., Smith, M. A., Saviolakis, G. A. y Meyerhoff, J. L. (2004). Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Res*, **1025** (1-2), 10-20.
- Plotkin, S. R., Banks, W. A., y Kastin, A. J. (1996). Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*, **67**(1), 41-47.
- Poo, M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, **2**(1), 24-32.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., y Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, **266**(5604), 730-732.
- Pranzatelli, M. R., Durkin, M. M., y Barkai, A. I. (1994). Quantitative autoradiography of 5-hydroxytryptamine_{1A} binding sites in rats with chronic neonatal 5,7-dihydroxytryptamine lesions. *Brain Res Dev Brain Res*, **80**(1-2), 1-6.
- Przegalinski, E., y Budziszewska, B. (1993). The effect of long-term treatment with antidepressant drugs on the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rats. *Neurosci Lett*, **161**(2), 215-218.
- Pucilowski, O., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., y Janowsky, D. S. (1993). Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav*, **54**(6), 1215-1220.
- Quan, N., Sundar, S. K., y Weiss, J. M. (1994). Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, **49**(1-2), 125-134.
- Quan, N., Stern, E. L., Whiteside, M. B., y Herkenham, M. (1999). Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J Neuroimmunol*, **93**(1-2), 72-80.
- Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormede, P., Taghzouti, K., Simon, H. y Le Moal, M. (1986). Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiol Behav*, **36**(2), 223-228.
- Raap, D. K., y Van De Kar, L. D. (1999). Selective serotonin reuptake inhibitors and neuroendocrine function. *Life Sci*, **65**(12), 1217-1235.
- Rage, F., Givalois, L., Marmigere, F., Tapia-Arancibia, L., y Arancibia, S. (2002). Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience*, **112**(2), 309-318.

- Rage, F., Silhol, M., y Tapia-Arancibia, L. (2006). IL-1beta regulation of BDNF expression in rat cultured hypothalamic neurons depends on the presence of glial cells. *Neurochem Int*, 49(5), 433-441.
- Raison, C. L., y Miller, A. H. (2001). The neuroimmunology of stress and depression. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 6(4), 277-294.
- Raison, C. L., y Miller, A. H. (2003). When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*, 160(9), 1554-1565.
- Raison, C. L., Demetrashvili, M., Capuron, L., y Miller, A. H. (2005). Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs*, 19(2), 105-123.
- Raison, C. L., Capuron, L., y Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27(1), 24-31.
- Raison, C. L., Borisov, A. S., Woolwine, B. J., Massung, B., Vogt, G., y Miller, A. H. (2010). Interferon-alpha effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: relationship with proinflammatory cytokines and behavior. *Mol Psychiatry*, 15(5), 535-547.
- Rajkowska, G., y Miguel-Hidalgo, J. J. (2007). Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6(3), 219-233.
- Rasmussen, Jr., A. F., Marsh, J. T., y Brill, N. Q. (1957). Increased susceptibility to herpes simplex in mice subjected to avoidance-learning stress or restraint. *Proc Soc Exp Biol Med*, 96(1), 183-189.
- Rasmusson, A. M., Shi, L., y Duman, R. (2002). Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology*, 27(2), 133-142.
- Ratka, A., Sutanto, W., Bloemers, M., y De Kloet, E. R. (1989). On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, 50(2), 117-123.
- Rausch, J. L., Johnson, M. E., Kasik, K. E., y Stahl, S. M. (2006). Temperature regulation in depression: functional 5HT1A receptor adaptation differentiates antidepressant response. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2274-2280.
- Raymond, J. R., Kim, J., Beach, R. E., y Tisher, C. C. (1993). Immunohistochemical mapping of cellular and subcellular distribution of 5-HT1A receptors in rat and human kidneys. *Am J Physiol*, 264, F9-F19.
- Ren-Patterson, R. F., Cochran, L. W., Holmes, A., Sherrill, S., Huang, S. J., Tolliver, T., Lesch, K.P., Lu, B., y Murphy, D. L. (2005). Loss of brain-derived neurotrophic factor gene allele exacerbates brain monoamine deficiencies and increases stress abnormalities of

- serotonin transporter knockout mice. *J Neurosci Res*, 79(6), 756-771.
- Reul, J. M., y De Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505-2511.
- Reul, J. M., Van den Bosch, F. R., y De Kloet, E. R. (1987). Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J Endocrinol*, 115(3), 459-467.
- Reul, J. M., Stec, I., Soder, M., y Holsboer, F. (1993). Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology*, 133(1), 312-320.
- Reul, J. M., Labeur, M. S., Grigoriadis, D. E., De Souza, E. B., y Holsboer, F. (1994). Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis changes in the rat after long-term treatment with the reversible monoamine oxidase-A inhibitor moclobemide. *Neuroendocrinology*, 60(5), 509-519.
- Reul, J. M., Gesing, A., Droste, S., Stec, I. S., Weber, A., Bachmann, C., Bilanz-Bleuel, A., Holsboer, F., y Linthorst A.C. (2000). The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol*, 405(1-3), 235-249.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., El Mestikawy, S., Hamon, M., y Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol*, 417(2), 181-194.
- Riad, M., Zimmer, L., Rbah, L., Watkins, K. C., Hamon, M., y Descarries, L. (2004). Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J Neurosci*, 24(23), 5420-5426.
- Rickels, K., y Schweizer, E. (1990). Clinical overview of serotonin reuptake inhibitors. *J Clin Psychiatry*, 51 (Suppl B), 9-12.
- Ríos, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., y Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*, 15(10), 1748-1757.
- Ríos, M., Lambe, E. K., Liu, R., Teillon, S., Liu, J., Akbarian, S., Roffler-Tarlov, S., Jaenisch, R., y Aghajanian, G. K. (2006). Severe deficits in 5-HT_{2A}-mediated neurotransmission in BDNF conditional mutant mice. *J Neurobiol*, 66(4), 408-420.
- Rivest, S., Lacroix, S., Vallières, L., Nadeau, S., Zhang, J., y Laflamme, N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223(1), 22-38.

- Robinson, D. S., Rickels, K., Feighner, J., Fabre, Jr., L. F., Gammans, R. E., Shrotriya, R. C., Alms, D. R., Andary, J. J., y Messina, M. E. (1990). 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(3 Suppl), S67-S76.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B. A., y Riva, M. A. (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry*, 7(6), 609-616.
- Roceri, M., Cirulli, F., Pessina, C., Peretto, P., Racagni, G., y Riva, M. A. (2004). Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry*, 55(7), 708-714.
- Rook, G. A., y Lowry, C. A. (2008). The hygiene hypothesis and psychiatric disorders. *Trends Immunol*, 29(4), 150-158.
- Rosel, P., Arranz, B., Urretavizcaya, M., Oros, M., San, L., y Navarro, M. A. (2004). Altered 5-HT_{2A} and 5-HT₄ postsynaptic receptors and their intracellular signalling systems IP₃ and cAMP in brains from depressed violent suicide victims. *Neuropsychobiology*, 49(4), 189-195.
- Rosby, S. P., Nalepa, I., Huang, M., Perrin, C., Burt, A. M., Schmidt, D. E., Gillespie, D. D., y Sulser, F. (1995). Norepinephrine-independent regulation of GR₁₁ mRNA in vivo by a tricyclic antidepressant. *Brain Res*, 687(1-2), 79-82.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M.E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N., y Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 24(7), 1850-1856.
- Rothwell, N. J., Luheshi, G., y Toulmond, S. (1996). Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther*, 69(2), 85-95.
- Roybal, K. T., y Wulfang, C. (2010). Inhibiting the inhibitor of the inhibitor: blocking PKC- θ to enhance regulatory T cell function. *Sci Signal*, 3(132), 24.
- Ruis, M. A., De Brake, J. H., Buwalda, B., De Boer, S. F., Meerlo, P., Korte, S. M., Blokhuis, H.J., y Koolhaas, J.M. (1999). Housing familiar male wildtype rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology*, 24(3), 285-300.
- Rumajogee, P., Madeira, A., Verge, D., Hamon, M., y Miquel, M. C. (2002). Up-regulation of the neuronal serotonergic phenotype in vitro: BDNF and cAMP share Trk B-dependent mechanisms. *J Neurochem*, 83(6), 1525-1528.
- Russo-Neustadt, A. A., Alejandre, H., Garcia, C., Ivy, A. S., y Chen, M. J. (2004). Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine,

- citalopram, and physical exercise. *Neuropsychopharmacology*, 29(12), 2189-2199.
- Russo-Neustadt, A. A., y Chen, M. J. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity. *Curr Pharm Des*, 11(12), 1495-1510.
- Rutter, M. (2006). Implications of resilience concepts for scientific understanding. *Ann N Y Acad Sci*, 1094, 1-12.
- Ruzek, M. C., Miller, A. H., Opal, S. M., Pearce, B. D., y Biron, C. A. (1997). Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med*, 185(7), 1185-1192.
- Rygula, R., Abumaria, N., Flugge, G., Fuchs, E., Ruther, E., y Havemann-Reinecke, U. (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*, 162(1), 127-134.
- Sachser, N., y Lick, C. (1991). Social experience, behavior, and stress in guinea pigs. *Physiol Behav*, 50(1), 83-90.
- Saltzman, W., Prudom, S. L., Schultz-Darken, N. J., Wittwer, D. J., y Abbott, D. H. (2004). Social suppression of cortisol in female marmoset monkeys: role of circulating ACTH levels and glucocorticoid negative feedback. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2), 141-161.
- Sanchez, C., y Hyttel, J. (1999). Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol*, 19(4), 467-489.
- Sandi, C., Castanon, N., Vitiello, S., Neveu, P. J., y Mormede, P. (1991). Different responsiveness of spleen lymphocytes from two lines of psychogenetically selected rats (Roman high and low avoidance). *J Neuroimmunol*, 31(1), 27-33.
- Sandin, B., Chorot, P., Santed, M., y Valiente, R. (2004). Differences in negative life events between patients with anxiety disorders, depression and hypochondriasis. *Anxiety Stress and Coping*, 17(1), 37-47.
- Sapolsky, R. M. (1992). Neuroendocrinology of the stress-response. En: Becker, J., Breedlove, M., y Crews, D. (Eds.), *Behavioral endocrinology* (pp. 287-324). Cambridge, Massachusetts: MIT.
- Sapolsky, R. M. (1998). *Why zebras don't get ulcers: An updated guide to stress, stress-related disease, and coping*. New York: Freeman.
- Sapolsky, R. M. (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 57(10), 925-935.
- Sapolsky, R. M. (2001). Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12320-12322.

- Sapolsky, R. M. (2005). The influence of social hierarchy on primate health. *Science*, **308** (5722), 648-652.
- Savitz, J., Lucki, I., y Drevets, W. C. (2009). 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*, **88**(1), 17-31.
- Schaaf, M. J., De Jong, J., De Kloet, E. R., y Vreugdenhil, E. (1998). Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res*, **813**(1), 112-120.
- Schenone, A., Gill, J. S., Zacharias, D. A., y Windebank, A. J. (1996). Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J Neuroimmunol*, **64**(2), 141-149.
- Schleifer, S. J., Keller, S. E., Camerino, M., Thornton, J. C., y Stein, M. (1983). Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *JAMA*, **250**(3), 374-377.
- Schleifer, S. J., Keller, S. E., y Bartlett, J. A. (1999). Depression and immunity: clinical factors and therapeutic course. *Psychiatry Res*, **85**(1), 63-69.
- Schleifer, S. J., Bartlett, J. A., Keller, S. E., Eckholdt, H. M., Shiflett, S. C., y Delaney, B. R. (2002). Immunity in adolescents with major depression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **41**(9), 1054-1060.
- Schobitz, B., De Kloet, E. R., y Holsboer, F. (1994). Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. *Prog Neurobiol*, **44**(4), 397-432.
- Scholtens, J., y Van de Poll, N. E. (1987). Behavioral consequences of agonistic experiences in the male S3 (Tryon Maze Dull) rat. *Aggressive Behavior*, **13**(4), 213-226.
- Schrama, J. W., Schouten, J. M., Swinkels, J. W., Gentry, J. L., De Vries Reilingh, G., y Parmentier, H. K. (1997). Effect of hemoglobin status on humoral immune response of weanling pigs differing in coping styles. *J Anim Sci*, **75**(10), 2588-2596.
- Schuhmann, B., Dietrich, A., Sel, S., Hahn, C., Klingenspor, M., Lommatzsch, M., Gudermann, T., Braun, A., Renz, H., y Nockher, W.A. (2005). A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol*, **163**(1-2), 15-23.
- Schule, C. (2007). Neuroendocrinological mechanisms of actions of antidepressant drugs. *J Neuroendocrinol*, **19**(3), 213-226.
- Schwarcz, R., y Pellicciari, R. (2002). Manipulation of brain kynurenes: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*, **303**(1), 1-10.
- Seckl, J. R., y Fink, G. (1992). Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo. *Neuroendocrinology*, **55**(6), 621-626.
- Seegerstrom, S. C. (2003). Individual differences, immunity, and cancer: lessons from personality psychology. *Brain Behav Immun*, **17** (Suppl 1), S92-S97.

- Selye, H. (1936a). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, *138*, 32.
- Selye, H. (1936b). Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Brit J Exptl Patho*, *17*, 234-248.
- Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Allergy*, *17*(6), 231; 289; 358.
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*, *1*(4667), 1383-1392.
- Selye, H. (1975). *The stress of life*. New York: McGraw-Hill.
- Selye, H. (1974). *Stress Without Distress*. New York: New America Library.
- Sen, S., Duman, R., y Sanacora, G. (2008). Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*, *64*(6), 527-532.
- Sgoifo, A., De Boer, S. F., Haller, J., y Koolhaas, J. M. (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiol Behav*, *60*(6), 1403-1407.
- Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., y Queree, P. (2007). Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci*, *28*(12), 629-636.
- Sheline, Y. I., Gado, M. H., y Kraemer, H. C. (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, *160*(8), 1516-1518.
- Sheridan, J. F. (1998). Norman Cousins Memorial Lecture 1997. Stress-induced modulation of anti-viral immunity. *Brain Behav Immun*, *12*(1), 1-6.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., y Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*, *54*(1), 70-75.
- Shively, C. A., Willard, S. L., Davenport, A., y Friedman, D. P. (2007). 5HT1a receptor binding in the hippocampus of behaviorally depressed female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Soc Neurosci* *266*, 221-265.
- Shurin, M. R., Kusnecov, A., Hamill, E., Kaplan, S., y Rabin, B. S. (1994). Stress-induced alteration of polymorphonuclear leukocyte function in rats. *Brain Behav Immun*, *8*(2), 163-169.
- Sijbesma, H., Schipper, J., De Kloet, E. R., Mos, J., Van Aken, H., y Olivier, B. (1991). Postsynaptic 5-HT1 receptors and offensive aggression in rats: a combined behavioural and autoradiographic study with eltopazine. *Pharmacol Biochem Behav*, *38*(2), 447-458.

- Silva, R. C., Cruz, A. P., Avanzi, V., Landeira-Fernández, J., y Brandao, M. L. (2002). Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear-potentiated startle. *Neural Plast*, 9(4), 233-247.
- Singh, V. B., Corley, K. C., Phan, T. H., y Boadle-Biber, M. C. (1990). Increases in the activity of tryptophan hydroxylase from rat cortex and midbrain in response to acute or repeated sound stress are blocked by adrenalectomy and restored by dexamethasone treatment. *Brain Res*, 516(1), 66-76.
- Siuciak, J. A., Boylan, C., Fritsche, M., Altar, C. A., y Lindsay, R. M. (1996). BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res*, 710(1-2), 11-20.
- Siuciak, J. A., Clark, M. S., Rind, H. B., Whittemore, S. R., y Russo, A. F. (1998). BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res*, 52(2), 149-158.
- Skutella, T., Montkowski, A., Stohr, T., Probst, J. C., Landgraf, R., Holsboer, F., Jirikowski, G. F. (1994). Corticotropin-releasing hormone (CRH) antisense oligodeoxynucleotide treatment attenuates social defeat-induced anxiety in rats. *Cell Mol Neurobiol*, 14(5), 579-588.
- Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R., y Post, R. M. (1995b). Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*, 771, 234-239.
- Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R., y Post, R. M. (1995a). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 15, 1768-1777.
- Smith, M. A., Makino, S., Kim, S. Y., y Kvetnansky, R. (1995c). Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 136(9), 3743-3750.
- Smith, R. S. (1991). The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, 35(4), 298-306.
- Smriga, M., y Torii, K. (2003). L-Lysine acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15370-15375.
- Smyth, G. P., Stapleton, P. P., Freeman, T. A., Concannon, E. M., Mestre, J. R., Duff, M., Maddali, S., y Daly, J.M. (2004). Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *J Surg Res*, 116(2), 253-261.
- Sofroniew, M. V., Cooper, J. D., Svendsen, C. N., Crossman, P., Ip, N. Y., Lindsay, R. M., Zafra, F., y Lindholm, D. (1993). Atrophy but not death of adult septal cholinergic neurons after ablation of target capacity to produce mRNAs for NGF, BDNF, and NT3. *J Neurosci*, 13(12), 5263-5276.

- Solomon, G. F., Amkraut, A. A., y Kasper, P. (1964). Immunity, emotions and stress. *Ann Clin Res*, 5, 313–322.
- Song, C., Merali, Z., y Anisman, H. (1999). Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. *Neuroscience*, 88(3), 823-836.
- Sorrells, S. F., y Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun*, 21(3), 259-272.
- Sorrells, S. F., y Sapolsky, R. M. (2010). Glucocorticoids can arm macrophages for innate immune battle. *Brain Behav Immun*, 24(1), 17-18.
- Sotelo, C., Cholley, B., El Mestikawy, S., Gozlan, H., y Hamon, M. (1990). Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci*, 2(12), 1144-1154.
- Spangelo, B. L., Judd, A. M., MacLeod, R. M., Goodman, D. W., y Isakson, P. C. (1990). Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus. *Endocrinology*, 127(4), 1779-1785.
- Spencer, R. L., Miller, A. H., Stein, M., y McEwen, B. S. (1991). Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res*, 549(2), 236-246.
- Spencer, R. L., Kalman, B. A., y Dhabhar, F. S. (2000). Role of endogenous glucocorticoids in immune system function: Regulation and counterregulation. En: McEwen, B. (Ed.), *Handbook of physiology* (pp. 281-423). New York: Oxford University Press.
- Spiegel, D., y Giese-Davis, J. (2003). Depression and cancer: mechanisms and disease progression. *Biol Psychiatry*, 54(3), 269-282.
- Sprouse, J. S., y Aghajanian, G. K. (1986). (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT_{1A} selective agonists. *Eur J Pharmacol*, 128(3), 295-298.
- Stahl, S. (1994). 5HT_{1A} receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? *Psychopharmacol Bull*, 30(1), 39-43.
- Stark, J. L., Avitsur, R., Padgett, D. A., Campbell, K. A., Beck, F. M., y Sheridan, J. F. (2001). Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(6), 1799-1805.
- Stefanski, V. (1998). Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiol Behav*, 63(4), 605-613.
- Stein, M., Keller, S. E., y Schleifer, S. J. (1985). Stress and immunomodulation: the role of depression and neuroendocrine function. *J Immunol*, 135(2 Supl), S827-S833.

- Steptoe, A., Hamer, M., y Chida, Y. (2007). The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*, 21(7), 901-912.
- Sternberg, E. M., Young, W. S., Bernardini, R., Calogero, A. E., Chrousos, G. P., Gold, P. W., y Wilder, R.L. (1989). A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(12), 4771-4775.
- Summers, C. H., Korzan, W. J., Lukkes, J. L., Watt, M. J., Forster, G. L., Øverli, Ø., Höglund, E., Larson, E.T., Ronan, P.J., Matter, J.M., Summers, T.R., Renner, K.J., y Greenberg, N. (2005). Does serotonin influence aggression? comparing regional activity before and during social interaction. *Physiol Biochem Zool*, 78(5), 679-694.
- Susman, E. J., Schmeelk, K. H., Worrall, B. K., Granger, D. A., Ponirakis, A., y Chrousos, G. P. (1999). Corticotropin-releasing hormone and cortisol: longitudinal associations with depression and antisocial behavior in pregnant adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 38(4), 460-467.
- Szapacs, M. E., Mathews, T. A., Tessarollo, L., Ernest Lyons, W., Mamounas, L. A., y Andrews, A. M. (2004). Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods*, 140(1-2), 81-92.
- Szewczyk, B., Albert, P. R., Burns, A. M., Czesak, M., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Meltzer, H.Y., Konick, L.C., Dieter, L., Herbst, N., May, W., Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., y Austin, M.C. (2009). Gender-specific decrease in NUDR and 5-HT_{1A} receptor proteins in the prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12(2), 155-168.
- Takahashi, H., Takada, Y., Nagai, N., Urano, T., y Takada, A. (2000). Previous exposure to footshock stress attenuates nicotine-induced serotonin release in rat striatum during the subsequent stress. *Brain Res Bull*, 52(4), 285-290.
- Takase, L. F., Nogueira, M. I., Baratta, M., Bland, S. T., Watkins, L. R., Maier, S. F., Fornal, C.A., y Jacobs, B.L. (2004). Inescapable shock activates serotonergic neurons in all raphe nuclei of rat. *Behav Brain Res*, 153(1), 233-239.
- Tamburella, A., Micale, V., Navarria, A., y Drago, F. (2009). Antidepressant properties of the 5-HT₄ receptor partial agonist, SL65.0155: behavioral and neurochemical studies in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(7), 1205-1210.
- Temel, Y., Boothman, L. J., Blokland, A., Magill, P. J., Steinbusch, H. W., Visser-Vandewalle, V., y Sharp, T. (2007). Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43), 17087-17092.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen,

- Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., y Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 25(22), 5455-5463.
- Tennen, H., Affleck, G., Armeli, S., y Carney, M. A. (2000). A daily process approach to coping. Linking theory, research, and practice. *Am Psychol*, 55(6), 626-636.
- Terry Jr., A. V., Buccafusco, J. J., Jackson, W. J., Prendergast, M. A., Fontana, D. J., Wong, E. H., Bonhaus, D. W., Weller, P., y Eglén, R. M. (1998). Enhanced delayed matching performance in younger and older macaques administered the 5-HT₄ receptor agonist, RS 17017. *Psychopharmacology (Berl)*, 135(4), 407-415.
- Thoenen, H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270(5236), 593-598.
- Tidey, J. W., y Miczek, K. A. (1997). Acquisition of cocaine self-administration after social stress: role of accumbens dopamine. *Psychopharmacology (Berl)*, 130(3), 203-212.
- Tilleux, S., y Hermans, E. (2007). Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J Neurosci Res*, 85(10), 2059-2070.
- Tong, L., Balazs, R., Soiampornkul, R., Thangnipon, W., y Cotman, C. W. (2008). Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction. *Neurobiol Aging*, 29(9), 1380-1393.
- Tonini, M., y Pace, F. (2006). Drugs acting on serotonin receptors for the treatment of functional GI disorders. *Dig Dis*, 24(1-2), 59-69.
- Tornatzky, W., y Miczek, K. A. (1993). Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiol Behav*, 53(5), 983-993.
- Torres, G. E., y Amara, S. G. (2007). Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Curr Opin Neurobiol*, 17(3), 304-312.
- Touma, C., Bunck, M., Glasl, L., Nussbaumer, M., Palme, R., Stein, H., Wolferstätter, M., Zeh, R., Zimbelmann, M., Holsboer, F., y Landgraf, R. (2008). Mice selected for high versus low stress reactivity: a new animal model for affective disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 839-862.
- Touma, C., Fenzl, T., Ruschel, J., Palme, R., Holsboer, F., Kimura, M., y Landgraf, R. (2009). Rhythmicity in mice selected for extremes in stress reactivity: behavioural, endocrine and sleep changes resembling endophenotypes of major depression. *PLoS One*, 4(1), e4325.
- Toyooka, K., Asama, K., Watanabe, Y., Muratake, T., Takahashi, M., Someya, T., y Nawa, H. (2002). Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res*, 110(3), 249-257.
- Tsankova, N. M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R. L., y Nestler, E. J. (2006). Sustained

hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9(4), 519-525.

- Tyler, W. J., Alonso, M., Bramham, C. R., y Pozzo-Miller, L. D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem*, 9(5), 224-237.
- Ursin, H., y Olf, M. (1993). Psychobiology of coping and defence strategies. *Neuropsychobiology*, 28(1-2), 66-71.
- Vaidya, V. A., Marek, G. J., Aghajanian, G. K., y Duman, R. S. (1997). 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*, 17(8), 2785-2795.
- Vaidya, V. A., Terwilliger, R. M., y Duman, R. S. (1999). Role of 5-HT_{2A} receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 262(1), 1-4.
- Vaknin, I., Blinder, L., Wang, L., Gazit, R., Shapira, E., Genina, O., Pines, M., Pikarsky, E., y Baniyash, M. (2008). A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression. *Blood*, 111(3), 1437-1447.
- Van Dam, A. M., Brouns, M., Lousse, S., y Berkenbosch, F. (1992). Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? *Brain Res*, 588(2), 291-296.
- Van Eekelen, J. A., Jiang, W., De Kloet, E. R., y Bohn, M. C. (1988). Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*, 21(1), 88-94.
- Van Praag, H. M. (2004). Can stress cause depression? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(5), 891-907.
- Van Riel, E., Meijer, O. C., Steenbergen, P. J., y Jöels, M. (2003). Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. *Neuroscience*, 120(3), 649-658.
- Van Riel, E., Van Gemert, N. G., Meijer, O. C., y Jöels, M. (2004). Effect of early life stress on serotonin responses in the hippocampus of young adult rats. *Synapse*, 53(1), 11-19.
- Vazquez, D. M., López, J. F., Van Hoers, H., Watson, S. J., y Levine, S. (2000). Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. *Brain Res*, 855(1), 76-82.
- Veenema, A. H., Meijer, O. C., De Kloet, E. R., Koolhaas, J. M., y Bohus, B. G. (2003a). Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Horm Behav*, 43(1), 197-204.
- Veenema, A. H., Meijer, O. C., De Kloet, E. R., y Koolhaas, J. M. (2003b). Genetic selection for

- coping style predicts stressor susceptibility. *J Neuroendocrinol*, 15(3), 256-267.
- Veenema, A. H., Sijtsma, B., Koolhaas, J. M., y De Kloet, E. R. (2005). The stress response to sensory contact in mice: genotype effect of the stimulus animal. *Psychoneuroendocrinology*, 30(6), 550-557.
- Verbeek, M. E. M., Drent, P. J., y Wiepkema, P. R. (1994). Consistent individual differences in early exploratory behavior of male great tits. *Anim Behav*, 48, 1113-1121.
- Verge, D., Daval, G., Marcinkiewicz, M., Patey, A., el Mestikawy, S., Gozlan, H., y Hamon, M. (1986). Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci*, 6(12), 3474-3482.
- Vicentic, A., Francis, D., Moffett, M., Lakatos, A., Rogge, G., Hubert, G. W., Harley, J., y Kuhar, M. J. (2006). Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience*, 140(1), 355-365.
- Vilaro, M. T., Cortes, R., Gerald, C., Branchek, T. A., Palacios, J. M., y Mengod, G. (1996). Localization of 5-HT4 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res*, 43(1-2), 356-360.
- Vinet, J., Carra, S., Blom, J. M., Brunello, N., Barden, N., y Tascadda, F. (2004). Chronic treatment with desipramine and fluoxetine modulate BDNF, CaMKKalpha and CaMKKbeta mRNA levels in the hippocampus of transgenic mice expressing antisense RNA against the glucocorticoid receptor. *Neuropharmacology*, 47(7), 1062-1069.
- Vollmayr, B., Keck, S., Henn, F. A., y Schloss, P. (2000). Acute stress decreases serotonin transporter mRNA in the raphe pontis but not in other raphe nuclei of the rat. *Neurosci Lett*, 290(2), 109-112.
- Vollmayr, B., Faust, H., Lewicka, S., y Henn, F. A. (2001). Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness. *Mol Psychiatry*, 6(4), 471-474.
- Volterra, A., y Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6(8), 626-640.
- Waeber, C., Sebben, M., Nieoullon, A., Bockaert, J., y Dumuis, A. (1994). Regional distribution and ontogeny of 5-HT4 binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology*, 33(3-4), 527-541.
- Walker, F. R., Hinwood, M., Masters, L., Deilenberg, R. A., y Day, T. A. (2008). Individual differences predict susceptibility to conditioned fear arising from psychosocial trauma. *J Psychiatr Res*, 42(5), 371-383.
- Walker, F. R., Masters, L. M., Dielenberg, R. A., y Day, T. A. (2009). Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behaviour. *Neuroscience*, 162(2), 244-253.

- Wang, X., Wu, H., y Miller, A. H. (2004). Interleukin 1alpha (IL-1alpha) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. *Mol Psychiatry*, 9(1), 65-75.
- Watanabe, Y., Gould, E., y McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 588(2), 341-345.
- Watanabe, Y., Sakai, R. R., McEwen, B. S., y Mendelson, S. (1993). Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT1A and 5-HT2 receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res*, 615(1), 87-94.
- Watanabe, Y., McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., y Sakai, R. R. (1995). Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels. *Brain Res*, 32(1), 176-180.
- Wellman, C. L., Izquierdo, A., Garrett, J. E., Martin, K. P., Carroll, J., Millstein, R., Lesch, K. P., Murphy, D. L., y Holmes, A. (2007). Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci*, 27(3), 684-691.
- Wetzler, S., Asnis, G. M., DeLecuona, J. M., y Kalus, O. (1996). Serotonin function in panic disorder: intravenous administration of meta-chlorophenylpiperazine. *Psychiatry Res*, 64(2), 77-82.
- Wiegers, G. J., y Reul, J. M. (1998). Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. *Trends Pharmacol Sci*, 19(8), 317-321.
- Wiepkema, P. R., y Schouten, W. G. (1992). Stereotypies in sows during chronic stress. *Psychother Psychosom*, 57(4), 194-199.
- Wilckens, T., y De Rijk, R. (1997). Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today*, 18(9), 418-424.
- Wodarz, N., Rupprecht, R., Kornhuber, J., Schmitz, B., Wild, K., y Riederer, P. (1992). Cell-mediated immunity and its glucocorticoid-sensitivity after clinical recovery from severe major depressive disorder. *J Affect Disord*, 25(1), 31-38.
- Wong, M. L., Kling, M. A., Munson, P. J., Listwak, S., Licinio, J., Prolo, P., Karp, B., McCutcheon, I. E., Geraciotti Jr., T. D., DeBellis, M. D., Rice, K. C., Goldstein, D. S., Veldhuis, J. D., Chrousos, G. P., Oldfield, E. H., McCann, S. M., y Gold, P. W. (2000). Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1), 325-330.
- Wood, P. G., Karol, M. H., Kusnecov, A. W., y Rabin, B. S. (1993). Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain Behav Immun*, 7(2), 121-134.

- Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R., y Vignali, D. A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*, 66(16), 2603-2622.
- Wu, C. W., Chen, Y. C., Yu, L., Chen, H. I., Jen, C. J., Huang, A. M., Tsai, H. J., Chang, Y. T., y Kuo, Y. M. (2007). Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. *J Neurochem*, 103(6), 2471-2481.
- Xu, H., Luo, C., Richardson, J. S., y Li, X. M. (2004). Recovery of hippocampal cell proliferation and BDNF levels, both of which are reduced by repeated restraint stress, is accelerated by chronic venlafaxine. *Pharmacogenomics J*, 4(5), 322-331.
- Yamaguchi, T., Suzuki, M., y Yamamoto, M. (1997). Evidence for 5-HT₄ receptor involvement in the enhancement of acetylcholine release by p-chloroamphetamine in rat frontal cortex. *Brain Res*, 772(1-2), 95-101.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., López, O. T., Bennett, L., y Welcher, A. A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78(2), 431-448.
- Yau, J. L., Olsson, T., Morris, R. G., Meaney, M. J., y Seckl, J. R. (1995). Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience*, 66(3), 571-581.
- Yehuda, R. (2001). Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*, 62 (Suppl 17), 41-46.
- Yehuda, R., Flory, J. D., Southwick, S., y Charney, D. S. (2006). Developing an agenda for translational studies of resilience and vulnerability following trauma exposure. *Ann N Y Acad Sci*, 1071, 379-396.
- Young, A. H., MacDonald, L. M., St John, H., Dick, H., y Goodwin, G. M. (1992). The effects of corticosterone on 5-HT receptor function in rodents. *Neuropharmacology*, 31(5), 433-438.
- Young, A. H., Goodwin, G. M., Dick, H., y Fink, G. (1994a). Effects of glucocorticoids on 5-HT_{1A} presynaptic function in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 114(2), 360-364.
- Young, A. H., Sharpley, A. L., Campling, G. M., Hockney, R. A., y Cowen, P. J. (1994b). Effects of hydrocortisone on brain 5-HT function and sleep. *J Affect Disord*, 32(2), 139-146.
- Zachariae, C. O. (1996). *Mind and immunity: Psychological modulation of immunological and inflammatory parameters*. Copenhagen: Munksgaard.
- Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K. L., Brown, M., Blazar, B. R., Abramson, S. B., Lafaille, J.J., y Dustin, M. L. (2010). Protein kinase C- θ mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science*, 328(5976), 372-376.
- Zhao, S., Edwards, J., Carroll, J., Wiedholz, L., Millstein, R. A., Jaing, C., Murphy, D. L., Lanthorn,

- T.H., y Holmes, A. (2006). Insertion mutation at the C-terminus of the serotonin transporter disrupts brain serotonin function and emotion-related behaviors in mice. *Neuroscience*, 140(1), 321-334.
- Zhou, J., y Iacovitti, L. (2000). Mechanisms governing the differentiation of a serotonergic phenotype in culture. *Brain Res*, 877(1), 37-46.
- Zhu, C. B., Blakely, R. D., y Hewlett, W. A. (2006). The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2121-2131.
- Zisook, S., Shuchter, S. R., Irwin, M., Darko, D. F., Sledge, P., y Resovsky, K. (1994). Bereavement, depression, and immune function. *Psychiatry Res*, 52(1), 1-10.
- Zorrilla, E. P., Luborsky, L., McKay, J. R., Rosenthal, R., Houldin, A., Tax, A., McCorkle, R., Seligman, D.A., y Schmidt, K. (2001). The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun*, 15(3), 199-226.

VIII. ANEXO

ANEXO I. CATEGORIAS CONDUCTUALES

A continuación de especifican las características que definen a cada una de las pautas conductuales del ratón (Martínez y cols., 1986).

1. CUIDADO CORPORAL:

- a) *Aseo abreviado*. El animal pasa las patas delanteras desde la parte posterior de la cabeza a la nariz.
- b) *Autoaseo*. El animal se lame la piel de los flancos, del abdomen y el rabo.
- c) *Lavado*. El animal se lame las patas delanteras y a continuación las pasa desde las orejas a la nariz.
- d) *Sacudida*. Un breve y ligero estremecimiento de todo el cuerpo.
- e) *Rascarse*. El animal se rasca con las patas traseras los flancos y la cabeza.

2. ESCARBAR:

- a) *Escarbar*. El animal remueve el serrín utilizando las patas delanteras.
- b) *Escarbar hacia atrás*. El animal tira el serrín hacia atrás utilizando para ello las patas traseras.
- c) *Escarbar hacia adelante*. El animal tira el serrín hacia adelante utilizando para ello las patas delanteras.

3. EXPLORACIÓN NO SOCIAL:

- a) *Exploración*. El animal deambula dirigiendo su atención, aparentemente, hacia el ambiente físico.
- b) *Salto*. El animal salta con las cuatro patas.
- c) *Erguido*. El animal explora el ambiente en postura bípeda.
- d) *Erguido apoyándose en la pared*. Postura similar a la anterior, excepto en que las patas delanteras las apoya en la pared de la jaula.
- e) *Ojear*. El animal en posición cuadrúpeda, mueve la cabeza de un lado a otro, dirigiendo su atención al ambiente y no hacia el oponente.

4. EXPLORACIÓN DESDE UNA DISTANCIA:

- a) *Aproximación*. El animal anda hacia el oponente dirigiendo su atención hacia éste.
- b) *Atención*. El animal dirige su atención hacia el oponente desde una distancia.
- c) *Círculo*. El animal hace un recorrido, acercándose y alejándose del oponente sin detenerse.
- d) *Atención extrema*. Postura similar a la atención, excepto en que el animal se inclina hacia delante estirando la cabeza y el cuello.
- e) *Cabeza orientada*. El animal gira la cabeza hacia el oponente.

5. INVESTIGACIÓN SOCIAL:

- a) *Andando encima*. El animal pasa por encima del oponente, apoyando las patas delanteras sobre su lomo.
- b) *Andando debajo*. El animal mete la cabeza y parte anterior del cuerpo debajo del oponente.
- c) *Andando alrededor*. El animal se mueve alrededor del oponente con la cabeza dirigida hacia éste.

- d) *Seguimiento*. El animal camina detrás del oponente que se aleja.
- e) *Empujando*. Los dos animales, en un momento del recorrido, llegan a contactar lateralmente.
- f) *Aseo corporal*. El animal, usando la boca, asea al oponente en alguna región del cuerpo, excepto la cabeza.
- g) *Aseo de la cabeza*. El animal asea la cabeza del oponente.
- h) *Olfateo corporal*. El animal olfatea alguna región del cuerpo del oponente, excepto la cabeza.
- i) *Olfateo de la nariz*. El animal olfatea la cabeza o la nariz del oponente.
- j) *Olfateo ano-genital*. El animal olfatea la región ano-genital del oponente.

6. AMENAZA:

- a) *Aseo agresivo*. El animal asea rigurosamente al oponente, desde una posición lateral, con los dientes y patas delanteras.
- b) *Ofensa vertical*. El animal junto al oponente, en una postura bípeda y con el lomo encorvado e inclinado hacia éste, presenta los ojos entreabiertos y las orejas gachas, y a menudo el pelo erizado.
- c) *Ofensa lateral*. El animal amenaza al oponente, en una postura tripedal, desde una posición lateral, con los ojos entreabiertos y las orejas agachadas, presenta a menudo el pelo erizado
- d) *Golpeteo con el rabo*. El animal realiza rápidos movimientos con el rabo.

7. ATAQUE:

- a) *Ataque mordaz*. El animal muerde al oponente.
- b) *Persecución*. El animal corre detrás del oponente que huye.
- c) *Carga*. El animal corre hacia el oponente.
- d) *Embestida*. El animal se abalanza sobre el oponente, como si fuera a morderle, pero llegando solo a contacto lateral.

8. EVITACIÓN-HUIDA:

- a) *Alejamiento*. El animal deambula lejos del oponente.
- b) *Retirada*. El animal se aleja corriendo al aproximarse el oponente.
- c) *Salto*. El animal salta al acercarse el oponente
- d) *Rebote*. El animal salta apoyándose en las paredes de la jaula.
- e) *Sobresalto*. El animal realiza un súbito movimiento al acercarse el oponente.
- f) *Apretado contra la pared*. El animal en posición bípeda, se aprieta contra la pared de la jaula, con la superficie ventral de su cuerpo extendiendo los miembros delanteros.
- g) *Retroceso*. El animal retira rápidamente la cabeza ante el oponente.
- h) *Escape*. El animal mueve lentamente la parte anterior del cuerpo y/o cabeza, para evitar al oponente.
- i) *Girar*. El animal se vuelve de espaldas al acercarse el oponente.

9. DEFENSA-SUMISIÓN:

- a) *Defensa lateral*. El animal ante la cercanía del oponente, adopta una posición tripedal lateral a éste, con lo ojos abiertos y las orejas extendidas.
- b) *Defensa vertical*. El animal ante la cercanía del oponente, adopta una posición bípeda, con los ojos abiertos y las orejas extendidas.

- c) *Sumisión vertical*. Es una forma extrema de “defensa vertical”, en la que el animal retira la cabeza hacia atrás.

10. CONDUCTA SEXUAL:

- a) *Intento de monta*. El animal intenta montar dorsalmente al oponente, pero de forma incompleta.
- b) *Monta*. El animal, situado encima del oponente y agarrado a los flancos de éste, realiza movimientos pélvicos.

11. INMOVILIDAD:

- a) *Agachado*. El animal permanece en completa inmovilidad, con las cuatro patas apoyadas en el suelo.
- b) *Arrastrarse*. Postura similar a la anterior, excepto en que el animal se apoya en las paredes de la jaula y se arrastra lejos del oponente.

