

Universidad de Navarra
Facultad de Farmacia

ESTUDIO CONDUCTUAL Y NEUROBIOLÓGICO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOCIAL EN RATÓN

ELISABET VENZALA BASCOY

ESTUDIO CONDUCTUAL Y NEUROBIOLÓGICO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOCIAL EN RATÓN

Memoria presentada por D^a Elisabet Venzala Bascoy para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El siguiente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Farmacología y autorizo su presentación ante el Tribunal que la ha de juzgar.

Pamplona, Septiembre de 2012

Fdo: Dra. Rosa M^a Tordera Baviera

Es increíble que en un cerebro tan pequeño, quepa tanta ignorancia

(Anónimo)

A mis padres y a mi hermano

A ti, Jorge

AGRADECIMIENTOS

Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente, la sostiene en la sombra

Rabindranath Tagore

Durante estos casi 5 años han sido muchas las personas que han estado a mi lado, dando luz o a la sombra sosteniéndome para que no cayera. Expresar lo que siento al acabar este trabajo es difícil, y estoy segura que estas líneas se quedarán cortas para expresar todo lo agradecida que estoy...

En primer lugar me gustaría agradecer a Laboratorios Servier por financiar este trabajo. Gracias Philippe y Loreto, por toda vuestra ayuda y apoyo durante estos años, y por permitir que esta tesis sea posible. Merci beaucoup!

Esto no habría sido posible sin un departamento como Farma. Gracias Eburne por permitirme formar parte de esta gran familia. Gracias Berta, por tratarme siempre con cariño y por acompañarme en la experiencia de mi primer congreso, inolvidable.

Rosa, no se aun que te llevó a elegirme como parte de tu equipo, pero Mil Gracias. Gracias por confiar en mí, por enseñarme tanto y por ser más que una jefa... Gracias por todo el interés personal que has mostrado, y por querer siempre llevarme por el buen camino.

Aterrizar en Farma no hubiera sido tan fácil sin el comité de bienvenida que tuve. Gracias Barbi y Álvaro. Fuisteis los primeros en acogerme, en abrir los brazos a esta "tipa loca que hace submarinismo y jiu-jitsu". Esos años de trío calavera han sido lo mejor de toda la tesis. Aunque nuestros caminos se hayan separado un poco, siempre estaréis presentes

en todos mis buenos recuerdos y tendréis una amiga esperándoos con los brazos abiertos. Gracias también a Eva, chica checa, por todos los buenos momentos que hemos compartido. Elena, gracias empezando por esos apuntes que me ayudaron durante la carrera, y por todo lo que me has ayudado después. Maite, gracias por demostrar que la suerte se busca, y que el trabajo duro da sus frutos. Natalia, gracias por ese cariño y esa felicidad infinita que siempre emanas. Gracias a todos, que aunque no estéis ya en Farma, seguís formando parte de él.

Gracias a los que vinieron detrás de mí y me han acompañado hasta el final de este viaje. Marta, Pantxi, primero fuiste compañera de piso, luego de trabajo, y ante todo una buena amiga con la que contar para cualquier cosa. Mil gracias por haber estado ahí en todos los buenos y malos momentos. ¡Te quiero muchos! Luci, mema, gracias por ser la persona más optimista que conozco, por esa energía, y por apuntarte a todos los planes, ¡¡¡ vuelvo a tener tiempo libre para lo que quieras!!! Lourditas, ¡¡¡Loca!!! Gracias por ser como eres, por preocuparte por mí y tener siempre cinco minuticos para esas terapias pretésicas tan necesarias. Gorkis, pobrico, gracias por aguantarnos en el cuartito a las tres pretésicas y por estar siempre dispuesto a explicarme cualquier cosa, mila esker. Bea, gracias por volver a Farma y corroborar todo lo buen que había oído de ti, y muchas gracias por todo el cariño y apoyo me has dado en esta última etapa.

Gracias a todos los masterianos y alumnos que habéis pasado por aquí aportando vuestro granito de arena a esta familia, en especial a Gorka, a Vero y a Lola, que han sido los que más han estado a mi lado. Y gracias a los aún más recientes, que espero que sigáis manteniendo el espíritu de Farma. Mil gracias a Merche, Manu, María, Xabi, Jorge, Marta,... por dar ese aire fresco y un tanto "friki" al depar. Y muy especialmente gracias a Mikel, chuchín, que durante todo el tiempo que has sido mi perrito fiel, aguantando lo bueno y lo malo y ayudándome en todo mi trabajo. Mil gracias.

No me puedo olvidar a los que llevan más tiempo en el departamento. Popi y Mariaja, gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado. Por tener esa paciencia con la pobre

bióloga que entró sabiendo más bien poco de farmacología. Mariaja, gracias por ese interés adicional en buscarme una calea... te prometo que si algún día la necesito te lo diré. Y Popi, que decirte, te echamos de menos... Guadalupe, Idoia y Luis, mil gracias a vosotros también por escucharme y apoyarme, y por esos entretenidos cafés que hemos compartido.

Gracias Mari Luz, Sandra y Pili, por ser el alma de esta familia que es Farma y por todo lo que habéis colaborado en este trabajo. Mari Luz, la mami de todos, gracias por cuidarme e interesarte siempre por mi. Pilitxu, gracias por esos consejos tan sabios, agradables conversaciones, y ¡por tener siempre unas cuchillitas guardadas para mis disecciones! Sandri, mil gracias por todo el trabajo, sin ti esto no habría sido posible; y por supuesto gracias por todo lo que has hecho en el ámbito personal, siempre has estado dispuesta a escucharme, aconsejarme y ¡¡¡hasta de peinarme!!! Mil gracias.

Pero todo este trabajo requiere la ayuda de mucha más gente que un solo departamento. Gracias a las chicas de bioquímica y al departamento de fisio, por toda la ayuda que me habéis dado. Gracias a los que estáis en CIMA, en especial a Patxi y June por todo el apoyo y esos partidazos de squash, y también a los compañeros de los Journal Club sobre todo a Sonia e Isabel por toda la ayuda en el tema de las espinas. Gracias a todos los que formáis parte del equipo fumeteo, por esos descansicos amenos que ayudan a recargar las pilas. Gracias también a los bedeles, en especial a Pablo y Enrique, que me habéis echado una mano siempre que lo he necesitado durante estos 11 años que llevo en la universidad. Y por supuesto, gracias a todos los del animalario. Carlos, Alberto, Igor... gracias por solucionarme mil y un problemas. Y mil gracias Eneko y Juan, gracias por hacer que las interminables horas en el "zulo" se hicieran más amenas. ¡Tenemos la partida de mus pendiente!

Fuera del círculo de la universidad ha habido también una infinidad de personas que no puedo dejar de agradecer. Gracias a la "cuadri", por esos cafés, esos viajes, conciertos trikiteros, y la cantidad de aventuras que hemos vivido. Gracias a mis amigas, ya seáis de

la infancia, de la carrera o de mil historias diferentes siempre os habéis interesado por mi trabajo, aunque no entenderais muy bien de que iba. En especial, gracias a Ali, que desde hace 11 años que nos juntamos en la carrera nuestros caminos han seguido paralelos y he tenido la suerte de poder tenerte a mi lado siempre. Gracias a Jana, por ser la cabra loca entrañable que sigue sabiendo como hacerme sonreír a pesar de las adversidades. Y gracias a ti Angie, por ser como eres, por ser mi mejor amiga y por estar ahí aunque la distancia nos separe. ¡Os quiero!

Gracias a mi familia. Gracias Ake por ser la mejor abuela del mundo. Aita y Ama, gracias por todos vuestros sacrificios para poder darme lo mejor, por haber confiado en mi y por ser un ejemplo a seguir. Gracias Mikel, enano, ¡ite echo mucho de menos!! Gracias por todo tu apoyo desde la distancia. Espero que en Chile te vaya todo bien, aunque no te lo voy a negar, preferiría que estuvieras aquí.

Por último, quiero agradecer todo el apoyo que he tenido en mi casa, empezando por mis peludos, Pantxo y Yogui, que en los momentos de bajón, siempre han tenido un maullido, un lametón o un gesto de cariño que me hacía sonreír. Y por supuesto y sobre todo, gracias a ti, Jorge. Apareciste cuando más lo necesitaba, y has estado a mi lado en los buenos y malos momentos. Has sido mi llama, el que me ha sostenido y todo lo que ha iluminado mi camino. Gracias por aguantar sobre todo esta última etapa, la más dura, y conseguir que a tu lado todo sea más fácil. Te quiero mi vida.

Resumiendo... mil gracias a todos... esto ha sido posible gracias a vuestra ayuda...

ABREVIATURAS

5-HIAA	5-hidroxi-indolacético
5-HT	5-Hidroxitriptamina, Serotonina
AMP	Adenosil MonoFosfato
ATV	Área Tegmental Ventral
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor , Factor neurotrófico derivado del cerebro
BP	Transtorno bipolar
BZD	Benzodiacepina
CMS	Chronic Mild Stress, Estrés crónico suave
CREB	cAMP Response Element-Binding, proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico
CSDS	Chronic Social Defeat Stress, Estrés crónico de derrota social
CSF	Cerebrospinal fluid, Fluido cerebroespinal
DA	Dopamina
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition
EAAT	Excitatory AminoAcid Transporter, transportador de aminoácido excitatorio
GABA	gamma-aminobutyric acid, ácido gamma-amino butírico
GAD	glutamic acid decarboxylase, ácido glutámico descarboxilasa
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal
IMAO	Inhibidor de la Monoaminooxidasa
ISRS	Inhibidor selectivo de la Recaptación de Serotonina
LCR	Líquido cefaloraquídeo

LTD	Long Term Depression, depresión a largo plazo
LTP	Long Term Potentiation, potenciación a largo plazo
MAO	Monoaminoxidasa
mPFC	Medial Prefrontal Cortex, corteza prefrontal medial
MT	Melatonina
NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo Accumbens
OMS	Organización Mundial de la Salud
SNC	Sistema Nervioso Central
SVP	Synaptic vesicular protein, proteína sináptica vesicular
TAG	Trastorno de ansiedad generalizada
TEPT	Trastorno de estrés postraumático
TPH2	Triptofano Hidroxilasa 2
VGAT	Vesicular GABA transporter, transportador vesicular de GABA
VGLUT	Vesicular Glutamate Transporter, transportador vesicular de glutamato

ÍNDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción	1
1. LA DEPRESIÓN	5
1.1. Definición y epidemiología clínica	5
1.2. Tratamiento farmacológico de la depresión	7
1.3. Neurobiología de la depresión	9
1.3.1. Hipótesis monoaminérgica	9
1.3.2. Alteraciones de la plasticidad sináptica	14
1.3.3. Implicaciones de los sistemas de glutamato y GABA	19
2. LA ANSIEDAD	23
2.1. Definición y epidemiología clínica	23
2.2. Tratamiento farmacológico de la ansiedad	24
2.3. Neurobiología de la ansiedad	25
2.3.1. Alteraciones monoaminérgicas en la ansiedad	26
2.3.2. Alteraciones de la plasticidad sináptica	28
2.3.3. Implicaciones de los sistemas de glutamato y GABA	29
3. EL ESTRÉS	31
3.1. Estrés: Factor desencadenante de la depresión y ansiedad	32
3.2. Papel de la corteza prefrontal en el control del estrés	33
3.3. Modelos animales de estrés crónico	35
3.3.1. Estrés ambiental	35
3.3.2. Estrés social	38
4. BIBLIOGRAFÍA	42
CAPÍTULO 2: Planteamiento y objetivos	67

CAPÍTULO 3: Social versus environmental stress model of depression from a behavioural and neurochemical approach	77
Resumen	81
Abstract	83
1. INTRODUCCIÓN	84
2. EXPERIMENTAL PROCEDURE	86
2.1. Animals	86
2.2. Experimental desing for the CMS and CSDS procedure	86
2.3. Chronic mild stress procedure	88
2.4. Chornic social defeat stress procedure	88
2.5. Sucrose intake test	88
2.6. Behavioural test	89
2.7. Neurotransmitter brain levels	91
2.8. Statistical analysis	92
3. RESULTS	93
3.1. Depressive-like behaviours	93
3.2. Anxiety-like behaviour and social interaction	94
3.3. Recognition memory	96
3.4. Motor activity and body weight gain	97
3.5. Neurotransmitters brain levels	98
4. DISCUSSION	100
Aknowledgments	105
References	106
CAPÍTULO 4: Chronic social defeat stress model: behavioural features, antidepressant action and interaction with biological risk factors	115
Resumen	119
Abstract	120

1. INTRODUCTION	121
2. MATERIAL AND METHODS	123
2.1. Animals and drug treatment	123
2.2. Experimental desing	123
2.3. Chronic social defeat stress procedure	125
2.4. Sucrose intake test	125
2.5. Behavioural tests	125
2.6. <i>In situ</i> hybridization studies	127
2.7. Statistical analysis	128
3. RESULTS	129
3.1. Long-term behaioural changes induced by individual housing and CSDS	129
3.2. Effect of antidepressants on long-term behavioural changes induced by CSDS	132
3.3. Behavioural effectos of CSDS in VGLUT1+/1 mice	137
3.4. Cortical regulation of VGLUT1 mRNA levels by chronic social defeat stress	139
4. DICUSSION	141
Acknowledgements	146
References	147
CAPÍTULO 5: Long-term neuroplasticity altertions induced by chronic social defeat stress	155
Resumen	159
Abstract	160
1. INTRODUCTION	161
2. MATERIAL AND METHODS	164
2.1. Animals	164
2.2. Experimental desing	164

2.3. Chronic social defeat stress procedures	165
2.4. Social interaction test	165
2.5. Spine density measurements	166
2.6. Tissue preparation for neurochemical studies	167
2.7. Western blotting	167
2.8. Statiltical analysis	169
3. RESULTS	170
3.1. Dendritic spine density	170
3.2. Protein expression of different glutamate and GABA receptor subunits	171
3.3. Protein expression of different neuronal plasticity markers	171
3.4. Effect of CSDS on social interaction test using two different social stimuli	173
3.5. Expression of synaptic plasticity markers using two different social stimuli	174
4. DISCUSSION	176
Acknowledgements	180
References	181
CAPÍTULO 6: Discusión general	189
1. ESTRÉS SOCIAL <i>VERSUS</i> ESTRÉS AMBIENTAL	195
1.1. Efectos conductuales	195
1.2. Efectos neruoquímicos	196
2. ESTRÉS CRÓNICO SOCIAL: VALIDEZ DEL MODELO DE CSDS	198
2.1. Aislamiento <i>versus</i> derrota social	198
2.2. Validez predictiva del CSDS	198
2.3. Interpretación del test de la interacción social	199
2.4. Interacción del estrés social con niveles disminuidos de VGLUT1	199

3. REGULACIÓN DE MARCADORES DE PLASTICIDAD SINÁPTICA POR EL ESTRÉS SOCIAL	201
3.1 Efecto del CSDS a largo plazo	201
3.2. Identificación de marcadores de plasticidad sináptica de respuesta alterada a un estímulo aversivo	203
4. BIBLIOGRAFÍA	204
CAPÍTULO 7: Conclusiones	213

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

Introducción

1. LA DEPRESIÓN

1.1. Definición y epidemiología clínica

Los trastornos afectivos constituyen una de las principales enfermedades neuropsiquiátricas. Según las directrices del Manual Estadístico y Diagnóstico de los Trastornos Mentales de la Asociación Psiquiátrica Americana (DSM-V), en los episodios depresivos típicos, el enfermo debe de mostrar al menos un síntoma central de la depresión, siendo estos el humor depresivo y la pérdida de interés por los estímulos placenteros también llamada anhedonia. Asimismo, otras manifestaciones que muy frecuentemente acompañan a los episodios depresivos son:

1. Pérdida o ganancia de peso significativa (p.ej. cambio superior al 5% del peso corporal en un mes).
2. Trastornos del sueño (insomnio o somnolencia).
3. Agitación o enlentecimiento psicomotor.
4. Fatiga o disminución de la vitalidad que lleva a una reducción del nivel de actividad.
5. Pérdida de la confianza en sí mismo y sentimientos de inferioridad.
6. Disminución de la habilidad para pensar o concentrarse o indecisión.
7. Pensamientos recurrentes sobre la muerte o ideación suicida.

Para ser diagnosticado un episodio depresivo, en general, los síntomas deben mantenerse al menos dos semanas, aunque períodos más cortos podrían ser aceptados si los síntomas son excepcionalmente graves.

La magnitud de los trastornos depresivos queda determinada por la intensidad de los síntomas. De este modo, la depresión es leve cuando ninguno de los síntomas está presente en un grado intenso. En estos casos, el enfermo suele encontrarse afectado y tiene alguna dificultad para llevar a cabo su actividad laboral y social, aunque es probable que continúe con sus actividades cotidianas. En una depresión moderada, varios síntomas pueden presentarse en grado intenso y el enfermo suele tener grandes dificultades para

poder continuar desarrollando su actividad social, laboral o doméstica. Durante un episodio depresivo grave, el enfermo suele presentar una considerable angustia o agitación y es probable que la pérdida de autoestima o los sentimientos de inutilidad sean importantes así como el riesgo de suicidio en los casos particularmente graves.

También hay que considerar que la alteración del estado de ánimo, en ocasiones, puede estar enmascarada por otros síntomas tales como irritabilidad, consumo excesivo de alcohol, exacerbación de fobias, síntomas obsesivos persistentes o preocupaciones hipocondríacas.

La gravedad de esta enfermedad radica, no sólo en la eficacia limitada de los tratamientos actuales, sino sobre todo en la larga duración de la enfermedad o también, en el elevado riesgo de convertirse en recurrente y/o crónica. Así, la evolución temporal de la enfermedad puede oscilar entre meses y años, o incluso persistir de manera indefinida, variando en severidad pero nunca desapareciendo totalmente (Coryell y col., 1994). A su vez, aunque algunos individuos pueden experimentar un único episodio de depresión, es frecuente sufrir recaídas o recurrencias. Concretamente, datos recogidos a partir de los años 80, muestran que entre el 50 y el 85% de los pacientes medicados que padecen un episodio de depresión mayor, tendrán al menos un episodio adicional (Keller, 1985).

La depresión es la patología psiquiátrica más frecuentemente diagnosticada en los países desarrollados. Si bien las cifras varían en función de los estudios, se calcula que aproximadamente la incidencia de dicha enfermedad en la población europea es del 5% aunque formas menos severas de la enfermedad afectan hasta a un 10% de la población. En España concretamente, un estudio reciente muestra que se han duplicado los casos de trastornos depresivos debido a la crisis económica que azota al país y a Europa (Gili y col., 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que una de cada cinco personas llegará a desarrollar un cuadro depresivo a lo largo de su vida, de suficiente magnitud y duración como para necesitar un tratamiento farmacológico adecuado. Se estima, además, que esta patología será la primera causa de discapacidad en el mundo para el año 2020.

A escala mundial, la incidencia de esta enfermedad es hasta dos veces más alta en las mujeres que en los hombres. Su prevalencia varía en función de la edad y actualmente está aumentando el número de pacientes jóvenes, de 15 a 24 años, que la padecen. Este aumento parece concomitante a la exposición a situaciones estresantes y a otros trastornos como la ansiedad, hiperactividad y déficit de atención. Se piensa, asimismo, que la dependencia al alcohol y a otras sustancias podrían guardar estrecha relación con el aumento de la incidencia de la depresión en la población joven (Costello y col., 2002).

Desde una perspectiva socioeconómica, esta patología conlleva casi siempre un cierto grado de incapacidad laboral y/o social durante periodos más o menos prolongados, afectando a la calidad de vida de las personas que la padecen y a sus familiares. Estos aspectos, unidos a la necesidad de administrar tratamientos prolongados y a la alta frecuencia de recaídas, suponen una importante carga económica para los sistemas nacionales de salud de los países desarrollados.

En la actualidad el Manual Estadístico y Diagnóstico de los Trastornos Mentales de la Asociación Psiquiátrica Americana (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, DSM V; American Psychiatric Association, 2009) clasifica los cuadros depresivos en **depresión mayor** que puede ser **unipolar y bipolar** en función de si sólo se producen síntomas depresivos o si hay una combinación de fases de depresión con estados de excitación o manía; **trastornos ciclotímicos o distímicos**, que se definen como trastornos del humor considerados como una forma suave de trastorno bipolar en el caso de los ciclotímicos y como trastornos afectivos crónicos de carácter depresivo leve en el caso de las distimias, y **trastornos depresivos no especificados**.

1.2. Tratamiento farmacológico de la depresión

El tratamiento farmacológico de la depresión se basa en el restablecimiento de los niveles de los neurotransmisores serotonina y/o noradrenalina, deficitarios en el proceso de la enfermedad, según la hipótesis clásica monoaminérgica de la depresión (Schildkraut, 1965).

Entre los primeros antidepresivos utilizados en terapéutica se incluyen los antidepresivos tricíclicos (p.ej. imipramina, clomipramina, amitriptilina, trimipramina, amitriptilina, doxepina,...) y los inhibidores de la enzima monoaminoxidasa (IMAOs). No obstante, la frecuencia de los efectos adversos, cardiotoxicidad asociada al empleo de tricíclicos o crisis hipertensivas producidas por IMAOs en interacción con alimentos ricos en tiramina, y su ineficacia en un porcentaje importante de los pacientes, originó el desarrollo de nuevos fármacos, como los inhibidores reversibles de la MAO (moclobemida) o los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS).

Los ISRS, como la fluoxetina, paroxetina, citalopram, sertralina y fluvoxamina, adquirieron gran relevancia en la década de los 80, ya que carecen de los efectos adversos anticolinérgicos presentes en los antidepresivos tricíclicos y son fármacos con una mayor seguridad. Estrategias farmacológicas más recientes desarrollaron compuestos inhibidores de la recaptación de noradrenalina y serotonina como la venlafaxina o duloxetina o con acción selectiva noradrenérgica como la reboxetina. También se ha confirmado la eficacia clínica de fármacos con una acción combinada, inhibidores de la recaptación de aminas y moduladores de distintos receptores como la mirtazapina (antagonista de receptores 5-HT_{2A} y α_2 -adrenérgicos), o la trazodona (antagonista de receptores 5-HT_{2A}). Por último, los inhibidores de la recaptación de dopamina y noradrenalina, como el bupropión, también han mostrado poseer una amplia eficacia antidepresiva así como para el tratamiento de ciertas adicciones, como el tabaco. Sin embargo, en conjunto, estos compuestos no han logrado mejorar la eficacia clínica de los antidepresivos clásicos de manera sustancial, ni tampoco disminuir el tiempo de latencia desde el inicio del tratamiento hasta la aparición del efecto terapéutico esperado (Blier, 2003).

La tianeptina también es un fármaco antidepresivo de estructura química parecida a los tricíclicos pero con una acción farmacológica distinta y en parte desconocida. En cerebro de rata se ha demostrado que la administración aguda de tianeptina estimula la recaptación de serotonina *in vivo*, e incrementa en los niveles de 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), metabolito de la 5-HT (Fattaccini y col., 1990; Labrid y col., 1992). También, se ha sugerido recientemente, que la acción antidepresiva podría estar mediada por la modulación de receptores de glutamato (NMDA y AMPA) (Zoladz y col. 2008). Este

fármaco ha resultado también ser efectivo en test de screening con animales como el test de Porsolt (Mocaër y col., 1988; Thiebot y col., 1992; Kelly y Leonard, 1994), y en ensayos clínicos (Guelfi, 1992) donde muestra menores efectos adversos que los antidepresivos tradicionales.

Por último, un fármaco que representa una innovación potencial para el tratamiento farmacológico de la depresión es la agomelatina. Este fármaco es un agonista melatoninérgico que actúa sobre los receptores de melatonina (MT) MT1 y MT2 y adicionalmente es un antagonista 5-HT_{2C}. Se ha visto además que aumenta la liberación de dopamina y noradrenalina, especialmente en corteza prefrontal sin alterar los niveles extracelulares de serotonina. Todo esto, así como la eficacia, tolerabilidad y seguridad de este compuesto ya se ha determinado en varios estudios doble-ciego (Kennedy y col., 2008; Hickie y Rogers, 2011; Srinivasan y col., 2012).

1.3. Neurobiología de la depresión

La depresión es una enfermedad que, como sucede con la mayoría de los trastornos psicológicos, parece tener un origen multifactorial, aunque todavía no está claro en qué medida contribuyen cada uno de los factores en el desarrollo del trastorno depresivo. Las causas y factores desencadenados van desde aquellos de naturaleza estrictamente biológica hasta los de naturaleza psicológica y social. Generalmente, se piensa que es necesaria una interacción entre los distintos factores para que se desarrolle un trastorno depresivo.

1.3.1. Hipótesis monoaminérgica

La teoría monoaminérgica de la depresión fue propuesta por Schildkraut en 1965 (Schildkraut, 1965) y postula que los trastornos depresivos son el resultado de deficiencias en las funciones monoaminérgicas, noradrenérgicas y/o serotoninérgicas, en áreas límbicas del cerebro. Esta teoría se desarrolló a partir de asociaciones observadas entre los efectos clínicos de varios fármacos que alivian los síntomas depresivos y los efectos neuroquímicos sobre la transmisión cerebral monoaminérgica. El hecho de que los

antidepresivos, provoquen un aumento de dichas monoaminas en la hendidura sináptica apoya la hipótesis monoaminérgica. Sin embargo, aunque el tratamiento con fármacos antidepresivos parece restablecer los niveles de dichos neurotransmisores de forma inmediata, el efecto terapéutico no se pone de manifiesto hasta transcurrido varias semanas desde el inicio del tratamiento.

Existen varias razones para considerar que la mera deficiencia de aminas biógenas es insuficiente para explicar el desarrollo de la depresión. En primer lugar, los antidepresivos tradicionales no son efectivos en aproximadamente un 30-40 % de los pacientes con depresión mayor (Schatzberg, 2000) y su efecto terapéutico no comienza hasta al cabo de varias semanas de tratamiento, a pesar del aumento inmediato de los niveles de monoaminas. En segundo lugar, la depleción experimental de monoaminas produce un empeoramiento moderado del humor en pacientes deprimidos no tratados, pero no afecta en absoluto a los controles sanos (Charney, 1998). En tercer lugar, se ha visto que drogas que aumentan los niveles de monoaminas como la cocaína o las anfetaminas carecen de propiedades antidepresivas.

Dado que son necesarias de dos a tres semanas de tratamiento antidepresivo para obtener el efecto terapéutico, la investigación experimental actual se centra en los cambios bioquímicos que ocurren en el cerebro después del tratamiento crónico con el antidepresivo. Esto ha dado lugar a la hipótesis de que es necesario una adaptación de los receptores a largo plazo como consecuencia de una activación persistente de los mismos por el aumento de los niveles de serotonina y noradrenalina en la hendidura sináptica. Por ejemplo se ha observado que el tratamiento crónico con antidepresivos, desensibiliza los receptores 5HT_{1A} 5HT₂ y α 2-adrenérgicos, fenómeno coincidente en el tiempo con el inicio del efecto terapéutico del antidepresivo.

Si bien, aunque la hipótesis monoaminérgica en su forma mas simple no proporciona una explicación suficiente de la depresión, la manipulación farmacológica de la transmisión monoaminérgica sigue siendo el método terapéutico mas satisfactorio a día de hoy. A continuación, se describen estudios dirigidos a determinar la implicación de cada monoamina en la depresión.

Implicaciones de sistema serotoninérgico en la depresión

El sistema serotoninérgico es muy complejo y las neuronas centrales serotoninérgicas se encuentran localizadas en el núcleo del rafe (Jans y col. 2006), sin embargo sus axones proyectan a casi a todo el cerebro. Debido a que el sistema serotoninérgico es un sistema modulador, es difícil definir su función exacta (Stafford y col., 2001). Así, este sistema se encuentra implicado en numerosos procesos fisiológicos y conductuales, incluyendo el humor, apetito, sueño, trastornos obsesivos-compulsivos, trastornos del apetito, agresión, suicidio, impulsividad, alcohol y síndrome premenstrual (Heninger y col., 1996).

Primeramente, la evidencia de una disfunción serotoninérgica en la depresión se basa en estudios que muestran que la depleción de triptófano –y por consiguiente disminución de 5-HT puede causar síntomas depresivos en individuos vulnerables al desarrollo de depresión en base a su historial personal o familiar (Heninger y col., 1984; 1996; Ellenbogen y col. 1999; Klaassen y col. 1999; Moreno y col. 1999; Neumeister y col 2004).

A su vez, varios marcadores serotoninérgicos se han observado alterados en pacientes deprimidos, como niveles disminuidos de triptófano en plasma (Coppen y col., 1973; Cowen y col., 1989) y del 5-HIAA en fluido cerebroespinal (CSF) (Asberg y col., 1976) y quizás uno de los hallazgos más constantes y más abundantemente replicados sea la preponderancia de intentos de suicidio en pacientes depresivos con niveles bajos de 5-HIAA, sugiriendo una alteración del metabolismo 5-HT en el sistema nervioso central. También se han observado niveles elevados de la enzima triptófano hidroxilasa 2 (TPH2) en el núcleo dorsal del rafe en pacientes deprimidos, tanto del RNAm (Bach-Mizrachi y col., 2006, 2008) como de la proteína (Underwood y col., 1999; Bonkale y col., 2006). Estos aumentos podrían ser debidos a la influencia genética, eventos estresantes en la edad temprana o experiencias estresantes. Otros estudios muestran un aumento del receptor 5-HT_{2c} (Iwamoto y Kato, 2003), que concuerda con la potencial acción antidepressiva de antagonistas selectivos de 5-HT_{2c} (Cremersns y col., 2004; Cryany y Lucki, 2006).

Estudios de imagen han mostrado una reducción en la unión al receptor 5-HT_{1A}, tanto post- como presináptico, en pacientes deprimidos que no se normaliza tras la remisión (Drevets y col., 1999; Sargent y col., 2000). Estudios genéticos más recientes han descrito una asociación entre el polimorfismo G/G (Htr1a C (-1019) G) en la región promotora del gen Htr1a, y la falta de respuesta a los antidepresivos (Fakra y col., 2009; Le François y col., 2008). Concretamente se ha observado que las personas que poseen este polimorfismo presentan niveles más elevados del receptor 5-HT_{1A} en el rafe, y por tanto sería previsible una disminución del tono serotoninérgico que explicaría la mayor vulnerabilidad a la depresión y la resistencia al tratamiento antidepresivo. Por el contrario el polimorfismo C/C (Htr1a C (-1019) G) presenta niveles bajos del autorreceptor 5-HT_{1A} y se asocia con una mejor respuesta al tratamiento antidepresivo.

Otros estudios genéticos han mostrado un polimorfismo en la región promotora para el gen del transportador de 5-HT, y se ha observado que un alelo corto es dominante y resulta en una expresión menos de este transportador y en una peor respuesta al estrés y al tratamiento antidepresivo (Caspi y col., 2003). Estos estudios han sido confirmados a nivel experimental en modelos animales (Richardson-Jones y col., 2010) y confirman que estos factores podrían alterar la neurotransmisión serotoninérgica y estar implicado en la susceptibilidad al desarrollo de depresión mayor (Wurtman, 2005).

Sin embargo, a día de hoy, decir que el déficit serotoninérgico sea la causa primaria en la depresión está caduco: no todos los pacientes presentan anomalías 5-HT, no todos ellos responden a los fármacos que aumentan la transmisión serotoninérgica, y numerosos fármacos que no afectan al sistema serotoninérgico poseen propiedades antidepresivas. Por tanto, actualmente la alteración en la transmisión de 5-HT se acepta como un factor de riesgo biológico, y se habla más bien de vulnerabilidad serotoninérgica (Maes y col., 1995).

Implicaciones del sistema noradrenérgico en la depresión

Numerosas evidencias sugieren que la noradrenalina (NA) es un neurotransmisor de gran importancia en la fisiopatología y el tratamiento de la depresión. En los estados depresivos se ha observado desincronización de las descargas de NA del locus coeruleus

cuyas proyecciones inervan el sistema límbico, que está implicado en la regulación de las emociones (Stahl, 2003). Los antidepresivos tricíclicos son los fármacos nordrenérgicos más usados, de hecho, la imipramina, es considerado como el “patrón de oro” de los antidepresivos (Workman y Short, 1993).

Estudios genéticos humanos han demostrado que variaciones en el gen que codifica para el transportador de NA, encargado de la recaptación de la NA dentro de la célula, se relacionan con la susceptibilidad a padecer depresión (Lin y Madras, 2006). Concretamente, una disminución de la unión al transportador de NA en el *locus coeruleus* podría regular negativamente la transmisión de NA y contribuir a un estado depresivo (Klimek y col., 1997).

A su vez, en la corteza prefrontal de víctimas de suicidio deprimidas han mostrado alteraciones en la densidad y la sensibilidad de los adrenoreceptores α_{2A} , los cuales modulan negativamente la liberación de NA (Ordway y col., 2003; Escribá y col., 2004; Valdizán y col., 2010). Se ha sugerido que estas alteraciones podrían ser causa de la depresión o bien el resultado de cambios adaptativos debido a la alteración de la neurotransmisión de NA (Moret y Briley, 2011).

Implicaciones del sistema dopaminérgico en la depresión

La dopamina (DA) es la catecolamina predominante en el cerebro de los mamíferos, la cual influye en una gran variedad de funciones tales como la actividad locomotora, la memoria, las emociones, la ingesta de alimentos o la regulación endocrina (Drago y col., 2011).

Múltiples evidencias apuntan a una disminución de la neurotransmisión dopaminérgica en los trastornos de depresión mayor (Dunlop y Nemeroff, 2007). Concretamente, la incidencia de la depresión mayor en pacientes de enfermedad de Parkinson es del 5% a 10% (Tandberg y col., 1996), lo cual ha supuesto un impulso adicional a buscar la participación de DA en la depresión.

Varios estudios post-mortem de sujetos con depresión severa, han demostrado concentraciones reducidas de los metabolitos de DA, tanto en el líquido cefalorraquídeo

como en las regiones cerebrales que median en el estado de ánimo y la motivación (Bowden y col., 1997a,b; Engström y col., 1999). A su vez, estudios de neuroimagen apoyan la hipótesis de que la depresión mayor se asocia con un estado de reducción de la transmisión de DA, que podrían ser causada por una sobre-regulación compensatoria de los receptores dopaminérgicos D₂ (D'Haenen y Bossyt, 1994; Shah y col., 1997).

Mediante resonancia magnética funcional se ha visto que los sujetos deprimidos tienen una respuesta amplificada a los efectos gratificantes de los psicoestimulantes, los que aumentan la disponibilidad de DA en el espacio sináptico (Tremblay y col., 2002; 2005). Esto podría ser debido a que en la depresión severa hay una reducción en la liberación de DA que da lugar a mecanismos de compensación, como una hipersensibilidad de receptores DA postsinápticos y una disminución de transportadores de DA, lo cuales provocan un incremento de la señal dopaminérgica

Por último, los modelos animales de depresión mayor, como el estrés crónico suave (chronic mild stress, CMS), muestran evidencias de alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica. Los roedores expuestos a este modelo muestran disminución del receptor D₂/D₃ en el núcleo accumbens, que es revertido por el tratamiento crónico con antidepresivos (antidepresivos tricíclicos, ISRS o mianserina) (Papp y col., 1994). Además, cuando estos roedores "recuperados" se exponen a antagonistas D₂/D₃, re-emerge la conducta anhedónica (Willner y col., 1992; Cheeta y col., 1994). En la prueba de natación forzada, la inmovilidad de los roedores es revertida por los agonistas D₂/D₃, mientras que el efecto de los antidepresivos puede ser inhibido por antagonistas D₂/D₃ (Borsini y col., 1988; Basso y col., 2005).

1.3.2.- Alteraciones de la plasticidad sináptica

La neuroplasticidad abarca diversos procesos de vital importancia mediante los que el cerebro percibe, se adapta y responde a una gran variedad de estímulos internos y externos. La OMS (1982) define el término neuroplasticidad como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente después de estar sujetas a influencias patológicas ambientales o del desarrollo, comprendiendo a traumatismos y enfermedades. Esto permite una respuesta adaptativa a una demanda

funcional. Las manifestaciones de neuroplasticidad en el SNC adulto incluyen alteraciones en la función dendrítica, remodelación sináptica, procesos implicados en aprendizaje y memoria como la potenciación sináptica a largo plazo (LTP; long term potentiation) y la depresión sináptica a largo plazo (LTD; long term depression), ramificación axonal, extensión neuronal, sinaptogénesis y neurogénesis (Mesulam y col., 1999). Estudios morfológicos del cerebro (*in vivo* y postmortem) han mostrado la magnitud de los procesos asociados a neuroplasticidad y como éstos podrían estar implicados en la fisiopatología de alteraciones del comportamiento, incluida la depresión (Manji y col., 2003).

Numerosas evidencias apuntan a que la depresión pudiera estar relacionada con alteraciones en la expresión de genes, lo que produciría una disminución de la plasticidad neuronal en regiones críticas del cerebro (Duman, 2002). Existen estudios que hacen uso de modelos animales como el CMS en los que se demuestra la atrofia y muerte de neuronas corticales e hipocámpales. Así mismo el tratamiento con antidepresivos es capaz de producir un aumento de la supervivencia y función neuronal y de antagonizar la pérdida de neuroplasticidad producida por el estrés (Alonso y col. 2004, Warner-Schmidt y Duman 2006).

El citoesqueleto tiene un papel primordial en la plasticidad sináptica, ya que genera nuevas conexiones sinápticas a través de la formación de axones y dendritas. Por ello, numerosas evidencias sugieren que la depresión podría ser una enfermedad del citoesqueleto y que esta estructura celular puede ser un blanco terapéutico en el tratamiento de la depresión, para reestablecer las dendritas y los axones perdidos y la conectividad sináptica. Estas alteraciones anatómicas se han establecido a partir de estudios histológicos post-mortem. En éstos se demostró una disminución del tamaño de las neuronas en diversas estructuras cerebrales como la corteza prefrontal, en particular una disminución en la longitud de las dendritas y en el número de las espinas dendríticas (Rosoklija y col., 2000; Chana y col., 2003).

Se cree que las espinas dendríticas desempeñan un papel primordial en la plasticidad neuronal. Se ha demostrado que algunas formas de aprendizaje aumentan el número de espinas dendríticas (Geinisman, 2000; Yuste y Bonhoeffer, 2001; Nimchinsky

y col., 2002; Leuner y col., 2003). Dado que la mayoría de las sinapsis excitadoras se producen en las espinas dendríticas (Nimchinsky y col., 2002), no es de extrañar que ante una situación de estrés, las neuronas intenten evitar la apoptosis retrayendo las dendritas y disminuyendo el número de espinas, lo que limita el número de receptores de glutamato expuestos (Gorman y Docherty, 2010). Así, en modelos animales de estrés crónico o elevadas concentraciones de corticosterona, se ha documentado ampliamente una marcada atrofia dendrítica y pérdida de sinapsis en diversas regiones cerebrales (Sousa y col., 2000; Vyas y col., 2002; Tata y Anderson, 2010). Esta atrofia puede ser invertida por la administración de antidepresivos de varias clases. Además, las alteraciones conductuales encontradas como anhedonia e indefensión se han asociado estrechamente con retracción dendrítica más que con una disminución de la neurogénesis (Bessa y col., 2009). Por todo ello, la densidad de espinas parece tener un papel primordial en los trastornos depresivos.

Así, la hipótesis neurotrófica de la depresión se basa en observaciones en las que se ha visto cómo los descensos de los niveles hipocampales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) se correlacionan con comportamientos depresivos. Asimismo, el tratamiento antidepresivo aumenta la expresión de este factor neurotrófico (Duman y Monteggia, 2006).

Los pacientes con depresión mayor tienen niveles disminuidos de BDNF en cerebro (Altar y col., 2009) y suero (Cunha y col., 2006; Palomino y col., 2006; Sen y col., 2008). Es más, se ha observado una correlación entre la severidad del estado depresivo y los niveles en plasma de BDNF (Duncan y col., 2009). Se ha sugerido que el retraso del efecto antidepresivo se debe al tiempo necesario para producir mecanismos neuroadaptativos que puedan mejorar la plasticidad neuronal (Kozisek y col., 2008; Pittenger y Duman, 2008). A lo largo de esta línea de razonamiento, varios estudios han demostrado que el BDNF podría mediar la acción terapéutica de los antidepresivos (Berton y Nestler, 2006; Groves, 2007; Martinowich y col., 2008). Hay un gran número de pruebas que documentan que los tratamientos crónicos antidepresivos, incluyendo ISRS y choque electroconvulsivo, aumentan la expresión de BDNF en el hipocampo en modelos animales. Estos efectos son dependientes de la administración crónica de la

terapia antidepresiva, consistente con el transcurso del tiempo de los tratamientos antidepresivos (Russo-Neustadt y col., 2003; Castren y col., 2007).

Asimismo, en modelos animales, el estrés disminuye los niveles de BDNF en estructuras límbicas, esenciales para el control del humor y el tratamiento antidepresivo revierte o bloquea estos efectos (Nestler y col., 2002; Duman y Monteggia, 2006),

Dada la estrecha relación entre BDNF y la proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico (cAMP response element-binding, CREB), que actúa como factor de transcripción (**Figura 1**), parece que éste también está implicado tanto en el mecanismo de acción de los antidepresivos, como en la propia enfermedad (Banar y col., 2004; Warner-Schmidt y Duman, 2006; Im y Kenny, 2012). Estudios post-mortem en la corteza temporal de pacientes con depresión mayor tratados con antidepresivos mostraron un aumento de niveles de CREB, mientras que los no tratados presentaban una disminución de dichos niveles (Dowlatshahi y col., 1998; Yamada y col., 2003). Además, en fibroblastos de pacientes deprimidos se ha visto una reducción de los receptores β -adrenérgicos que estimulan la fosforilación de CREB (Manier y col., 2002). A su vez, la fosforilación de CREB en linfocitos T de sangre periférica fue significativamente mayor en el grupo de pacientes deprimidos que respondió a la terapia antidepresiva en comparación con el grupo que no lo hizo (Koch y col., 2002).

Estudios en animales muestran que roedores que sobreexpresan CREB en el giro dentado del hipocampo tienen una conducta equiparable a ratones tratados con antidepresivos en el test de natación forzada (Chen y col., 2001). Curiosamente, la función de CREB no es igual en todas las áreas cerebrales, ya que la sobreexpresión de CREB en la amígdala basolateral o en el núcleo accumbens produjeron respuestas tipo pro-depresivas en los modelos de indefensión aprendida (Pliakas y col., 2001) y de natación forzada (Wallace y col., 2004).

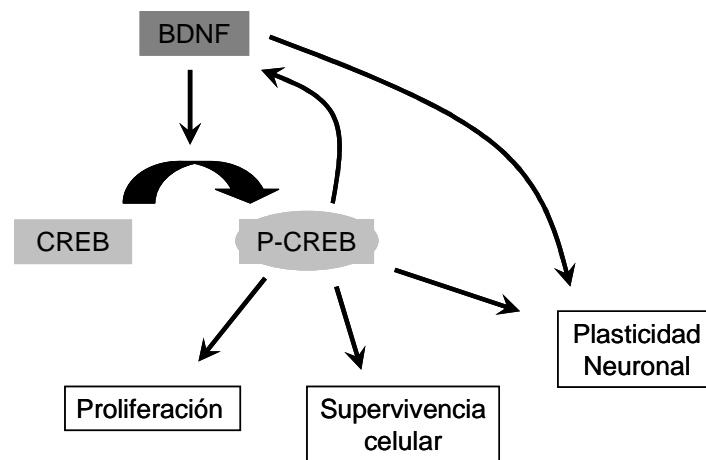


Figura 1. Relación CREB-BDNF en la neuroplasticidad.

La hipótesis neurogénica de la depresión propone que una disminución de la neurogénesis podría tener un papel relevante en la patogénesis de esta enfermedad. Así, existen numerosos estudios que muestran una reducción de la neurogénesis hipocámpal en distintos modelos animales de depresión y una estimulación de la misma tras el tratamiento con diversos tipos de antidepresivos (Malberg y col., 2000; Kempermann, 2002; Kempermann y Kronenberg, 2003; Alonso y col., 2004; Jayatissa y col., 2006; Kronenberg y col., 2009). La exposición a distintos agentes estresantes también disminuye la proliferación celular y la neurogénesis (Gould y col., 1997; Dranovsky y Hen., 2006; Mineur y col., 2007) lo cual, lleva a proponer que el estrés crónico podría precipitar episodios depresivos mediante la alteración de la neurogénesis hipocámpal.

No obstante, la implicación de la neurogénesis en la precipitación del comportamiento depresivo, está siendo últimamente cuestionada. En los últimos años se ha postulado que la disminución de este proceso no es esencial para que se produzca la sintomatología depresiva (Vollmayr y col., 2003; Sapolsky, 2004; Jayatissa y col., 2009). Por un lado, los estudios clínicos llevados a cabo con pacientes deprimidos no muestran cambios en la proliferación celular (Reif y col., 2006). Además, la disrupción de la

neurogénesis mediante rayos X en roedores (Surget y col., 2008) no parece afectar al fenotipo conductual depresivo y en algunos estudios se ha observado desesperación conductual sin necesidad de una disminución en la proliferación celular (Vollmayr y col., 2003). Además, cada vez hay un mayor número de trabajos que consideran que el aumento de la neurogénesis no es imprescindible para que se produzca la mejoría de la sintomatología depresiva (Huang y col., 2008; Holick y col., 2008; David y col., 2009; Bessa y col., 2009). A su vez, hay que considerar que para que el incremento de la neurogénesis sea beneficioso, las nuevas neuronas generadas en el hipocampo deben de integrarse adecuadamente en las redes neuronales existentes con una apropiada diferenciación y migración (Schafman y Hen 2007; Pechnick y Chesnokova, 2009).

Por último, cabe destacar que cada vez existe una mayor evidencia que sugiere la implicación de las células de la glia en la patología depresiva. Esta afirmación se basa en distintas investigaciones llevadas a cabo con tejido post-mortem de pacientes deprimidos y en distintos modelos animales de depresión, en los que se muestra un descenso de células gliales, sobre todo en regiones corticales (Cotter y col., 2001; Bowley y col., 2002; Jayatissa y col., 2006; Banasr y Duman, 2008).

1.3.3. Implicación de los sistemas de Glutamato y GABA

El ácido L-glutámico (glutamato) es el neurotransmisor excitatorio por excelencia de la corteza cerebral humana. Al igual que otros neurotransmisores, el glutamato se almacena en vesículas sinápticas y se libera a través de una exocitosis dependiente de calcio. Todas las neuronas contienen glutamato, pero sólo unas pocas lo usan como neurotransmisor. Es potencialmente excitotóxico, por lo que existe una compleja maquinaria para que los niveles de esta sustancia estén siempre regulados. Debido a su papel en la plasticidad sináptica, el glutamato está involucrado en funciones cognitivas tales como aprendizaje y memoria. Por otro lado el ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral. Deriva del ácido glutámico, mediante la descarboxilación realizada por la glutamato-descarboxilasa (GAD) y juega un papel principal en el control de la excitabilidad a través del sistema nervioso. La amplia distribución del GABA y el hecho de que la práctica totalidad de las neuronas son sensibles a sus efectos inhibidores reflejan una función ubicua dentro del encéfalo. Se ha

calculado que el GABA actúa como transmisor en alrededor el 30% de todas las sinapsis del SNC.

Alteraciones en el equilibrio excitatorio/inhibitorio

Estudios clínicos y preclínicos conceden un valor esencial al sistema glutamatérgico y GABAérgico y un posible interés terapéutico a dianas pertenecientes a ambos sistemas en el tratamiento de la depresión si bien se desconocen los mecanismos moleculares implicados (revisión de Javitt, 2004; Kendell y col., 2005). Por ejemplo, estudios en fluido cerebroespinal de pacientes deprimidos muestran una disminución de GABA (Vieira y col., 2006). Además, mediante resonancia magnética espectroscópica se ha mostrado que los pacientes deprimidos presentan un aumento de glutamato y una disminución de GABA en distintas regiones corticales (Bhagwagar y col., 2007), lo que se traduce en un aumento del cociente excitatorio-inhibitorio, que además, se correlaciona con el grado de melancolía que presentan estos pacientes (Sanacora y col., 2004). Además, este desequilibrio, se ve normalizado tras dos meses de tratamiento con el tratamiento antidepresivo (Sanacora y col., 2006). La síntesis del glutamato y GABA comparten las mismas vías metabólicas (**Figura 2**). Como se describe a continuación se ha sugerido que el desequilibrio entre estos sistemas podría tener una causa común dentro de este ciclo, bien a nivel de la terminal glutamatérgica, GABAérgica o de las células gliales.

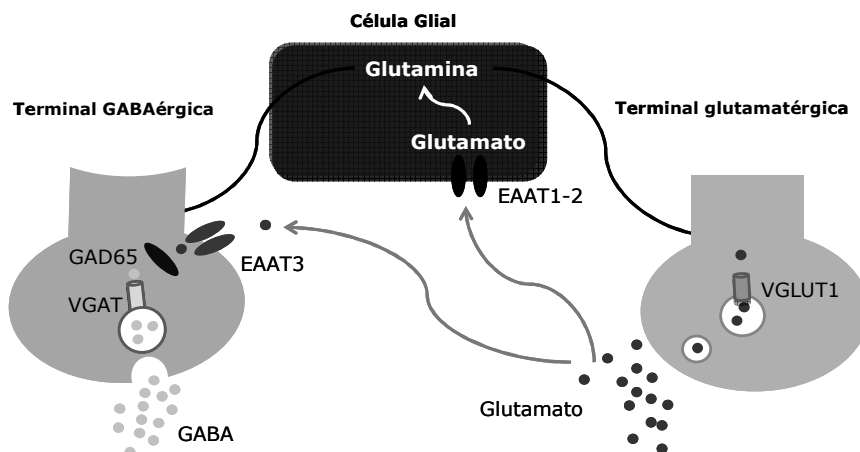


Figura 2. Esquema representativo del ciclo glutamato-GABA.

El transportador vesicular de glutamato (VGLUT) es una proteína sináptica vesicular (synaptic vesicle protein; SVP) encargada de un paso esencial de la transmisión sináptica glutamatérgica como es la recaptación del glutamato citosólico al interior de la vesícula. El transportador VGLUT1 es capaz de regular la transmisión glutamatérgica en distintas regiones clásicamente relacionadas con la depresión como la corteza frontal y el hipocampo (Fremeau y col., 2004; Wojcik y col., 2004). Diversos estudios clínicos (Uezato et al., 2009) han observado una relación entre la disminución de los niveles de VGLUT1 y la depresión mayor. A su vez, a nivel experimental los ratones heterocigóticos para VGLUT1 (VGLUT1+/-) que presentan niveles disminuidos de VGLUT1 en corteza y en el hipocampo, muestran un comportamiento depresivo, ansiedad, deterioro de la memoria de reconocimiento (Tordera y col., 2007; García-García y col., 2009) y el tratamiento con diferentes fármacos antidepresivos (fluoxetina, paroxetina y desipramina), así como con shocks electroconvulsivos aumentan la expresión de este transportador y son capaces de revertir las alteraciones conductuales (Moutsimilli y col., 2005; Tordera y col., 2005).

Se ha sugerido que variaciones de los niveles de glutamato sináptico liberado podrían limitar la recaptación de éste por parte de la glia o de la terminal GABAérgica y afectar así a la síntesis de GABA, y concretamente al balance excitatorio/inhibitorio.

Por otra parte, el papel de las células gliales en el reciclaje del glutamato a través del ciclo glutamato/glutamina para su reutilización o para la síntesis de GABA, es de especial importancia en los procesos patológicos de las alteraciones del humor (Kugaya y Sanacora, 2005). Estudios post-mortem en humanos muestran una disminución de los transportadores de glutamato gliales EAAT2 y EAAT3 así como de las enzimas glutamina sintetasa en áreas de la corteza cerebral de pacientes deprimidos. Estos cambios podrían limitar la síntesis de GABA y elevar los niveles extracelulares de glutamato considerablemente, el cual, es potencialmente neurotóxico y podría afectar a la eficiencia de la neurotransmisión (Choudary y col., 2005; Soriano y Hardingham, 2007).

Alteraciones en receptores postsinápticos del sistema glutamato/GABA

Numerosos estudios sugieren una implicación de los receptores postsinápticos de glutamato como los NMDA y AMPA (Skolnick, 2002) y de GABA (GABA_A y GABA_B) (Sanacora y Saricicek, 2007) en la depresión y un potencial valor terapéutico de estas dianas. Sin embargo, también se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes. Se han observado niveles reducidos de las subunidades GluR2 y GluR3 de los receptores AMPA en la corteza prefrontal de pacientes deprimidos (Hashimoto y col., 2007), así como un aumento de la actividad de los mismos con el tratamiento crónico con imipramina (Du y col., 2004; Martínez-Turrillas y col., 2007).

La implicación de los receptores NMDA en la depresión se ha corroborado tras observar disminución en la expresión de la subunidad NR1 y NR2b en corteza (Choudary y col., 2005; Nudmamud-Thanoi y Reynolds, 2004). Además, se ha descrito una disminución en la expresión de niveles hipocampales de receptores NMDA (Beneyto y col., 2007). Otras evidencias muestran que el aumento de la regulación y/o sobreestimulación de la subunidad NR2a en la amígdala podría jugar un papel fundamental en la etiología de la depresión (Karolewicz y col., 2009).

Por último, parece ser que los receptores GABAérgicos podrían tener un papel importante en los trastornos depresivos. Fiorelli y col., (2008) mostraron que la delección global en ratones del gen GABRA3, que codifica la subunidad α_3 del receptor GABA_A, daba lugar a una mayor desesperación conductual. Además, se ha encontrado una asociación genética entre GABRA3 y los trastornos unipolares (Henkel y col., 2004), aunque otros estudios no han sido capaces de replicar dicha asociación (Massat y col., 2001).

2. LA ANSIEDAD

2.1. Definición y epidemiología clínica

La ansiedad es un estado psicológico y fisiológico caracterizado por componentes cognitivos, somáticos, emocionales y de comportamiento. Estos componentes se combinan para crear una sensación desagradable que se asocia típicamente con inquietud, aprensión, temor o preocupación. Esta, es una condición del estado de ánimo generalizado que a menudo puede ocurrir sin un estímulo identificable.

Los trastornos de ansiedad son la enfermedad psiquiátrica de mayor prevalencia, alcanzando cifras alarmantes en los países desarrollados. De acuerdo con un estudio reciente (Gili y col., 2012), en España este tipo de patologías ha aumentado más de un 8% en los últimos años, coincidiendo con la crisis económica y llegando a afectar a un 20% de la población adulta. En general, suele tener el doble de prevalencia en las mujeres, y las edades más frecuentes de aparición suelen ser entre los 25 y 30 años. Existen considerables variaciones culturales en cuanto a la expresión de la ansiedad (p.ej., en algunas culturas la ansiedad se expresa a través de síntomas predominantes somáticos, y en otras a través de síntomas cognitivos). Es importante tener en cuenta el contexto cultural a la hora de evaluar la gravedad de estas manifestaciones.

Los criterios de diagnóstico psiquiátrico actual reconocen una amplia variedad de trastornos de ansiedad. Dichos trastornos se caracterizan por una respuesta exagerada y anormal frente a estímulos externos, que consta de un comportamiento defensivo y un estado de excitación y alerta. El trastorno de ansiedad suele acompañar a otros trastornos mentales, especialmente depresión clínica, pudiendo llegar a alcanzar una tasa de comorbilidad del 60% (Melartin y col., 2002).

Entre los distintos tipos de ansiedades, el **trastorno de ansiedad generalizada** (TAG) es uno de los más frecuentes. Éste se caracteriza por una preocupación excesiva, incontrolable e irracional a menudo acerca de cosas cotidianas, que es desproporcionada en relación con la verdadera fuente de preocupación.

Otro trastorno de ansiedad relevante y que suelen ir acompañado por una sintomatología depresiva es el **trastorno por estrés postraumático** (TEPT), que es un trastorno de ansiedad que sobreviene como consecuencia de la exposición a un evento traumático que involucra un daño físico y/o profundo trauma psicológico. La **fobia social** es un trastorno de ansiedad que a veces acompaña a los trastornos depresivos. Se caracteriza por un miedo intenso en situaciones sociales que causa una considerable angustia y deterioro de la capacidad de desenvolverse de forma normal en algunas situaciones de la vida cotidiana.

La ansiedad suele ir acompañada de una amplia variedad de síntomas físicos, como fatiga, inquietud, dolores de cabeza, náuseas, entumecimiento de manos y pies, tensión muscular, dolores musculares, dificultad para tragar, brotes de dificultad para respirar, dificultad para concentrarse, temblores, contracciones nerviosas, irritabilidad, sudoración, inquietud, insomnio, sofocos, y erupciones cutáneas. Estos síntomas deben ser coherentes y permanentes, persistiendo por lo menos 6 meses, para un diagnóstico formal de trastorno de ansiedad.

2.2. Tratamiento farmacológico de los trastornos de ansiedad

El grupo de fármacos ansiolíticos más importante son las benzodiazepinas (BZD), las cuales se unen al receptor GABA_A y actúan de forma alostérica potenciando su efecto inhibitorio sobre la transmisión sináptica. Sin embargo el tratamiento prolongado presenta efectos adversos importantes tales como deterioro cognitivo, dependencia y síndromes de abstinencia (Stein, 2004). Por eso, si bien serían de primera elección para el tratamiento de distintas manifestaciones de ansiedad a corto plazo, su uso queda mucho más restringido para los trastornos crónicos. En esta línea, análogos de GABA como la pregabalina o la gabapeptina podrían ser una importante alternativa terapéutica (Nemeroff, 2003).

Fármacos ampliamente utilizados para los trastornos de ansiedad son los antidepresivos. Esto es comprensible, dada la elevada tasa de comorbilidad entre la ansiedad y la depresión (Melartin y col., 2002). Si bien, los trastornos de ansiedad

presentan una característica clínica diferenciada y se sabe que no todos los antidepresivos son realmente eficaces. Entre estos, algunos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina tales como la paroxetina, citalopram y fluoxetina son frecuentemente utilizados. De la misma manera, inhibidores de la recaptación de 5-HT y NA como la venlafaxina también son indicadas para la ansiedad generalizada. También se ha mostrado la eficacia clínica de los antidepresivos clásicos como la mirtazapina (Rihmer y Purebl, 2009), inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) (Horwitz, 1964) o tricíclicos. Por último, la tianeptina ha mostrado su eficacia en los trastornos de ansiedad, además de no mostrar efectos indeseables como sedación o alteraciones cognitivas (Kasper y McEwen, 2008).

2.3. Neurobiología de la ansiedad

Una amplia variedad de estudios sugieren que la amígdala organiza distintos componentes de la ansiedad, como la activación autonómica, comportamiento defensivo, hiperreflexia, la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), y otras respuestas (LeDoux, 1996). La amígdala tiene múltiples conexiones con las áreas del cerebro que son responsables de la emoción (Coupland, 2000) (**Figura 3**). La complejidad anatómica de la emoción y su importancia para la supervivencia hace que sea muy probable que muchos neurotransmisores modulen la respuesta de ansiedad

Mientras que la amígdala podría ser una región de activación predominantemente responsable de provocar ciertas emociones, la corteza prefrontal parece ser una región moduladora importante para el control emocional (Furmark, 2009). La corteza prefrontal ejerce un control inhibitorio sobre las respuestas más primitivas del sistema límbico. Sin el control "cognitivo" de la corteza prefrontal, la respuesta de ansiedad produciría patrones de comportamiento más limitados que no podrían ser adecuados para hacer frente a los factores estresantes modernos que no se resuelvan mediante la lucha o la huida.

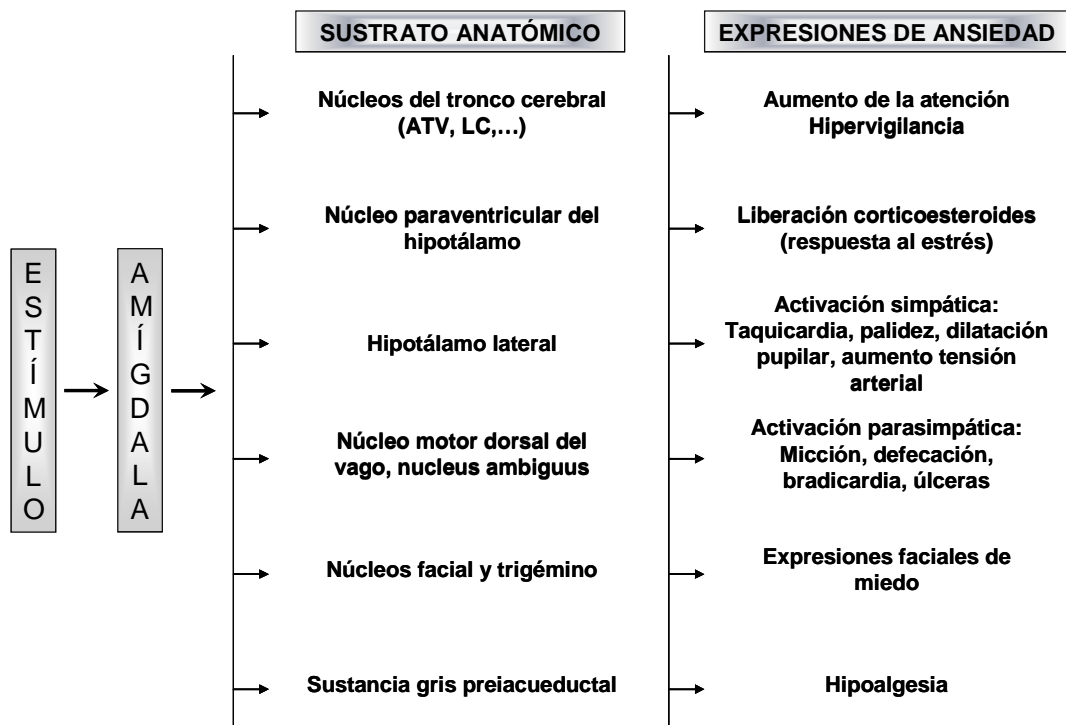


Figura 3. Respuestas provocadas por la activación del núcleo central de la amígdala en las diversas regiones. Adaptado de Coupland, 2000.

2.3.1. Alteraciones monoaminérgicas en la ansiedad

Al igual que en la depresión, la implicación de la serotonina (5-HT) en la ansiedad se basa en gran medida de la eficacia de los tratamientos farmacológicos diferentes.

Se piensa que la 5-HT podría estimular ambas vías ansiogénicas y ansiolíticas dependiendo de la región el subtipo receptor de 5-HT estimulado. Por ejemplo, la microinyección de 5-HT en la amígdala parece aumentar el miedo condicionado, mientras que la inyección de 5-HT en el hipocampo lo inhibe, dando lugar a la hipótesis de que la innervación serotoninérgica de la amígdala y el hipocampo interviene en los efectos ansiógenos o ansiolíticos mediante la estimulación de los receptores 5-HT_{2A} (Graeff y col., 1993) o receptores 5-HT_{1A} respectivamente (Ramboz y col., 1998). Por otro lado, el

hecho de que el estrés y los glucocorticoides disminuyan los niveles de 5-HT_{1A} y aumenten los de 5-HT_{2A} (López y col., 1998), refuerza la hipótesis de que este receptor pueda ser relevante para la fisiopatología de la ansiedad

Clásicamente, los síntomas recurrentes de los trastornos de ansiedad, tales como ataques de pánico, insomnio, sobresalto exagerado, y la excitación sináptica autonómica crónica, se han relacionado con una función noradrenérgica elevada (Charney y col., 1984; Charney y col., 1987; Grillon y col., 1999). De hecho, pacientes con trastorno de estrés postraumático y fobia social muestran evidencias de mayor excitación periférica del sistema nervioso simpático que sería compatible con la hipótesis de aumento de la actividad central de NA en estos trastornos (Hull, 2002; Pohjavaara y col., 2003). Por otra parte, estos pacientes muestran mejoras en sus síntomas con benzodicepinas y opiáceos, sustancias que disminuyen la actividad de descarga neuronal del locus coeruleus.

Existen más evidencias que indican una función noradrenérgica anormal en los trastornos de ansiedad (Blanchard y col., 1992; Southwick y col., 1993; 1997; Lemieux y Coe, 1995; DeBellis y col., 1999; Hawk y col., 2000). Del mismo modo, los niños maltratados con trastorno de estrés postraumático excretan en orina mayores cantidades de DA, NA y de cortisol en 24 horas que en los controles, y las concentraciones urinarias de estas moléculas correlacionan positivamente con la duración del trauma y la severidad de los síntomas del estrés postraumático (DeBellis y col., 1999). Geraciotti y col. (2001) también encontraron que en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con trastorno de estrés postraumático las concentraciones de NA eran anormalmente elevadas. Por último, la densidad de receptores α 2-adrenérgicos en plaquetas (Perry y col., 1987) y la actividad basal de la monoaminoxidasa de plaquetas (Davidson y col., 1985) se redujeron en pacientes con trastorno de estrés postraumático, resultados que sugieren una respuesta compensatoria a la liberación crónica elevada de NA.

La dopamina también juega un papel relevante en la ansiedad. El estrés agudo aumenta la liberación y el recambio de dopamina (DA) en múltiples áreas cerebrales. Las proyecciones dopaminérgicas en el córtex prefrontal medial parecen ser especialmente sensibles al estrés, debido a que estreses breves o de baja intensidad incrementan la

liberación y el recambio de DA en el córtex prefrontal medial (mPFC), en ausencia de los correspondientes cambios en otras proyecciones dopaminérgicas como las del mesoacumbes o nigroestriatales (Deutch y Young, 1995). Por el contrario, el estrés de una mayor intensidad o mayor duración, aumenta la liberación y el metabolismo de DA en otras áreas (Inoue y col., 1994).

Estudios genéticos han descrito que el gen que codifica para la catelo-o-metil transferasa (COMT), que metaboliza la dopamina, podría estar implicado en los trastornos de ansiedad. Concretamente, se ha observado que un polimorfismo de COMT se asocia a una respuesta exagerada frente a diversos estímulos, lo cual podría aumentar su vulnerabilidad a los desórdenes de ansiedad (Montag y col., 2008).

2.2.2. Alteraciones de la plasticidad sináptica

Al igual que en la depresión, una variante en el gen humano de BDNF, que se caracteriza por un cambio de una valina por una metionina en el pro-dominio de la proteína BDNF (posición 66), se ha asociado con una mayor susceptibilidad a los trastornos de ansiedad (Monteggia y col., 2007; Post, 2007; Fielingsdorf y col., 2010). Este polimorfismo también se traduce en déficit en la extinción del miedo (Soliman y col., 2010) y una disminución de BDNF en el hipocampo (Chen y col., 2006). Por lo tanto, farmacoterapias que aumentan el BDNF hipocampo podrían demostrar ser tratamientos eficaces para estos trastornos. Corroborando esta hipótesis, estudios en los que se inhibe la fosforilación de CREB en el hipocampo demuestran que el tratamiento ansiolítico no puede ejercer su acción (Zhang y col., 2010). Además, estudios con ratas ansiosas muestran una correlación entre la conducta ansiosa y una fosforilación disminuida de CREB en amígdala (Pandey y col., 2006), así como una disminución de CREB en hipotálamo e hipocampo (Bhatia y col., 2011).

Por último, diversos estudios muestran también la importancia de la modificación de las espinas dendríticas con la ansiedad. Existe una correlación entre la disminución de espinas dendríticas en la amígdala con una conducta ansiosa (Pandey y col., 2008). Así, ratones ansiosos tras ser sometidos a estrés muestran un aumento de la proteína lipocalina-2, que ha demostrado en cultivos celulares disminuir la maduración de las

espinas dendríticas (Mucha y col., 2011). También ratones knock-out para esta proteína muestran una conducta más ansiosa así como una mayor proporción de espinas maduras, lo que supone un déficit en la neuroadaptación del cerebro en situaciones adversas (Mucha y col., 2011).

2.2.3. Implicaciones de los sistemas de Glutamato y GABA

Hay evidencia considerable que indica un papel de la transmisión GABAérgica alterada en los trastornos de ansiedad humanos (Millán, 2003). Por un lado, el sistema GABAérgico en la amígdala modula el miedo y la ansiedad en condiciones fisiológicas y patológicas (Ehrlich y col., 2009; Pape y Paré; 2010). Además, las benzodiazepinas, que actúan a través de los receptores GABA, se encuentran entre los fármacos ansiolíticos más ampliamente prescritos (Nemeroff, 2003).

Entre los receptores GABAérgicos, concretamente los receptores GABA_A se ha implicado ampliamente en la ansiedad (Atack, 2005). Varias líneas de evidencia preclínica y clínica han demostrado que los agonistas de los receptores de GABA_A ejercen efectos ansiolíticos sugiriendo que la función de estos receptores puede estar alterada en los trastornos de ansiedad. Concretamente, los agonistas tipo BZD potencian y prolongan las acciones sinápticas del neurotransmisor inhibitor, GABA, aumentando la frecuencia de apertura de canales de cloro mediados por GABA (Choi y col., 1981, Study y Barker, 1982). Estos receptores están presentes en todo el cerebro, pero están más densamente concentrados en la sustancia gris cortical. Diversos estudios sugieren que el efecto ansiolítico de las BZD es al menos parcialmente, mediada por la subunidad α_2 del receptor GABA_A, que está ampliamente expresada en el sistema límbico, mientras que la subunidad α_1 está implicada en la mediación de los efectos sedantes, amnésicos y anticonvulsivos de las benzodiazepinas (McKernan y col., 2000; Rudolph y col., 1999).

Por otro lado, un polimorfismo genético de un único nucleótido en la enzima GAD65, responsable de la síntesis de GABA, se asocia con una mayor susceptibilidad a los trastornos de ansiedad (Hettema y col., 2006).

Al igual que el GABA, algunos estudios de neuroimagen sugieren que las anomalías en la función glutamatérgica pueden ser la base de la fisiopatología de los trastornos de ansiedad (Grachev y Apkarian, 2000; Rosenber y col., 2004; Phan y col., 2005). Por ejemplo, se ha visto que los receptores postsinápticos de glutamato NMDA y AMPA están implicados en los trastornos ansiosos (Walker y col., 2002; Xiang y col., 2011). Además, compuestos que actúan sobre los receptores de glutamato han mostrado que alivian los síntomas de ansiedad (Grillon y col., 2003; Ho y col., 2005; Swanson y col., 2005; Harvey y Shashid, 2012). También

3. EL ESTRÉS

Los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos y sistemas adaptativos que les permiten mantener la homeostasis y adaptarse ante las condiciones fluctuantes del medio externo (Johnson y col., 1992). Así, el estrés se ha definido como cualquier estímulo físico o psicológico que perturba la homeostasis del individuo. Una definición más completa, introducida por Hans Selye en 1946, presenta al estrés como aquella respuesta inespecífica que ocurre frente a diversos agentes nocivos y que se expresará en diversas respuestas alteradas del organismo. La OMS define el estrés como el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para la acción. No obstante, hay que tener en cuenta que la magnitud de la respuesta al estrés, con sus consiguientes efectos fisiológicos, viene influida en gran medida por la percepción del individuo y su capacidad para controlar la situación conflictiva (Kim y Diamond, 2002).

La exposición a situaciones de estrés severas o por largos períodos de tiempo puede afectar negativamente al organismo, comprometiendo la salud del individuo. En 1946, Hans Selye presentó en un trabajo pionero en esta área, las primeras evidencias experimentales de las consecuencias fisiológicas del estrés. Una gran cantidad de investigaciones sucedieron a este trabajo, demostrando que la respuesta al estrés no controlado produce varios efectos perjudiciales en la fisiología de mamíferos (incluyendo al hombre), como hipertrofia adrenal, atrofia del timo y nódulos linfáticos, supresión del sistema inmune y ulceraciones (Sapolsky, 1999). Sin embargo, existen también numerosas evidencias que muestran que con un buen grado de control sobre los eventos adversos, las consecuencias sobre la salud y las emociones de estas experiencias son mucho menos severas.

No es hasta el siglo XX que por primera vez se habla del concepto de estrés y su posible relación con las enfermedades neuropsiquiátricas. Esta idea viene apoyada por numerosos estudios neurobiológicos desarrollados en los últimos años, que muestran que el estrés crónico o severo es capaz de producir un amplio rango de efectos adversos en el SNC. Por ejemplo, estudios experimentales muestran que el estrés induce una atrofia neuronal mantenida en distintas regiones cerebrales, e inhibe la neurogénesis en el hipocampo (Kempermann, 2002; Kempermann y col., 2003; Kronenberg y col., 2009).

Estos efectos negativos posiblemente sean el resultado de una activación exacerbada de los sistemas neuronales y hormonales específicos de la respuesta al estrés. Además, también se ha observado que la falta de control sobre eventos estresantes adversos, tanto en animales como en humanos, induce un amplio rango de alteraciones conductuales (Maier y Watkins, 2005).

3.1. Estrés: Factor desencadenante de la depresión y la ansiedad

Se han escrito numerosas revisiones acerca del papel del estrés en la patología de la depresión (Lloyd, 1980a,b; Kessler, 1997; Paykel, 2003; Hammen, 2005; Pittenger y Duman, 2008). Mediante entrevistas acerca de los eventos episódicos de la vida diaria, eventos con un contenido negativo o indeseable que tienen un inicio y un fin, se ha llegado a la conclusión de que las personas que padecen episodios de depresión mayor son las que han estado más expuestas a agentes estresantes (Mazure y col., 2000). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en las últimas tres décadas y todos ellos han mostrado una asociación consistente entre la exposición a eventos estresantes y la consiguiente aparición de episodios de depresión mayor. Esta asociación se explicita en los estudios llevados a cabo por Mazure y col., (2000), en los que se apunta que en pacientes deprimidos los agentes estresantes son dos veces y media más probables que en pacientes control y que el 80% de los casos de depresión están precedidos por un agente estresante severo. Se ha encontrado, además, una asociación directa entre la severidad y el número de eventos negativos y la probabilidad de inicio de la depresión (Kendler y col., 1998).

Las primeras investigaciones acerca de la relación de la depresión con el estrés se basaban casi exclusivamente en el análisis de eventos episódicos. En la actualidad, existe un mayor interés acerca del estudio del estrés crónico (estrés con una duración superior a 12 meses), dado que este parece un mejor vaticinador de los síntomas depresivos que el estrés agudo (McGonagle y Kessler, 1990). Hay abundantes estudios epidemiológicos que muestran la relación entre los efectos perjudiciales del estrés crónico en el trabajo, la pobreza (Siegrist, 2008; Kub y col., 2009), las dificultades del matrimonio (Heene y col., 2007) y la ausencia de apoyo social (Paykel y col., 1996) con la depresión. Así mismo, se

ha encontrado una relación funcional entre estrés crónico y episódico en la precipitación de los episodios depresivos (Riso y col., 2002). Los agentes estresantes crónicos, de hecho, se asocian frecuentemente con una exacerbación de los efectos de los eventos de la vida sobre los episodios de depresión mayor. Por otro lado, el estrés crónico durante el desarrollo también tiene importantes consecuencias en el adulto. De hecho, existe una mayor proporción de personas deprimidas entre aquellos adultos que han sufrido situaciones adversas durante su niñez, como la separación de sus padres, psicopatología parental o abusos (Weiss y col., 1999; Hovens y col., 2009., Lizardi y col., 2009).

Otra característica importante del estrés crónico es sus efectos perjudiciales "a largo plazo", es decir, la larga duración de sus consecuencias. Si bien la mayor parte de las depresiones tienen una duración de meses o pocos años, algunos pacientes sufren depresión a lo largo de toda su vida aún cuando los agentes estresantes han cesado por completo. Esto sugiere que hay efectos del estrés que son persistentes y que pueden condicionar la probabilidad de sufrir recurrencias sucesivas. Asimismo, los síntomas residuales por debajo del umbral, están presentes en un alto porcentaje de pacientes a pesar de la administración de un tratamiento crónico antidepresivo y de la finalización del estrés.

Al igual que en la depresión, el estrés ejerce un papel importante en los trastornos de ansiedad. En una revisión de Lupien y col. (2009) muestran como tanto animales como humanos sometidos a diferentes tipos de estreses, en diferentes etapas de la vida, desarrollan cuadros de ansiedad, que en muchos casos suelen ir acompañados de depresión o en el caso de animales, conducta anhedónica e indefensión (Elizalde y col., 2008).

3.2. Papel de la corteza prefrontal en el control del estrés

A nivel experimental se ha visto que los procesos psicológicos que amortiguan las consecuencias adversas del estrés tienen lugar en la corteza prefrontal medial (mPFC). Ésta, a través terminales glutamatérgicas, es capaz de inervar un gran número de áreas directamente implicadas en la sintomatología depresiva como son los núcleos del rafe, el

núcleo accumbens, la amígdala, regiones límbicas, otras regiones corticales o el hipotálamo (Groenewegen y Uylings, 2000; Amat y col., 2005). En base a diversos estudios se ha sugerido que la depresión, y también la ansiedad, podría relacionarse con la pérdida de capacidad de la corteza prefrontal para analizar la "controlabilidad" de situaciones nuevas adversas y consecuentemente con una "pérdida de control" sobre la activación de estas regiones. Por ejemplo, a modo de esquema, en la **Figura 4** se ilustra el papel modulador de la corteza prefrontal sobre la amígdala (Akirav y Maroun, 2007, Etkin y col., 2009).

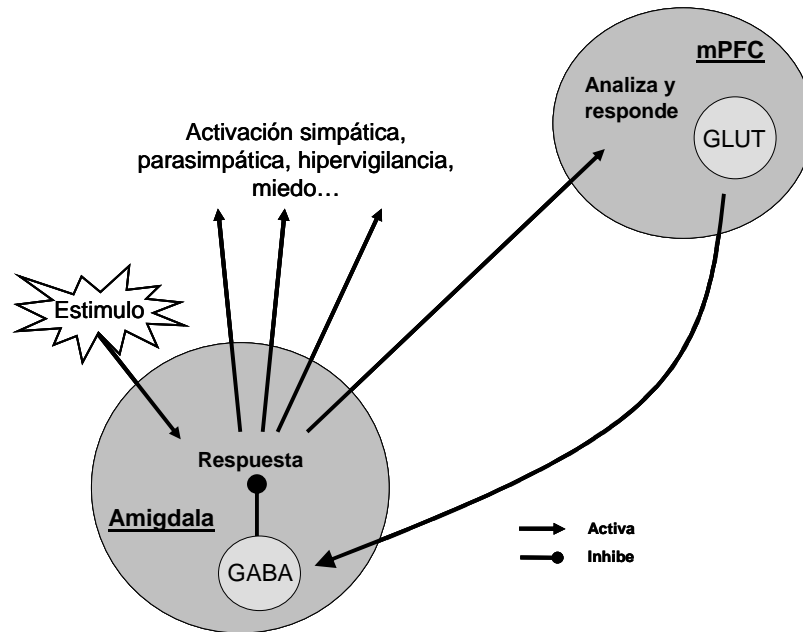


Figura 4: Papel modulador de la corteza prefrontal en la respuesta de la amígdala ante un estímulo estresante.

A nivel neurobiológico, se ha sugerido que la amígdala juega un papel importante en el control del miedo y la ansiedad (Etkin y col., 2009). Por ejemplo, se ha visto que el estrés crónico induce una hiperexcitabilidad en la amígdala, que se correlaciona con el grado de ansiedad (Rosenkranz y col., 2010). Además estudios animales muestran que dicha hiperexcitabilidad podría deberse a una pérdida de control por parte de mPFC y el hipocampo sobre la actividad neuronal en la amígdala (Milad y col., 2009).

3.3. Modelos animales de estrés crónico

Algunos autores ya han descrito diferencias en la respuesta del eje HPA frente a diferentes tipos de agentes estresante crónicos (Engelmann y col., 2004) o incluso diferencias entre los distintos tipos de estrés de la misma categoría, como son los diferentes tipos de estrés social (Miczek y col., 2008) a los que las personas se pueden ver sometidos. En el presente trabajo vamos a centrarnos en estudiar el estrés ambiental y el estrés social.

3.3.1. Estrés ambiental

Tradicionalmente la exploración del estrés ambiental se ha contemplado desde el modelo de la activación suponiendo que ciertas condiciones de estimulación ambiental (ruido, hacinamiento, contaminación, etc.) ejercen unas influencias de sobre-activación en el organismo que conducen a una serie de manifestaciones fisiológico-sociales muy características de las reacciones de estrés.

Apuntemos como ejemplo la vida en cualquier ciudad: trabajo por turnos, ruido, aglomeración, delincuencia, terrorismo, congestión del tráfico rodado, contaminación ambiental. Pero no solo estos eventos de la vida moderna típica de las ciudades son causa de respuesta de estrés. También en los medios rurales existen amenazas de tipo natural que pueden ser causantes de esta respuesta: todo tipo de catástrofes naturales, incendios forestales, inundaciones, intensas tormentas, tornados, huracanes, modificaciones del clima, altas temperaturas, etc.

El estrés ambiental rompe el equilibrio de un organismo, es decir, su estado homeostático, como consecuencia de la acción de un estímulo proveniente del exterior o del interior del organismo, que recibe el nombre de agente estresante. Como respuesta a este estímulo, se desencadenan una serie de reacciones de comportamiento y/o fisiológicas con el fin de adaptarse lo mejor posible a esta nueva situación. En esta respuesta el organismo activa su eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Desde el punto de vista fisiológico esta reacción es beneficiosa para el animal ya que le permite recuperar su estado homeostático anteriormente alterado. Pero si esta situación se convierte en

crónica, el animal ya no tiene tanta capacidad para reaccionar y genera problemas en los procesos de crecimiento reproductivos, osmorreguladores e inmunitarios que se reflejan a nivel de organismo entero.

El modelo de estrés crónico suave

El estrés crónico suave (CMS) se desarrolló como un modelo animal para mimetizar los factores ambientales adversos que contribuyen a la inducción de los trastornos depresivos en humanos, y es capaz de reproducir cambios en el comportamiento que perduran durante meses. Se considera uno de los mejores modelos en cuanto a su validez constructiva, aparente y predictiva (Willner y Mitchen, 2002; Willner, 2005).

Respecto a la **validez constructiva**, se pretendió proporcionar una simulación realista del estrés de la vida diaria (Willner y col., 1990, Willner y col., 1992) estableciendo un modelo experimental en el que los roedores se exponían durante varias semanas a distintos agentes estresantes suaves y no predecibles. Así, los animales se exponen secuencialmente a una variedad de agentes estresantes suaves (por ejemplo, iluminación durante toda la noche, luz estroboscópica, ruidos intermitentes, periodos de privación de comida, inclinación de la caja, emparejamiento con un compañero desconocido...), que van cambiando cada pocas horas por un periodo de semanas o meses (Willner y col., 1992; Monleon y col., 1995; Elizalde y col., 2008).

La **validez aparente** viene claramente demostrada en este modelo, que es capaz de reproducir un síntoma central de la depresión como es el comportamiento anhedónico (Willner y col., 1992). Además, el CMS induce un aumento en el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada (Strekalova y col., 2004), un aumento en la ansiedad (Griebel y col., 2002; Ducottet y col., 2003) y una variedad de alteraciones en el sueño características del trastorno depresivo (Moreau y col., 1995). Asimismo, este modelo es capaz de inducir un deterioro en la memoria de reconocimiento (Orsetti y col., 2006; Elizalde y col., 2008) y en la memoria espacial (Song y col., 2006).

Respecto a los cambios biológicos, los animales sometidos a CMS presentan signos que indican una hiperactividad del eje HPA (Bergström y col., 2008), incluyendo una

hipertrofia adrenal (Muscat y col., 1992) y una hipersecreción de corticosterona (Ayensu y col., 1995). El CMS también induce una disminución de la proliferación celular y de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Mineur y col., 2007; Kong y col., 2009). Algunos estudios también han mostrado cómo el CMS induce una disminución de la proliferación celular en el hipocampo (Ritchie y col., 2004) y un aumento de la apoptosis hipocampal y cortical (Bachis y col., 2008; Silva y col., 2008). A su vez, este modelo produce también una serie de cambios estructurales entre los que destacan una alteración en la densidad, composición y morfología de las dendritas apicales a nivel cortical (Michelsen y col., 2007). Aparte de estas alteraciones, este paradigma experimental provoca diversas modificaciones en niveles de neurotransmisores y marcadores de plasticidad neuronal, como ciertas proteínas sinápticas vesiculares (Silva y col., 2008; Bessa y col., 2009) y el factor neurotrófico BDNF (Duman y Monteggia, 2006; Li y col., 2008).

Además, todos estos cambios de conducta provocados por este modelo pueden persistir durante semanas (Song y col., 2006) o incluso meses (Willner y col., 1992; Elizalde y col., 2008), posibilitando estudiar el efecto a largo plazo generado por un estrés crónico. A su vez, estas alteraciones mantenidas en el tiempo permiten analizar los posibles mecanismos implicados no solo en la patología de la enfermedad crónica, sino también los implicados en la vulnerabilidad a una posible recaída de episodios depresivos a lo largo de la vida.

En cuanto a la **validez predictiva**, la mayoría de los fármacos que se utilizan en la actualidad son capaces de revertir las diferentes alteraciones conductuales y neurobioquímicas que genera este modelo. Entre ellos figuran antidepresivos tricíclicos como la imipramina, desipramina, amitriptilina y clomipramina (Bessa y col., 2009; Stein y col., 2009), los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina como fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, citalopram y escitalopram (Grippe y col., 2006; Elizalde y col., 2008; Jayatissa y col., 2008; Bessa y col., 2009) así como otros fármacos antidepresivos típicos y atípicos, como la agomelatina (Papp y col., 2003).

Por último, estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que un modelo de vulnerabilidad genética a la depresión, como el ratón heterocigótico para el

transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1+/-) (García-García y col., 20089), interactuaba negativamente con los factores ambientales adversos generados por el CMS. Así, se vió que los ratones VGLUT1+/- presentaban una mayor vulnerabilidad al fenotipo depresivo tras ser sometidos al modelo CMS.

3.4.2.- Estrés social

La investigación sobre los efectos del estrés social se ha abordado de manera muy diversa tanto en estudios dirigidos a evaluar el impacto que éste tiene sobre la conducta animal como sobre la salud psíquica en la personas. En las situaciones de la vida real, tanto los animales como el hombre tienen que hacer frente a tensiones generadas dentro de su propia especie durante sus interacciones con sus congéneres, especialmente debido a recurrentes luchas por el control de los recursos limitados, el apareamiento y las posiciones sociales (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001; Allen y Badcock, 2003). Concretamente, en los animales, se ha estudiado ampliamente el establecimiento de las relaciones jerárquicas dentro de una misma especie tanto en una forma controlada en el laboratorio, como en ambientes naturales. Ambas aproximaciones sugieren que los animales que han sido "subordinados" por parte de los individuos dominantes de su misma especie sufren una forma de estrés crónico social (Lagerspetz y col., 1961; Koolhaas y col., 1997). De hecho, se ha observado que este tipo de estrés es capaz de provocar cambios significativos en el comportamiento, el funcionamiento del cerebro, la fisiología, los niveles de neurotransmisores y hormonas, y la salud (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001; Allen y Badcock, 2003).

Por ello, se ha propuesto que los modelos animales de conflicto social pueden ser mas útiles que los basados en estrés ambiental para el estudio de una serie de trastornos psiquiátricos, como depresión mayor, ansiedad generalizada, trastorno de estrés postraumático, abuso de drogas, trastornos de la alimentación e incluso la esquizofrenia (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001; Selten y Cantor-Graae, 2005).

El modelo de estrés crónico de derrota social

Dado que la mayoría de los estímulos estresantes que conducen a psicopatologías en humanos son de carácter social (Brown y Prudo, 1981), se desarrolló el modelo del estrés crónico social de derrota (CSDS), para poder mimetizar esos factores sociales adversos que contribuyen a la inducción de los desórdenes depresivos y trastornos de ansiedad en humanos, y poder así reproducir cambios en el comportamiento que perduren durante meses.

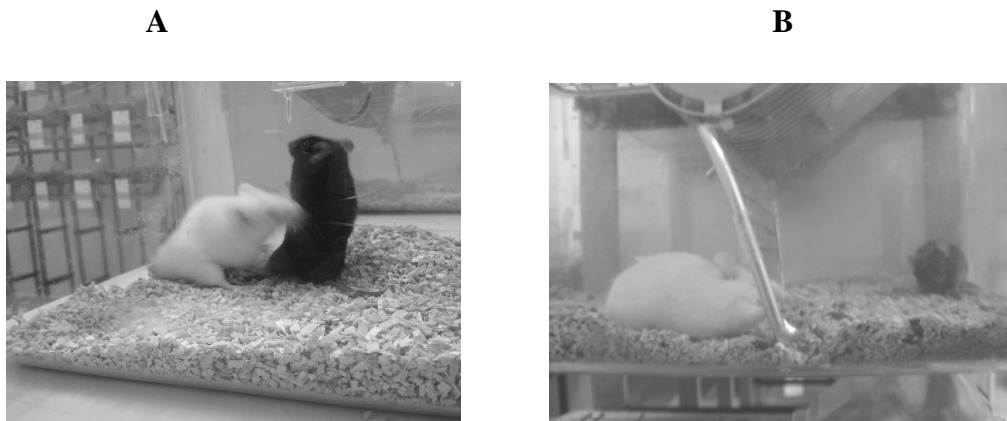


Figura 5: imágenes del CSDS. A) Subordinación social. B) Convivencia en la misma jaula separados por una malla metálica.

Como hemos mencionado, la **validez constructiva** del modelo radica en que muchos de los estímulos estresantes que sufre el ser humano son de carácter social (Brown y Prudo, 1981). Basándose en estos hechos, se estableció un modelo de experimentación animal basado en la inducción de "subordinación social" causada por cortos períodos de lucha y convivencia continuada con un animal dominante. (Kudriavtseva y col., 1991). En condiciones de laboratorio, un roedor intruso es introducido en la jaula de otro roedor residente y se les deja luchar por un tiempo determinado hasta que uno de ellos, generalmente, el intruso presente una conducta de subordinación. Se considera así que el animal derrotado sufre una forma de estrés social. Si además se repiten las luchas con distintos roedores dominantes varios días

consecutivos, es considerado como un modelo de estrés crónico social de derrota. También, combinado con las luchas, un estrés crónico social en forma de amenaza, consiste en alojar durante todo el día al roedor subordinado en un compartimento adyacente al del dominante, expuesto a sus señales olfativas y visuales, después de haber sido atacado por él.

La **validez aparente** de este modelo se basa en que la subordinación social a la cual se somete a los roedores induce evitación social, conducta que podría asimilarse al aislamiento social en humanos, muy frecuente en la depresión clínica, en la fobia social y en el TEPT (Berton y col., 2006). Además, se ha descrito que el estrés crónico de derrota social induce otras alteraciones conductuales a corto y largo plazo, tales como desesperación conductual, anhedonia, ansiedad, disminución del acicalamiento o aumento de la vulnerabilidad para adicción a drogas de abuso (Von Frijtag y col., 2000; Krishnana y col., 2007; Covington y col., 2009).

Además de las alteraciones conductuales descritas, este modelo induce una serie de cambios a nivel neurobiológico. Cabe destacar estudios realizados en los últimos años, en los cuales se ha descrito que la evitación social inducida por el estrés crónico de derrota social depende de un mal funcionamiento del circuito dopaminérgico mesolímbico, que está compuesto por neuronas de dopamina en el área tegmental ventral (ATV) y sus regiones de proyección al cerebro anterior, en particular, el núcleo accumbens (NAc). Concretamente se ha observado que los ratones vulnerables al estrés presentan una hiperactividad dopaminérgica desde la ATV y un aumento en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el núcleo accumbens. Dado que el circuito ATV-NAc desempeña un papel fundamental de integración en los comportamientos relacionados con la recompensa y la emoción (Charney 2004; Nestler y Carlezon, 2006) se ha sugerido que estas alteraciones también podrían estar implicadas en la mayor vulnerabilidad que presentan estos ratones a la adicción a drogas de abuso. Por otro lado, se ha descrito que un segundo circuito neural que comprende rafe-corteza prefrontal-hipocampo estaría más activado por un estrés continuo de subordinación, y sería la causa de la conducta anhedónica (Miczek y col., 2008).

Sin embargo, la validez aparente de este modelo no está en absoluto consolidada ni a nivel conductual ni a nivel neurobioquímico. Por un lado, los estudios realizados se basan principalmente en la evitación social. Éste es un fenómeno psiquiátrico común a otros trastornos diferentes en los seres humanos, como la ansiedad generalizada, fobia social y trastorno de estrés postraumático (Berton et al, 2006). Alteraciones más características de trastornos depresivos como la anhedonia o la indefensión no han sido suficientemente estudiados en este modelo. Además, hay una falta de consenso tanto a la hora de establecer protocolos como en los propios resultados obtenidos hasta la fecha. Por ejemplo, a nivel conductual se observa que en la mayoría de los estudios se ha utilizado para el test de interacción social un ratón dominante o agresivo lo cual no permite discriminar si la aversión social es causada por una conducta de miedo o por un estado más bien "depresivo". Por último son pocos estudios lo que caracterizan completamente el modelo a largo plazo.

Respecto a la **validez predictiva**, la mayoría de los fármacos utilizados han intentado revertir la evitación social que presentan los ratones estresados socialmente. De hecho, algunos tratamientos antidepresivos, como la imipramina y la fluoxetina, han sido capaz de revertirlos (Tsankova y col., 2006; Berton y col., 2006; Wilkinson y col., 2009; Haenisch y col., 2009; Yan y col., 2009). De todas formas, han sido pocos los fármacos probados en este modelo y solo se ha demostrado la reversión de la conducta antisocial con el antidepresivo tricíclico imipramina o el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) floxetina. Tampoco se ha estudiado la efectividad de los tratamientos antidepresivos para revertir los síntomas depresivos como la anhedonia y la indefensión.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast.* 30873:11
- Allen NB, Badcock PB (2003) The social risk hypothesis of depressed mood: evolutionary, psychosocial, and neurobiological perspectives. *Psychol Bull* 129: 887-913
- Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrié P (2004) Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry.* 9:278-86
- Altar CA, Vawter MP, Ginsberg SD (2009) Target identification for CNS diseases by transcriptional profiling. *Neuropsychopharmacology.* 34:18-54
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci.* 8:365-71
- Asberg M, Träskman L, Thorén P (1976) 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry* 33: 1193-7.
- Atack JR (2005) The benzodiazepine binding site of GABA(A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics. *Expert Opin Investig Drugs.* 14:601-18
- Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS (1995) Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiol Behav.* 57:165-9
- Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Sibille E, Tamir H, Mann JJ, Arango V (2006) Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology.* 31:814-24.
- Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Tin A, Ellis SP, Mann JJ, Arango V (2008) Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Mol Psychiatry* 13:507-13, 465
- Bachis A, Cruz MI, Nosheny RL, Mocchetti I (2008) Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 442:104-8
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-

- HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*. 29:450-60.
- Banasr M, Duman RS (2008) Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry* 64:863-870
- Basso AM, Gallagher KB, Bratcher NA, Brioni JD, Moreland RB, Hsieh GC, Drescher K, Fox GB, Decker MW, Rueter LE (2005) Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology*. 30:1257-68
- Beneyto M, Kristiansen LV, Oni-Orisan A, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH (2007) Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32:1888-1902
- Bergström A, Jayatissa MN, Mørk A, Wiborg O (2008) Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study. *Brain Res*. 1196:41-52
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864-8
- Berton O, Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*. 7:137-51
- Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pego JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Front Behav Neurosci* 3:1.
- Bhatia HS, Agrawal R, Sharma S, Huo YX, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2011) Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. *LoS One*. 6:e28451
- Bhagwagar Z, Wylezinska M, Jezzard P, Evans J, Ashworth F, Sule A, Matthews PM, Cowen PJ (2007) Reduction in occipital cortex gamma-aminobutyric acid concentrations in medication-free recovered unipolar depressed and bipolar subjects. *Biol Psychiatry* 61: 806-12
- Bjorkqvist K (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav* 73: 435-42

- Blanchard EB, Kolb LC, Prins A, Gates S, McCoy GC (1991) Changes in plasma norepinephrine to combat-related stimuli among Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis.* 179:371-3
- Blier P (2003) The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 57-66
- Bonkale WL, Turecki G, Austin MC (2006) Increased tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of alcohol-dependent, depressed suicide subjects is restricted to the dorsal subnucleus. *Synapse* 60: 81-5
- Borsini F, Lecci A, Mancinelli A, D'Aranno V, Meli A (1988) Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. *Eur J Pharmacol* 148:301-7.
- Bowden C, Cheetham SC, Lowther S, Katona CL, Crompton MR, Horton RW (1997a) Reduced dopamine turnover in the basal ganglia of depressed suicides. *Brain Res.* 769:135-40.
- Bowden C, Cheetham SC, Lowther S, Katona CL, Crompton MR, Horton RW (1997b) Dopamine uptake sites, labelled with [3H]GBR12935, in brain samples from depressed suicides and controls. *Eur Neuropsychopharmacol.* 7:247-52
- Bowley MP, Drevets WC, Ongür D, Price JL (2002) Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 52:404-12
- Brown GW, Prudo R (1981) Psychiatric disorder in a rural and an urban population: 1. Aetiology of depression. *Psychol Med.* 11:581-99
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science.* 301:386-389.
- Castrén E, Võikar V, Rantamäki T (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol.* 7:18-21
- Chana G, Landau S, Beasley C, Everall IP, Cotter D (2003) Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol Psychiatry.* 53:1086-98.

- Charney DS, Heninger GR, Breier A (1984) Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 41:751-63
- Charney DS, Woods SW, Goodman WK, Heninger GR (1987) Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 92:14-24.
- Charney DS (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry*. Suppl 14:11-4.
- Charney DS (2004) Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am J Psychiatry*. 161:195-216
- Cheeta S, Broekkamp C, Willner P (1994) Stereospecific reversal of stress-induced anhedonia by mianserin and its (+)-enantiomer. *Psychopharmacology* 116: 523-8
- Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 314:140-3
- Choi DW, Farb DH, Fischbach GD (1981) GABA-mediated synaptic potentials in chick spinal cord and sensory neurons. *J Neurophysiol*. 45:632-43
- Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, Vawter MP, Myers RM, Bunney WE Jr, Akil H, Watson SJ, Jones EG (2005) Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15653-15658
- Coppen A, Eccleston EG, Peet M (1973) Total and free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients. *Lancet* 2: 60-3.
- Coryell W, Akiskal HS, Leon AC, Winokur G, Maser JD, Mueller TI, Keller MB (1994) The time course of nonchronic major depressive disorder. Uniformity across episodes and samples. National Institute of Mental Health Collaborative Program on the Psychobiology of Depression--Clinical Studies. *Arch Gen Psychiatry*. 51: 405-10.
- Costello EJ, Pine DS, Hammen C, March JS, Plotsky PM, Weissman MM, Biederman J, Goldsmith HH, Kaufman J, Lewinsohn PM, Hellander M, Hoagwood K, Koretz DS, Nelson CA, Leckman JF (2002) Development and natural history of mood disorders. *Biol Psychiatry*. 52: 529-42.

- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I (2001) Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 58:545-53
- Coupland NJ. Brain mechanisms and neurotransmitters. En Nutt D, Davidson JRT, Zohar J (eds). *Post-traumatic Stress Disorder: Diagnosis, Management and Treatment*. Martin Dunitz Ltd, London.2000. p 71
- Covington HE, 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ, 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 29: 11451-60
- Cowen PJ, Parry-Billings M, Newsholme EA (1989) Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *J Affect Disord* 16: 27-31.
- Cremers TI, Giorgetti M, Bosker FJ, Hogg S, Bogeso KP, Westerink BH, den Boer H, Wikstrom HV, Tecott LH. (2004) Inactivation of 5-HT(2C) receptors potentiates consequences of serotonin reuptake blockade. *Neuropsychopharmacology*. 29:1782-9.
- Cryan JF, Lucki I (2000) Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1120-1126.
- Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F (2006) Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 398:215-9
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2008) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*. 62:479-93
- Davidson J, Lipper S, Kilts CD, Mahorney S, Hammett E (1985) Platelet MAO activity in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 142:1341-3
- De Bellis MD, Baum AS, Birmaher B, Keshavan MS, Eccard CH, Boring AM, Jenkins FJ, Ryan ND (1999) A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems. *Biol Psychiatry*. 45:1259-70
- Deutch AY, Young CD (1995) A model of the stress-induced activation of prefrontal cortical dopamine systems. En: Friedman MJ, Charney DS, y Deutch AY editores.

- Neurobiological and clinical consequences of stress: From normal adaptation to PTSD. 1ª edición. New York: Raven Press.
- D'haenen HA, Bossuyt A (1994) Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*. 35:128-3
- Dowlatsahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (1998) Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet*. 352:1754-5
- Drago A, Crisafulli C, Sidoti A, Serretti A (2011) The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems informs a detailed genetic perspective on depressive phenotypes *Prog Neurobio* 194: 418-60
- Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*. 59:1136-43
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C (1999) PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* 46: 1375-87
- Du J, Gray NA, Falke CA, Chen W, Yuan P, Szabo ST, Einat H, Manji HK. (2004) Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci*. 2004 Jul 21;24(29):6578-89
- Ducottet C, Griebel G, Belzung C (2003) Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27:625-31
- Duman RS (2002) Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry*. 17 Suppl 3:306-10
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59: 1116-27
- Duncan LE, Hutchison KE, Carey G, Craighead WE (2009) Variation in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene is associated with symptoms of depression. *J Affect Disord*. 115:215-9
- Dunlop BW, Nemeroff CB (2007) The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 64: 327-37
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciocchi S, Herry C, Luthi A (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62: 757-771

- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 1-14
- Ellenbogen MA, Young SN, Dean P, Palmour RM, Benkelfat C (1999) Acute tryptophan depletion in healthy young women with a family history of major affective disorder 29: 35-46
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25:132-49
- Engström G, Alling C, Blennow K, Regnéll G, Träskman-Benz L (1999) Reduced cerebrospinal HVA concentrations and HVA/5-HIAA ratios in suicide attempters. Monoamine metabolites in 120 suicide attempters and 47 controls. *Eur neuropsychopharmacol.* 9:399-405
- Escribá PV, Ozaita A, García-Sevilla JA (2004) Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology.* 29:1512-21
- Etkin A, Prater KE, Schatzberg AF, Menon V, Greicius MD (2009) Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry* 66: 1361-72
- Fakra E, Hyde LW, Gorka A, Fisher PM, Munoz KE, Kimak M, Halder I, Ferrell RE, Manuck SB, Hariri AR (2009) Effects of HTR1A C(-1019)G on amygdala reactivity and trait anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 66:33-40.
- Fattaccini CM, Bolanos-Jimenez F, Gozlan H, Hamon M (1990) Tianeptine stimulates uptake of 5-hydroxytryptamine in vivo in the rat brain. *Neuropharmacology* 29: 1-8
- Fiorelli R, Rudolph U, Straub CJ, Feldon J, Yee BK (2008) Affective and cognitive effects of global deletion of alpha3-containing gamma-aminobutyric acid-A receptors. *Behav Pharmacol.* 19(5-6):582-96
- Freneau RT Jr, Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2004) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science.* 304:1815-9

- Frielingsdorf H, Bath KG, Soliman F, Difede J, Casey BJ, Lee FS (2010) Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met endophenotypes: implications for posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 1208:150-7
- Furmark T (2009) Neurobiological aspects of social anxiety disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 46:5-12
- Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Matrov D, Harro J, Wojcik SM, Venzala E, Ramirez MJ, Del Rio J, Tordera RM (2009) Increased vulnerability to depressive-like behavior of mice with decreased expression of VGLUT1. *Biol Psychiatry* 66: 275-82
- Geinisman Y (2000) Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex.* 10:952-62
- Geraciotti TD Jr, Baker DG, Ekhaton NN, West SA, Hill KK, Bruce AB, Schmidt D, Rounds-Kugler B, Yehuda R, Keck PE Jr, Kasckow JW (2001) CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry.* 158:1227-30.
- Gili M, Roca1 MI, Basu S, McKee M, Stuckler D (2012) The mental health risks of economic crisis in Spain: evidence from primary care centres, 2006 and 2010. *European Journal of Public Health* 1–5
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 17:2492-8
- Gorman JM, Docherty JP (2010) A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 22:256-64
- Grachev ID, Apkarian AV (2000) Chemical mapping of anxiety in the brain of healthy humans: an in vivo 1H-MRS study on the effects of sex, age, and brain region. *Hum Brain Mapp.* 11:261-72
- Graeff FG (1993) Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev Neurosci.* 4:181-211.
- Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P (2002) Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6370-5

- Grillon C, Morgan CA 3rd (1999) Fear-potentiated startle conditioning to explicit and contextual cues in Gulf War veterans with posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol.* 108:134-42
- Grillon C, Cordova J, Levine LR, Morgan CA 3rd (2003) Anxiolytic effects of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist (LY354740) in the fear-potentiated startle paradigm in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 168:446-54
- Grippe AJ, Beltz TG, Weiss RM, Johnson AK (2006) The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. *Biol Psychiatry.* 59:309-16
- Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res.* 126:3-28
- Groves JO (2007) Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry.* 12:1079-88
- Guelfi JD (1992) Efficacy of tianeptine in comparative trials versus reference antidepressants. An overview. *Br J Psychiatry. Suppl.* 72-5
- Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron MG, Bonisch H (2009) Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 111: 403-16
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol.* 1:293-319
- Harvey BH, Shahid M (2012) Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. *Pharmacol Biochem Behav.* 100:775-800
- Hashimoto K, Sawa A, Iyo M (2007) Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 62: 1310-6
- Hawk LW, Dougall AL, Ursano RJ, Baum A (2000) Urinary catecholamines and cortisol in recent-onset posttraumatic stress disorder after motor vehicle accidents. *Psychosom Med.* 62:423-34
- Heene E, Buysse A, Van Oost P (2007) An interpersonal perspective on depression: the role of marital adjustment, conflict communication, attributions, and attachment within a clinical sample. *Fam Process* 46: 499-514

- Heninger GR, Charney DS, Sternberg DE (1984) Serotonergic function in depression. Prolactin response to intravenous tryptophan in depressed patients and healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry* 41: 398-402
- Heninger GR, Delgado PL, Charney DS (1996) The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*. 29:2-11
- Henkel V, Baghai TC, Eser D, Zill P, Mergl R, Zwanzger P, Schüle C, Bottlender R, Jäger M, Rupprecht R, Hegerl U, Möller HJ, Bondy B (2004) The gamma amino butyric acid (GABA) receptor alpha-3 subunit gene polymorphism in unipolar depressive disorder: a genetic association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 126B:82-7
- Hettema JM, An SS, Neale MC, Bukszar J, van den Oord EJ, Kendler KS, Chen X (2006) Association between glutamic acid decarboxylase genes and anxiety disorders, major depression, and neuroticism. *Mol Psychiatry*. 11:752-62
- Hickie IB, Rogers NL (2011) Novel melatonin-based therapies: potential advances in the treatment of major depression. *Lancet*. 378: 621-31.
- Ho YJ, Hsu LS, Wang CF, Hsu WY, Lai TJ, Hsu CC, Tsai YF (2005) Behavioral effects of d-cycloserine in rats: the role of anxiety level. *Brain Res*. 1043:179-85
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC (2008) Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology*. 33:406-17
- Hovens JG, Wiersma JE, Giltay EJ, van Oppen P, Spinhoven P, Penninx BW, Zitman FG (2009) Childhood life events and childhood trauma in adult patients with depressive, anxiety and comorbid disorders vs. controls. *Acta Psychiatr Scand*. 122:66-74
- Huang GJ, Bannerman D, Flint J (2008) Chronic fluoxetine treatment alters behavior, but not adult hippocampal neurogenesis, in BALB/cJ mice. *Mol Psychiatry*. 13:119-21
- Hull AM (2002) Neuroimaging findings in post-traumatic stress disorder. Systematic review. *Br J Psychiatry*. 181:102-10
- Im HI, Kenny PJ (2012) MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*. 35:325-34

- Inoue T, Tsuchiya K, 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.* 49:911-20
- Jans LA, Riedel WJ, Markus CR, Blokland A (2007) Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol Psychiatry.* 12: 522-43
- Javitt DC (2004) Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 9: 984-97, 979
- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingstrom A, Papp M, Wiborg O (2006) Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 31: 2395-404
- Jayatissa MN, Henningsen K, West MJ, Wiborg O (2009) Decreased cell proliferation in the dentate gyrus does not associate with development of anhedonic-like symptoms in rats. *Brain Res.* 1290:133-41
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW (1992) Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 115-30
- Karolewicz B, Szebeni K, Gilmore T, Maciag D, Stockmeier CA, Ordway GA (2009) Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 12:143-53
- Kasper S, McEwen BS (2008) Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine. *CNS Drugs* 22: 15-26
- Keller MB (1985) Chronic and recurrent affective disorders: incidence, course, and influencing factors. *Adv Biochem Psychopharmacol* 40: 111-20
- Kelly JP, Leonard BE (1994) The effect of tianeptine and sertraline in three animal models of depression. *Neuropharmacology* 33: 1011-6
- Kempermann G (2002) Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4: 17-33
- Kempermann G, Kronenberg G (2003) Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54: 499-503

- Kendell SF, Krystal JH, Sanacora G (2005) GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 9:153-68
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1998) Stressful life events and major depression: risk period, long-term contextual threat, and diagnostic specificity. *J Nerv Ment Dis* 186: 661-9
- Kennedy SH, Rizvi S, Fulton K, Rasmussen J (2008) A double-blind comparison of sexual functioning, antidepressant efficacy, and tolerability between agomelatine and venlafaxine XR. *J Clin Psychopharmacol* 28: 329-33
- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48: 191-214
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3: 453-62
- Klaassen T, Riedel WJ, van Someren A, Deutz NE, Honig A, van Praag HM (1999) Mood effects of 24-hour tryptophan depletion in healthy first-degree relatives of patients with affective disorders. *Biol Psychiatry* 46: 489-97
- Klimek V, Stockmeier C, Overholser J, Meltzer HY, Kalka S, Dilley G, Ordway GA (1997) Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci*. 17:8451-8
- Koch JM, Kell S, Hinze-Selch D, Aldenhoff JB (2002) Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression. *J Psychiatr Res*. 36:369-75
- Kong H, Sha LL, Fan Y, Xiao M, Ding JH, Wu J, Hu G (2009) Requirement of AQP4 for antidepressive efficiency of fluoxetine: implication in adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 34:1263-76
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640: 69-72
- Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB (2008) Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther*. 117:30-51
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC,

- Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131: 391-404
- Kronenberg G, Kirste I, Inta D, Chourbaji S, Heuser I, Endres M, Gass P (2009) Reduced hippocampal neurogenesis in the GR(+/-) genetic mouse model of depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259: 499-504
- Kub J, Jennings JM, Donithan M, Walker JM, Land CL, Butz A (2009) Life events, chronic stressors, and depressive symptoms in low-income urban mothers with asthmatic children. *Public Health Nurs* 26: 297-306
- Kudriavtseva NN, Bakshtanovskaia IV (1991) [The neurochemical control of aggression and submission]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 41(3):459-66
- Kugaya A, Sanacora G (2005) Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr* 10: 808-19.
- Labrid C, Mocaër E, Kamoun A (1992) Neurochemical and pharmacological properties of tianeptine, a novel antidepressant. *Br J Psychiatry. Suppl*: 56-60.
- Lagerspetz K, Tirri R (1961) The induction of physiological tolerance to promazine in mice. *Ann Med Exp Biol Fenn (Suppl 5)*: 1-24
- LeDoux J (1996) Emotional networks and motor control: a fearful view. *Prog Brain Res*. 107:437-46
- Le François B, Czesak M, Steubl D, Alber PR. (2008) Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology*. 55(6):977-85. Epub 2008 Jun 29.
- Lemieux AM, Coe CL (1995) Abuse-related posttraumatic stress disorder: evidence for chronic neuroendocrine activation in women. *Psychosom Med*. 57:105-15
- Leuner B, Falduto J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci*. 23:659-65
- Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y (2008) Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci*. 82:934-42
- Lin Z, Madras BK (2006) Human genetics and pharmacology of neurotransmitter transporters. *Handb Exp Pharmacol*. 175:327-71.
- Lizardi D, Thompson RG, Keyes K, Hasin D (2009) Parental divorce, parental depression, and gender differences in adult offspring suicide attempt. *J Nerv Ment Dis* 197: 899-904

- Lloyd C (1980a) Life events and depressive disorder reviewed. I. Events as predisposing factors. *Arch Gen Psychiatry* 37: 529-35
- Lloyd C (1980b) Life events and depressive disorder reviewed. II. Events as precipitating factors. *Arch Gen Psychiatry* 37: 541-8
- López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (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*. 43:547-73.
- Lupien SJ (2009) Brains under stress. *Can J Psychiatry* 54: 4-5
- Maes M, Meltzer HY, D'Hondt P, Cosyns P, Blockx P (1995) Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psychoneuroendocrinology* 20: 149-67.
- Maier SF, Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 829-41
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 20:9104-10
- Manier DH, Shelton RC, Sulser F (2002) Noradrenergic antidepressants: does chronic treatment increase or decrease nuclear CREB-P? *J Neural Transm*. 109:91-9
- Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, Payne JL, Denicoff K, N AG, Zarate CA, Jr., Charney DS (2003) Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry* 53:707-742
- Martinez-Turrillas R, Del Rio J, Frechilla D (2007) Neuronal proteins involved in synaptic targeting of AMPA receptors in rat hippocampus by antidepressant drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 750-755
- Martinowich K, Lu B (2008) Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 33:73-83
- Massat I, Souery D, Del-Favero J, Oruc L, Jakovljevic M, Folnegovic V, Adolfsson R, Kaneva R, Papadimitriou G, Dikeos D, Jazin E, Milanova V, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J (2001) Lack of association between GABRA3 and unipolar affective disorder: a multicentre study. *Int J Neuropsychopharmacol*. 4:273-8

- Mazure CM, Bruce ML, Maciejewski PK, Jacobs SC (2000) Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response. *Am J Psychiatry* 157: 896-903
- McGonagle KA, Kessler RC (1990) Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. *Am J Community Psychol* 18: 681-706
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci.* 3:587-92
- Melartin TK, Rytsälä HJ, Leskelä US, Lestelä-Mielonen PS, Sokero TP, Isometsä ET (2002) Current comorbidity of psychiatric disorders among DSM-IV major depressive disorder patients in psychiatric care in the Vantaa Depression Study. *J Clin Psychiatry.* 63:126-34
- Mesulam MM (1999) Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron.* 24:521-9
- Michelsen KA, van den Hove DL, Schmitz C, Segers O, Prickaerts J, Steinbusch HW (2007) Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC Neurosci.* 8:107
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE 3rd (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.* 120:102-28
- Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, Zeidan MA, Handwerker K, Orr SP, Rauch SL (2009) Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 66: 1075-82
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol.* 70:83-244
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2007) Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience.* 150:251-9

- Mocaër E, Rettori MC, Kamoun A (1988) Pharmacological antidepressive effects and tianeptine-induced 5-HT uptake increase. *Clin Neuropharmacol* 11 Suppl 2: S32-42.
- Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P (1995) Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)*. 117:453-7
- Montag C, Buckholtz JW, Hartmann P, Merz M, Burk C, Hennig J, Reuter M (2008) COMT genetic variation affects fear processing: psychophysiological evidence. *Behav Neurosci*. 122:901-9
- Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobald D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, Nestler EJ (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry*. 61:187-97
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR (1995) Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol*. 6:682-687
- Moreno FA, Gelenberg AJ, Heninger GR, Potter RL, McKnight KM, Allen J, Phillips AP, Delgado PL (1999) Tryptophan depletion and depressive vulnerability. *Biol Psychiatry* 46: 498-505
- Moret C, Briley M (2011) The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 7 Suppl 1:9-13
- Moutsimilli L, Farley S, Dumas S, El Mestikawy S, Giros B, Tzavara ET (2005) Selective cortical VGLUT1 increase as a marker for antidepressant activity. *Neuropharmacology*. 49:890-900
- Mucha M, Skrzypiec AE, Schiavon E, Attwood BK, Kucerova E, Pawlak R (2011) Lipocalin-2 controls neuronal excitability and anxiety by regulating dendritic spine formation and maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:18436-41
- Muscat R, Papp M, Willner P (1992) Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology (Berl)*. 109:433-8
- Nemeroff CB (2003) The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 37: 133-46

- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 59:1151-9
- Neumeister A, Young T, Stastny J (2004) Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter. *Psychopharmacology* 174: 512-24
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*. 64:313-53
- Nudmamud-Thanoi S, Reynolds GP (2004) The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. *Neurosci Lett* 372:173-177
- Ordway GA, Schenk J, Stockmeier CA, May W, Klimek V (2003) Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry*. 53:315-23
- Orsetti M, Colella L, Dellarole A, Canonico PL, Ghi P (2007) Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 10:345-57
- Palomino A, Vallejo-Illarramendi A, González-Pinto A, Aldama A, González-Gómez C, Mosquera F, González-García G, Matute C (2006) Decreased levels of plasma BDNF in first-episode schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophr Res*. 86:321-2
- Pandey SC, Zhang H, Roy A, Misra K (2006) Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *J Neurosci*. 26:8320-31
- Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J Neurosci*. 28:2589-600.
- Pape HC, Paré D (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* 90: 419–463

- Papp M, Klimek V, Willner P (1994) Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)*.115:441-6.
- Papp M, Gruca P, Boyer PA, Mocaër E (2003) Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 28:694-703
- Paykel ES, Cooper Z, Ramana R, Hayhurst H (1996) Life events, social support and marital relationships in the outcome of severe depression. *Psychol Med* 26: 121-33
- Paykel ES (2003) Life events and affective disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl*: 61-6
- Pechnick RN, Chesnokova V (2009) Adult neurogenesis, cell cycle and drug discovery in psychiatry. *Neuropsychopharmacology*. 34:244
- Perry BD, Giller EL Jr, Southwick SM (1987) Altered platelet alpha 2-adrenergic binding sites in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 144:1511-2
- Phan KL, Fitzgerald DA, Cortese BM, Seraji-Bozorgzad N, Tancer ME, Moore GJ (2005) Anterior cingulate neurochemistry in social anxiety disorder: 1H-MRS at 4 Tesla. *Neuroreport*. 16:183-6
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 88-109
- Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2001) Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci*. 21:7397-403
- Pohjavaara P, Talaranta T, Väisänen E (2003) The role of the sympathetic nervous system in anxiety: Is it possible to relieve anxiety with endoscopic sympathetic block? *Nord J Psychiatry*. 57:55-60
- Post RM (2007) Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res*. 41:979-90
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14476-81

- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP (2006) Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*. 11:514-22
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2010) 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron*. 65:40-52
- Rihmer Z, Purebl G (2009) Mirtazapine--pharmacologic action and clinical advantages. *Neuropsychopharmacol Hung*. 11:35-40
- Riso LP, Miyatake RK, Thase ME (2002) The search for determinants of chronic depression: a review of six factors. *J Affect Disord* 70: 103-15
- Ritchie LJ, De Butte M, Pappas BA (2004) Chronic mild stress exacerbates the effects of permanent bilateral common carotid artery occlusion on CA1 neurons. *Brain Res*. 1014:228-35
- Rohde P (2001) The relevance of hierarchies, territories, defeat for depression in humans: hypotheses and clinical predictions. *J Affect Disord* 65: 221-30
- Rosenberg DR, Mirza Y, Russell A, Tang J, Smith JM, Banerjee SP, Bhandari R, Rose M, Ivey J, Boyd C, Moore GJ (2004) Reduced anterior cingulate glutamatergic concentrations in childhood OCD and major depression versus healthy controls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 43:1146-53
- Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M (2010) Chronic Stress Causes Amygdala Hyperexcitability in Rodents. *Biol Psychiatry*
- Rosoklija G, Toomayan G, Ellis SP, Keilp J, Mann JJ, Latov N, Hays AP, Dwork AJ (2000) Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry*. 57:349-56.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*. 401:796-800
- Russo-Neustadt A (2003) Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 8:109-18

- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 61: 705-13
- Sanacora G, Fenton LR, Fasula MK, Rothman DL, Levin Y, Krystal JH, Mason GF (2006) Cortical gamma-aminobutyric acid concentrations in depressed patients receiving cognitive behavioral therapy. *Biol Psychiatry*. 59:284-6
- Sanacora G, Saricicek A (2007) GABAergic contributions to the pathophysiology of depression and the mechanism of antidepressant action. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:127-140
- Sapolsky RM (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34: 721-32
- Sapolsky RM (2004) Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biol Psychiatry*. 56(3):137-9
- Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ (2000) Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* 57: 174-80
- Scharfman HE, Hen R (2007) Neuroscience. Is more neurogenesis always better? *Science*. 315:336-8
- Schatzberg AF (2000) New indications for antidepressants. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 11: 9-17
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509-22
- Selten JP, Cantor-Graae E (2005) Social defeat: risk factor for schizophrenia? *Br J Psychiatry* 187: 101-2
- Selye H (1965) The stress syndrome. *Kango Gijutsu*. 11:92-8
- Sen S, Duman R, Sanacora G (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*. 64:527-32
- Shah PJ, Ogilvie AD, Goodwin GM, Ebmeier KP (1997) Clinical and psychometric correlates of dopamine D₂ binding in depression. *Psychol Med*. 27:1247-56.

- Siegrist J (2008) Chronic psychosocial stress at work and risk of depression: evidence from prospective studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258 Suppl 5: 115-9
- Silva AM, Cootauco AC, Aina-Mumuney A, Donohue PK, Graham EM (2008) The association of hypotonia and depression in the term and near-term neonate with metabolic acidemia. *J Perinat Med* 36:151-156
- Skolnick P (2002) Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. *Amino Acids*. 23:153-9
- Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van Kempen T, Lee FS, Casey BJ (2010) A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science*. 327:863-6
- Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K (2006) Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 83:186-93
- Soriano FX, Hardingham GE (2007) Compartmentalized NMDA receptor signalling to survival and death. *J Physiol* 584:381-387
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 97:253-66
- Southwick SM, Krystal JH, Morgan CA, Johnson D, Nagy LM, Nicolaou A, Heninger GR, Charney DS (1993) Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 50:266-74
- Southwick SM, Morgan CA 3rd, Bremner AD, Grillon CG, Krystal JH, Nagy LM, Charney DS (1997) Noradrenergic alterations in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci*. 821:125-41
- Srinivasan V, Zakaria R, Othaman Z, Brzezinski A, Prasad A, Brown GM (2012) Melatonergic drugs for therapeutic use in insomnia and sleep disturbances of mood disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 11:180-9.
- Stafford RS, MacDonald EA, Finkelstein SN (2001) National Patterns of Medication Treatment for Depression, 1987 to 2001. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 3:232-235

- Stahl SM (2003) Symptoms and circuits, part 1: major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*. 64:1282-3
- Stein MB (2004) Public health perspectives on generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*. 65 Suppl 13:3-7
- Stein EJ, da Silveira Filho NG, Machado DC, Hipolide DC, Barlow K, Nobrega JN (2009) Chronic mild stress induces widespread decreases in thyroid hormone alpha1 receptor mRNA levels in brain--reversal by imipramine. *Psychoneuroendocrinology* 34:281-6
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P (2004) Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 29:2007-17
- Study RE, Barker JL (1982) Cellular mechanisms of benzodiazepine action. *JAMA*. 247:2147-51
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*. 64:293-301
- Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, Schoepp DD (2005) Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 4:131-44
- Tandberg E, Larsen JP, Aarsland D, Cummings JL (1996) The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Arch Neurol*. 53:175-9.
- Tata DA, Anderson BJ (2010) The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiol Behav*. 99:186-93
- Thiebot MH, Martin P, Puech AJ (1992) Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *Br J Psychiatry Suppl*: 44-50
- Tordera RM, Pei Q, Sharp T (2005) Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT1, by a course of antidepressant treatment. *J Neurochem* 94:875-883
- Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, Del Rio J (2007) Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in

- mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1).
Eur J Neurosci 25: 281-90
- Tremblay LK, Naranjo CA, Cardenas L, Herrmann N, Busto UE (2002) Probing brain reward system function in major depressive disorder: altered response to dextroamphetamine. Arch Gen Psychiatry. 59: 409-16.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, Mayberg HS, Hevenor S, Busto UE (2005) Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. Arch Gen Psychiatry. 62:1228-36.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. Nat Neurosci 9: 519-25
- Uezato A, Meador-Woodruff JH, McCullumsmith RE (2009) Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. Bipolar Disord 11: 711-25
- Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V (1999) Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. Biol Psychiatry 46: 473-83.
- Valdizán EM, Díez-Alarcia R, González-Maeso J, Pilar-Cuéllar F, García-Sevilla JA, Meana JJ, Pazos A (2010) α_1 -Adrenoceptor functionality in postmortem frontal cortex of depressed suicide victims. Biol Psychiatry. 68: 869-72
- Vollmayr B, Simonis C, Weber S, Gass P, Henn F (2003) Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with the development of learned helplessness. Biol Psychiatry. 54:1035-40
- Von Frijtag JC, Reijmers LG, Van der Harst JE, Leus IE, Van den Bos R, Spruijt BM (2000) Defeat followed by individual housing results in long-term impaired reward- and cognition-related behaviours in rats. Behav Brain Res. 117:137-46
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neurosci. 22:6810-8.

- Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, Riederer P, Saito T (2003) Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm.* 110:671-80
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 24:1071-89
- Walker DL, Davis M (2002) The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav.* 71:379-92
- Wallace TL, Stellitano KE, Neve RL, Duman RS (2004) Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. *Biol Psychiatry.* 56:151-60
- Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus.* 16:239-49.
- Weiss EL, Longhurst JG, Mazure CM (1999) Childhood sexual abuse as a risk factor for depression in women: psychosocial and neurobiological correlates. *Am J Psychiatry* 156: 816-28
- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthal W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ (2009) Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci* 29: 7820-32
- Willner P (1990) Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45: 425-55
- Willner P, Muscat R, Papp M (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 525-534
- Willner P, Mitchell PJ (2002) The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol.* 13:169-88
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 52:90-110
- Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, Takamori S, Brose N, Rosenmund C (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(18):7158-63

- Workman EA, Short DD (1993) Atypical antidepressants versus imipramine in the treatment of major depression: a meta-analysis. *J Clin Psychiatry*. 54:5-12
- Wurtman RJ (2005) Genes, stress, and depression. *Metabolism* 54: 16-9
- Xiang X, Huang W, Haile CN, Kosten TA (2011) Hippocampal GluR1 associates with behavior in the elevated plus maze and shows sex differences. *Behav Brain Res*. 222:326-31
- Yan HC, Qu HD, Sun LR, Li SJ, Cao X, Fang YY, Jie W, Bean JC, Wu WK, Zhu XH, Gao TM (2009) Fuzi polysaccharide-1 produces antidepressant-like effects in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*: 1-11
- Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, Zhou QG, Wu DL, Zhu LJ, Zhu DY (2010) Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci*. 30:2433-41
- Zoladz PR, Park CR, Munoz C, Fleshner M, Diamond DM (2008) Tianeptine: an antidepressant with memory-protective properties. *Curr Neuropharmacol* 6: 311-21

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Planteamiento y objetivos

La depresión es un trastorno mental, caracterizado principalmente por humor depresivo y anhedonia, frecuentemente asociado a otros síntomas tanto psíquicos como somáticos. Constituye una de las patologías psiquiátricas más frecuentemente diagnosticadas en los países desarrollados alcanzando unas cifras de incidencia del 5% en la población europea. Junto a ella, la ansiedad es también una patología muy frecuente que puede manifestarse sola o de manera comórbida con la depresión u otras enfermedades llegando a alcanzar una prevalencia del 20%. Teniendo en cuenta que se trata de enfermedades crónicas, estas cifras desvelan una enorme carga social en términos de sufrimiento humano para pacientes y familiares, además de un elevado coste económico para los países desarrollados.

La hipótesis de la deficiencia monoaminérgica ha constituido durante años la base de los enfoques terapéuticos para el tratamiento de la depresión. No obstante, esta hipótesis ha sido cuestionada debido a la ausencia de una eficacia inmediata de los tratamientos, al fracaso de dichos tratamientos que suele rondar el 30-35%, así como a las numerosas recaídas que presentan los pacientes tratados. Por ello, se plantean nuevas hipótesis de trabajo como alteraciones en la neuroplasticidad o en los sistemas de monoaminas y de glutamato. De la misma manera, en el caso de la ansiedad, si bien está ampliamente aceptado el papel del sistema GABAérgico, su elevada comorbidad con la depresión, sugiere para esta patología alteraciones neurobiológicas similares a los estados depresivos.

Entre los factores etiológicos de la depresión destaca el estrés, ya que numerosas evidencias muestran que muchos trastornos depresivos están precedidos por la exposición a situaciones estresantes crónicas o a experiencias traumáticas severas. No obstante, dado que no todas las personas poseen el mismo grado de control sobre las situaciones estresantes, se sugiere también la existencia de factores biológicos (genéticos, bioquímicos, neuroendocrinos...) y sociales (familiares, grado de apoyo...) que determinarían una diferente susceptibilidad interindividual. Igualmente, la exposición a eventos estresantes de la vida puede llevar a un primer estado de ansiedad que resulta útil para evitar situaciones similares y potencialmente peligrosas en el futuro. Sin embargo, éstos también pueden desencadenar estados exagerados que con el tiempo deriven en una patología.

Recientemente, el impacto del estrés crónico sobre la salud de las personas está centrando más la atención en el estudio sobre la naturaleza y origen de los agentes estresantes, ya que éstos pueden tener gran importancia a la hora de abordar la sintomatología diversa que presentan los pacientes. Así, se ve la necesidad de estudiar separadamente la influencia de un estrés crónico tipo ambiental (ruido, hacinamiento, polución, trabajo por turnos, catástrofes naturales, etc.) y de tipo social, al cuál muchas personas son frecuentemente sometidas por sus congéneres como situaciones de agresividad, subordinación, humillaciones o bullying entre otras.

Basándose en estas consideraciones, a nivel experimental, en las últimas décadas se han desarrollado modelos de estrés crónico en ratón con la intención de mimetizar situaciones de la vida cotidiana en personas adultas, que puedan desencadenar diversos trastornos psiquiátricos. Entre estos, el modelo de estrés crónico suave (*chronic mild stress*, CMS) y el estrés crónico de derrota social (*chronic social defeat stress*, CSDS) basados en la exposición a factores ambientales y sociales adversos respectivamente.

El modelo de CMS ha sido ampliamente estudiado y reproduce síntomas centrales de la depresión como la anhedonia y la desesperación conductual y ha demostrado una buena validez predictiva como modelo de depresión. Además, interactúa negativamente con algunos posibles factores biológicos de vulnerabilidad. Entre éstos, estudios clínicos y preclínicos recientes han relacionado la disminución de los niveles del transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) con un estado depresivo. Concretamente en nuestro laboratorio, estudios con ratones heterocigóticos (VGLUT1 +/-) muestran que la disminución de VGLUT1 afecta a la transmisión de glutamato y aumenta la vulnerabilidad a la conducta depresiva tras la exposición a estrés crónico suave.

El modelo de estrés crónico de derrota social (CSDS) se basa en la inducción de "subordinación social" causada por cortos períodos de lucha y convivencia continuada con un animal dominante. Una serie de estudios centrados en relaciones jerárquicas muestran que animales que han sido "subordinados" por individuos dominantes de la misma especie sufren síntomas de estrés como evitación social, ansiedad, disminución del acicalamiento, hiperactividad y el aumento de la vulnerabilidad a la adicción. Además, se han descritos

en animales cambios significativos en la función cerebral, la fisiología, y niveles de neurotransmisores y de niveles hormonas.

Sin embargo, la validez aparente del CSDS como modelo de depresión no está en absoluto consolidada ni a nivel conductual ni neurobiológico. Por un lado, la mayoría de los estudios fijan su atención en el análisis de la interacción social. La evitación social, es un síntoma psiquiátrico común a varios trastornos en los humanos, como la ansiedad generalizada y el trastorno de estrés postraumático. Además se observa en la literatura una gran variedad de protocolos de CSDS así como una clara falta de consenso en el tipo de estímulo utilizado (ratón dominante o ratón de la misma especie) para analizar la interacción social.

Además, síntomas típicamente depresivos como la anhedonia o la indefensión apenas se han estudiado en este modelo. También se desconoce su validez predictiva ya que ningún fármaco antidepresivo ha sido testado para estudiar la posible reversión de estos síntomas. Por otra parte, hasta la fecha, no se ha estudiado la interacción del CSDS con posibles factores biológicos de mayor vulnerabilidad al fenotipo depresivo. Todo ello sugiere la necesidad de caracterizar comparativamente con otros modelos de estrés crónico, la relevancia del CSDS para la depresión clínica u otras enfermedades neuropsiquiátricas.

Por otro lado, a nivel neurobiológico, muchos estudios sugieren que las conductas de tipo ansioso o depresivo en el roedor, están reguladas, al menos en parte por alteraciones en la estructura dendrítica y/o sináptica en regiones del cerebro implicadas en el procesamiento de las emociones como la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo. Así, la corteza prefrontal parece ser la región que regula las emociones, previniendo un excesivo impacto del estrés y por tanto de la activación neuronal sobre la amígdala. Sin embargo, la mayoría de los estudios que analizan esas alteraciones han sido realizados en modelos de estrés ambiental. Se desconoce por tanto el efecto del estrés crónico social a largo plazo sobre la regulación de la plasticidad sináptica en estas regiones.

De acuerdo con estas consideraciones, los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral son estudiar comparativamente la relevancia del tipo de estrés crónico, social o ambiental, para el desarrollo de distintas enfermedades neuropsiquiátricas. En el marco de este objetivo, nos proponemos estudiar la relevancia del estrés crónico social para el desarrollo de depresión clínica.

Para la consecución de estos objetivos, se llevaron a cabo los siguientes estudios en ratones:

1.- Estudio comparativo entre el modelo ambiental estrés crónico suave y el modelo social estrés crónico de derrota social (CSDS) a largo plazo. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo 3.

1.1.- Evaluación del efecto del CMS y CSDS a largo plazo sobre una batería de test conductuales entre los que se incluyen la valoración de la anhedonia, desesperación conductual en el test de Porsolt, actividad motora, ansiedad, interacción social y valoración del estado cognitivo.

1.2.- Evaluación del efecto del CMS y CSDS a largo plazo sobre los niveles de aminas serotonina y dopamina y de los aminoácidos glutamato y GABA en distintas regiones cerebrales.

2. Estudio de la validez del estrés crónico de derrota social (CSDS) como modelo de depresión. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo 4 y 5.

2.1.- Evaluación comparativa entre los efectos del aislamiento social *per se* y del CSDS, que incluye aislamiento social e inducción de derrota, sobre una batería de test conductuales. Se realizarán los mismos test conductuales descritos en el objetivo 1.1.

2.2.- Estudio comparativo de los efectos del tratamiento con distintos antidepresivos entre los que se incluyen el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina fluoxetina, el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina venlafaxina y el modulador glutamatérgico tianeptina.

2.3.- Evaluación del efecto de una disminución de transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) como posible factor biológico de vulnerabilidad aumentada al estrés social.

2.3.1. Estudio comparativo de la vulnerabilidad al CSDS de ratones heterocigóticos para el transportador de glutamato 1 (VGLUT1) y ratones silvestres. Se realizarán los mismos test conductuales descritos objetivo 1.1.

2.3.2. Análisis de la expresión de RNAm de VGLUT1 en distintas regiones cerebrales de ratones expuestos a CSDS.

2.4.- Análisis de alteraciones en plasticidad sináptica inducidas por el estrés crónico social de derrota a largo plazo en la corteza prefrontal y la amígdala.

2.4.1.- Evaluación de la densidad de espinas dendríticas.

2.4.2.- Evaluación de la expresión proteica de distintas subunidades de receptores de glutamato y GABA.

2.4.3.- Evaluación de la expresión proteica del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor de transcripción CREB, sinaptofisina, proteína postsináptica de densidad 95 (PSD95).

2.5.- Identificación de marcadores de plasticidad sináptica de respuesta alterada a diferentes estímulos sociales.

2.5.1.- Análisis de la expresión proteica de marcadores de plasticidad sináptica en la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala tras la exposición al test de la interacción social con un ratón dominante y un ratón de la misma especie.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Social *versus* environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach

European Neuropsychopharmacology, 2012, published

Resumen

La depresión mayor es un trastorno mental a menudo precedido por la exposición a un estrés crónico o a eventos estresantes de la vida. Recientemente, modelos animales basados en los conflictos sociales, tales como el estrés crónico de derrota social (Chronic social defeat stress, CSDS), se proponen como modelos más relevantes para el estudio de la psicopatología humana inducida por estrés, en comparación con los modelos ambientales como el estrés crónico suave (Chronic mild stress, CMS). Sin embargo, mientras que el CMS reproduce síntomas principales de la depresión, como la anhedonia y la desesperación conductual, los estudios de CSDS basan su análisis en la evitación social inducida por el estrés, que es relevante a diferentes trastornos neuropsiquiátricos. En este trabajo hemos estudiado comparativamente los dos modelos a partir de un enfoque conductual y neuroquímico y su posible relevancia para la depresión humana.

Los ratones (C57BL / 6) fueron expuestos a CMS o CSDS durante seis semanas o diez días respectivamente. La conducta anhedónica fue evaluada periódicamente. Durante la cuarta semana después de la finalización del estrés, se realizó una batería de test conductuales para medir la actividad motora, la memoria, la ansiedad, la interacción social y la desesperación conductual. Posteriormente, se examinaron los niveles de glutamato, GABA, 5-HT y dopamina en la corteza prefrontal, el hipocampo y el tronco del encéfalo.

El CMS indujo una clara conducta depresiva, incluyendo anhedonia, desesperación conductual y pérdida de memoria. El CSDS indujo anhedonia, hiperactividad, ansiedad y evitación social, alteraciones también comunes a los trastornos de ansiedad y el estrés postraumático. Ambos modelos mostraron alterado el equilibrio excitatorio/inhibitorio en la corteza prefrontal. Además, el CMS produjo una alteración importante de este equilibrio en el tronco del encefalo. Por otra parte, el CSDS disminuyó los niveles de dopamina en la corteza prefrontal y el tronco del encefalo.

Estos datos sugieren que mientras que los comportamientos tipo depresivos podrían estar asociados con la neurotransmisión alterada de glutamato y gaba en la corteza y el tronco del encéfalo, la conducta ansiosa inducida por el CSDS podría estar

más vinculada a las alteraciones específicas de las vías dopaminérgicas, implicadas en los procesos de recompensa.

Abstract

Major depression is a mental disorder often preceded by exposure to chronic stress or stressful life events. Recently, animal models based on social conflict such as chronic social defeat stress (CSDS) are proposed to be more relevant to stress-induced human psychopathology compared to environmental models like the chronic mild stress (CMS). However, while CMS reproduces specifically core depressive symptoms such as anhedonia and helplessness, CSDS studies rely on the analysis of stress-induced social avoidance, addressing different neuropsychiatric disorders. Here, we study comparatively the two models from a behavioural and neurochemical approach and their possible relevance to human depression.

Mice (C57BL/6) were exposed to CMS or CSDS for six weeks and ten days. Anhedonia was periodically evaluated. A battery of test applied during the fourth week after the stress procedure included motor activity, memory, anxiety, social interaction and helplessness. Subsequently, we examined glutamate, GABA, 5-HT and dopamine levels in the prefrontal cortex, hippocampus and brainstem.

CMS induced a clear depressive-like profile including anhedonia, helplessness and memory impairment. CSDS induced anhedonia, hyperactivity, anxiety and social avoidance, signs also common to anxiety and posttraumatic stress disorders. While both models disrupted the excitatory inhibitory balance in the prefrontal cortex, CMS altered importantly this balance in the brainstem. Moreover, CSDS decreased dopamine in the prefrontal cortex and brainstem.

We suggests that while depressive-like behaviours might be associated to altered aminoacid neurotransmission in cortical and brain stem areas, CSDS induced anxiety behaviours might be linked to specific alteration of dopaminergic pathways involved in rewarding processes.

Keywords: chronic mild stress, chronic social defeat stress, depression, anxiety, social interaction, glutamate, gaba, dopamine, serotonin.

1. INTRODUCTION

Living organisms have developed a series of adaptive mechanisms to cope with stressful situations. This is an invaluable advantage for the healthy organism, which, can adapt and overcome the unfavourable conditions. However, when stress response is uncontrollable, as a consequence of the exposure to severe or long periods of stress, it can seriously compromise the individual's health. In the last decades, an important line of research in neurobiology has shown that chronic stress induces a wide range of adverse effects on the central nervous system and is associated to different neuropsychiatric disorders (Mazure et al. 2000, Collimore et al. 2010; Friedman et al. 2011).

Major depression is a mental illness very often described as a stress-related disorder since there is good evidence that both onset and relapse of depressive disorders can be precipitated by repeated stress or severe stressful experiences (Kessler, 1997; Kendler et al. 1999; 2001; Mazure et al. 2000; Monroe et al. 2006; Hammen, 2005; Pittenger y Duman, 2008). Based on this hypothesis, mouse specific models have been developed in an attempt to mimic some of the environmental factors contributing to the induction of depressive disorders in humans. Among them, the chronic mild stress (CMS) model reproduces core clinical symptoms such as long-lasting anhedonia and helplessness (Elizalde et al. 2008) and has demonstrated a good predictive validity as a model of depression in the short and the long-term (Willner 2005; Elizalde et al. 2008; Tordera et al. 2011).

Nevertheless, in recent years, models based on social conflict have been proposed to have clear advantages over environmental models because they involve a social form of stress, which may be relevant to stress-induced psychopathology in humans (Krishnan et al. 2008). For instance, the chronic social defeat stress (CSDS) model is based in the induction of "social subordination" caused by short periods of struggle and fellowship continued with a dominant animal. A number of hierarchical relations studies show that animals that have been "subordinated" by the dominant individuals of the same species suffer signs of stress (Lagerspetz et al. 1961; Koolhaas et al. 1997) including social avoidance, anxiety, decreased grooming, hyperactivity and increased vulnerability to addiction (Krishnan et al. 2007; Rossi et al. 2008; Denmark et al. 2010). Moreover,

significant changes in brain function, neurotransmitters and hormone levels have been reported (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001; Allen and Badcock, 2003; Lutter et al. 2008; Wagner et al. 2011).

Yet, CSDS studies rely on the analysis of stress-induced social avoidance, which is a psychiatric phenomenon common to different neuropsychiatric disorders such as depression, general anxiety, social phobia and post-traumatic stress disorder (Berton et al., 2006). On the other hand, few studies have examined the long-term effects of CSDS in behaviours more closely related to depression such as reactivity to rewards or helplessness (Krishnan et al. 2007). Here, we have studied comparatively the environmental CMS and the social CSDS stress models from a behavioural and neurochemical approach and have discussed their possible relevance to human depression.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

2.1 Animals

Male C57BL/6 mice (Harlan, France, 8-10 weeks of age) were used. Food and water were available *ad libitum* for the duration of the experimental procedures unless otherwise specified. Animals were maintained in a temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity-controlled room ($55 \pm 2\%$) on a 12-h light-dark cycle (lights on at 8:00 h).

Male CD1 retired breeders (Charles River, older than 5 months of age) were used as residents for the CSDS experiment.

Experimental procedures and animal husbandry were conducted according to the principles of laboratory animal care as detailed in the European Communities Council Directive (2003/65/EC), Spanish legislation (Real decreto 1201/2005) and approved by the Ethical Committee of University of Navarra.

2.2 Experimental design for the CMS and CSDS procedures

Before starting the stress models, mice were assigned to the different groups in a way that there were not differences on body weight and sucrose consumption among the groups. Mice (C57BL/6 male, 8-10 weeks of age) were exposed to the CMS procedure for 6 weeks. During this time, control and CMS mice ($n=15$ /group) were singly housed. On the fourth week after the termination of the CMS procedure, a battery of behavioural test was applied.

Concomitantly, we studied the long-term behavioural alterations induced by chronic social defeat stress (CSDS). Mice (C57BL/6 male, 8-10 weeks of age) were exposed to the CSDS procedure for 10 days. During this time, CSDS mice ($n=15$) were housed individually in cages with two compartments separated by a metallic mesh being a dominant mouse the partner. During this time, control mice ($n = 15$), were singly housed in similar cages with a mouse of the same strain in the other half of the cage. Twenty-four hours after the last session, both control and defeated mice were housed individually during the following 4 weeks. During the fourth week, a battery of behavioural tests was applied (**Figure 1**).

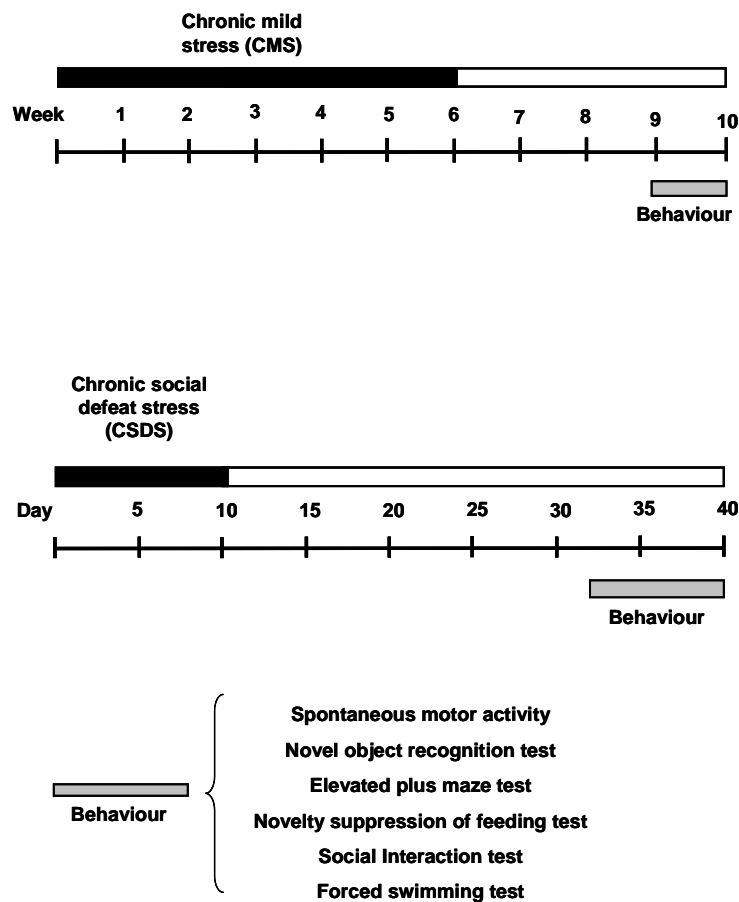


Figure 1. Experimental design of CMS and CSDS procedures and behavioural tests performed.

Tests were performed in the following order over 9 days: spontaneous motor activity (day 1), novel object recognition (days 2 and 3), tests of anxiety (novelty suppression feeding and elevated plus-maze) (days 5 and 6), social interaction test (day 7), and test of depression (forced swimming test, FST) (day 8). Tests were performed from 9:00-1:00 p.m. In addition, anhedonic-like behaviour was evaluated by monitoring of sucrose intake every 10 days as well as the body weight gain (Elizalde et al. 2008).

Mice were killed in a randomized order two days after the last behavioural test, the brains were removed, and different brain areas were dissected and kept at -80°C for posterior neurochemical studies.

2.3 Chronic mild stress procedure

Unpredictable repeated mild stressors were applied for 6 weeks following the protocol described by Elizalde et al. (2008) with minor modifications. Briefly, the following stressors (two–three in any 24 h period) were applied: low intensity stroboscopic illumination (in dark 8 h), intermittent bell (10 db, 1/10 s) or white noise (an untuned radio, 4 h), rat odor (saw dust from rat cages; 8 h), cage tilt 45° (8 h), soiled bedding (200 ml of water per cage; 6 h), paired housing (with new partner 2 h), placement of novel object in the home cage (3 h), water and food deprivation (8 h, before sucrose intake test), overnight illumination and removal of nesting material (12 h), and confinement in a small cage (80 cm³ 1 h).

2.4 Chronic social defeat stress procedure

Chronic social defeat stress (CSDS) procedure was carried out using a similar method described by Tsankova et al. (2006). Briefly, experimental mice were submitted to social defeat stress for 10 consecutive days. Every day, each mouse was introduced into the home cage of an unfamiliar resident. Resident mice were CD1 retired breeders selected for their attack latencies reliably shorter than 30 s upon three consecutive screening tests. Once the experimental mouse had been physically defeated by 3 attacks, both animals (defeated and aggressor) were maintained in sensory contact for 24 hours using a metallic mesh dividing the resident home cage in two halves. During the 10 days control mice were individually housed in equivalent cages but with members of the same strain in the opposite half.

2.5 Sucrose intake test

Anhedonic-like behaviour was evaluated by monitoring of sucrose intake (Elizalde et al. 2008). Mice were first trained to drink a sucrose solution by exposing them to two standard drinking bottles, one containing 2.5% sucrose and the other tap water, for every other night during one week. After this preliminary phase, mice were food deprived and exposed to the sucrose solution and water from 6:00 p.m. until 09:00 h in the morning. The intake baseline for the sucrose solution was established, which corresponded to the average of three consecutive measurements.

Mice were divided into stress (CSDS or CMS) and non-stress control groups matched for sucrose consumption and body weight. Every 10 days, mice were given a 15-h exposure to the sucrose solution and tap water as described above and during this test no stressors were applied. The position of the 2 bottles (right/left) was varied randomly from trial to trial. Body weight measurements were taken and relative sucrose intake was calculated as absolute intake (g) per body weight.

2.6 Behavioural tests

Spontaneous locomotor activity

Locomotor activity was measured in an open field consisting of 9 black square arenas (43 x 50 x 45) using a video tracking system (Ethovision XT 5.0, Noldus Information Technology B. V., Wageningen, The Netherlands) in a softly illuminated experimental room. One mouse was placed in each cage and distance travelled (cm) and speed was recorded during a 30 min period.

Novel object recognition

Visual recognition memory was assessed with this test (Elizalde et al., 2008). On day 1, mice were placed for 30 min in the empty box to habituate them to the apparatus and test room. On day 2, two identical objects (A1 and A2; two prisms 7 x 3 x 3 cm) were placed symmetrically 11 cm away from the wall and separated 22 cm from each other. The mouse was placed in the box at equal distance from both objects and video recorded for 5 min (sample phase). Then, the mouse was returned to its cage. After a delay of 1 h or 24 h the mouse was placed back in the box and exposed to the familiar object (A3) and to a novel object (B or C for 1 or 24 h retention interval respectively) a further 5 min (retention tests). The novel object B consisted of a ball (3.5 cm diameter) mounted on a cube (3 cm) and C was a cylindrical plastic bottle (7 x 3 cm). The positions of the familiar and the new object alternated between the 1 h and the 24 h retention test. Previous experiments applied in our lab showed that mice have no preferences for any of the objects used during the procedure.

Mice were video recorded (Pinnacle Studio 9.0, Pinnacle systems Inc, Pittsburgh US) and the total time spent exploring each of the two objects in the sample and

retention phases were measured (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module). The exploration time was measured as the time that the nose of the mouse was in an area surrounding 2 cm the object. Percentage of exploration of the new object compared to the total exploration time in the retention test was calculated.

Elevated-plus maze

This test was applied to measure unconditioned anxiety-like behaviour (Lister, 1987). The elevated-plus maze (EPM) consisted of two open arms (30 × 5 cm), two enclosed arms (30 × 5 cm) and a central platform (5 × 5 cm) elevated 38.5 cm above the ground in a softly illuminated room (50 lux). At the beginning of the 5-min session, each mouse was placed in the central neutral zone, facing one of the close arms. Percentage time in the open and central arms and number of head dips over the edge of open arms were calculated (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module). An arm entry was defined as a mouse having entered an arm of the maze with all four legs.

Novelty suppression of feeding

This test measures anxiety-like behaviour in mice (Gross et al. 2000). Animals were food deprived for 24 hours before testing. The animals were then provided with food in a novel environment consisting of a transparent plastic open field (45 x 45 x 45 cm) with a pellet of food placed in the middle of the open field. The mice were placed into the periphery of the open field and during a 5 min period, the latency to approach to the food and the total amount of time feeding were scored (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module). The latency was measured as the first time the animal touch the food-pellet within an area of 0.5 cm.

Social interaction test

This test measured the approach-avoidance behaviour towards an unfamiliar social target (Tsankova et al. 2006). The arena is a transparent plastic open field (45 x 45 x 45 cm) maintained in a very softly illuminated room (50 lux). Each experimental mouse was introduced into the open field and its trajectory was tracked for two consecutive sessions of 2.5 min. During the first session ("no target") the open field contained an empty metallic mesh cage (10.5 x 9 cm) located at one end of the field. During the

second session ("target"), the conditions were identical except that a social target animal (a mouse from the same strain and of similar weight) had been introduced into the cage. Between the two sessions, the experimental mouse was removed from the arena, and was placed back into its home cage for approximately one min. The time that the experimental mouse spent in the "interaction zone" (7 cm wide corridor surrounding the little metallic cage) both in the "no target" and "target" conditions were recorded (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module) and differences ("target-no target") were calculated for each mouse.

Forced swimming test

The forced swimming test is the most widely used test for depression and screening antidepressants in rodents (Porsolt, 1977). Mice were placed individually for 6 min into glass cylinders (height 24 cm, diameter 13 cm) containing 14 cm of water, maintained at 22–23°C. The duration of immobility was recorded during the last 4 min of the 6 min testing period. A mouse was considered to be immobile when it floated in an upright position, and made only small movements to keep its head above water ($\leq 3\%$ of mobility detected by Ethovision XT).

2.7 Neurotransmitter brain levels

The concentrations of GABA, glutamate, 5-HT and dopamine in prefrontal cortex, raphe nuclei and hippocampus were determined by HPLC with electrochemical detection (DECADE; Antec-Leyden) with a high sensitivity analytical flowcell (VT-03). Glutamate and GABA levels were detected as previously described (Garcia-Alloza et al. 2005). The working electrode was set at 0.7 V. A column (Biophase ODS 5 μm , 4.6 \times 150 mm) including precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde and β mercapthoethanol (Sigma-Aldrich Ltd, Germany) was used. For 5-HT and dopamine detection, homogenates were prepared following the procedure described by Perez-Otaño et al. 1991). The working electrode was set at 0.8V and a column (Spherisorb ODS2 5 μm , 15 \times 0.46mm²; Teknokroma, San Cugat del Valles, Spain) was used. All samples were assayed in duplicate and results were expressed in ng per mg of wet tissue.

2.8 Statistical analysis

Weight gain and sucrose intake was analyzed with two-way ANOVA being time the within-subjects factor and stress the between-subjects factor. Individual measures for each time point were compared among the groups using Student *t*-test.

The behavioural and neurochemical (HPLC) effects of CMS and CSDS were analyzed using one way ANOVA (stress) followed by Tukey *post hoc* test.

3. RESULTS

3.1 Depressive-like behaviours

Helpless behaviour. A significant difference among the groups was observed in the immobility times in the forced swimming test ($F_{3, 56} = 3.506$, $n=15$, $p<0.05$). *Post hoc* analysis revealed that mice exposed to CMS showed an increase in immobility time in the test ($p<0.05$) (**Figure 2**).

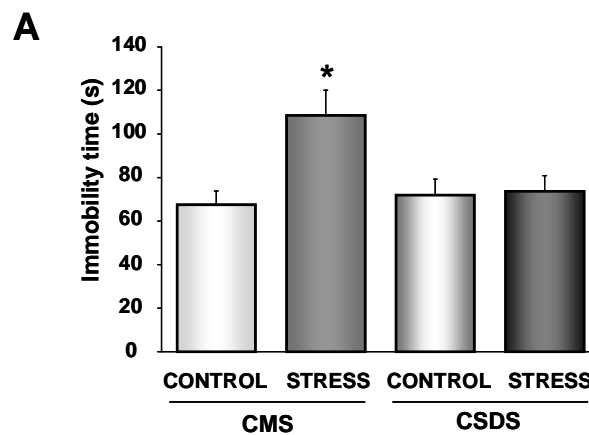


Figure 2. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress on depressive like behaviours in the forced swimming test. Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of immobility time (mobility $<3\%$) in the forced swimming test (* $p<0.05$ vs. corresponding control).

Sucrose intake. In this test, significant interaction between stress and time was found in mice exposed to CMS ($F_{1,28} = 13.689$, $n=15$, $p<0.01$) and CSDS ($F_{1,28} = 10.622$, $n=15$, $p<0.01$) (Two-Way ANOVA). Mice exposed to CMS revealed a progressive decrease in sucrose intake compared to control mice that was significant from day 20 to the end of the experiment ($p<0.01$) (**Figure 3A**). At the end of the defeat procedure (day 10), mice exposed to CSDS showed higher sucrose index than controls ($p<0.05$). In contrast, on day 30, or twenty days after the stress procedure, CSDS induced a decrease in sucrose intake ($p<0.05$) compared to control mice (**Figure 3B**).

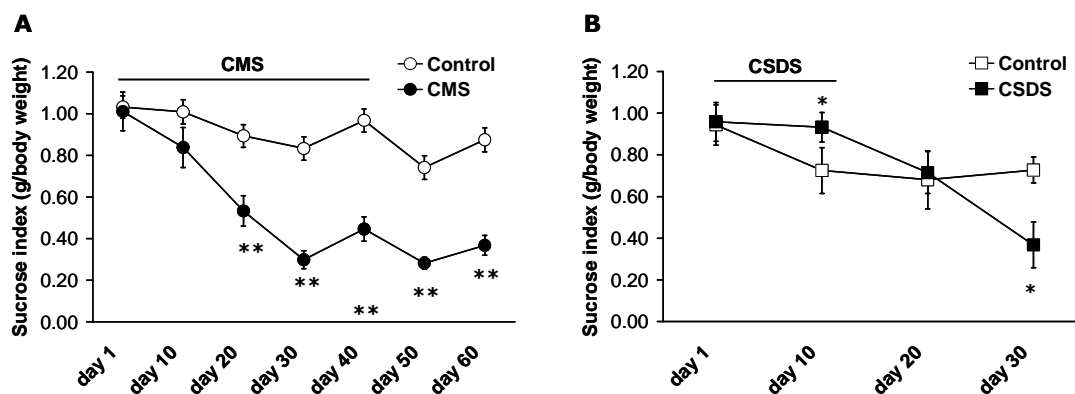


Figure 3. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress the sucrose intake test. Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of sucrose consumption per body weight measured every 10 days during and after de CMS procedure (A) and CSDS procedure (B) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control).

3.2 Anxiety-like behaviour and social interaction

Elevated plus maze test. Significant differences in the time spent in open arms ($F_{3,56}=3.335$, $n=15$, $p<0.05$) and in the latency to first entry into open arms ($F_{3, 56}=6.600$, $n=15$, $p<0.05$) in the elevated plus maze test. Mice exposed to CSDS showed a decrease in the time spent in open arms ($p<0.05$) (**Figure 4A**). In addition, these mice showed an increased latency time to first entry in the open arms compared to the corresponding controls ($p<0.01$) and to the CMS mice ($p<0.05$) (**Figure 4B**).

In addition, no significant changes among the groups in the number of entries in closed arms were found ($F_{3,56}=1.624$, $n=15$, $p>0.05$) (data not shown).

Novelty suppression of feeding test. Significant differences were observed in the time spent in the eating zone ($F_{3, 56}=3.167$, $n=15$, $p<0.05$) and in the latency to first entry into eating zone ($F_{3,56}=6.122$, $n=15$, $p<0.01$). Posterior analysis revealed that mice exposed to CSDS showed decreased time in the eating zone ($p<0.05$) (**Figure 4C**). In addition, these mice showed an increased latency to first approach to eating zone in mice exposed to CSDS compared to controls ($p<0.01$) and also to CMS mice ($p<0.05$) (**Figure 4D**).

In addition, exploratory activity was measured and no significance differences among groups were observed ($F_{3,56} = 1.013$, $n=15$, $p>0.05$) (data not shown).

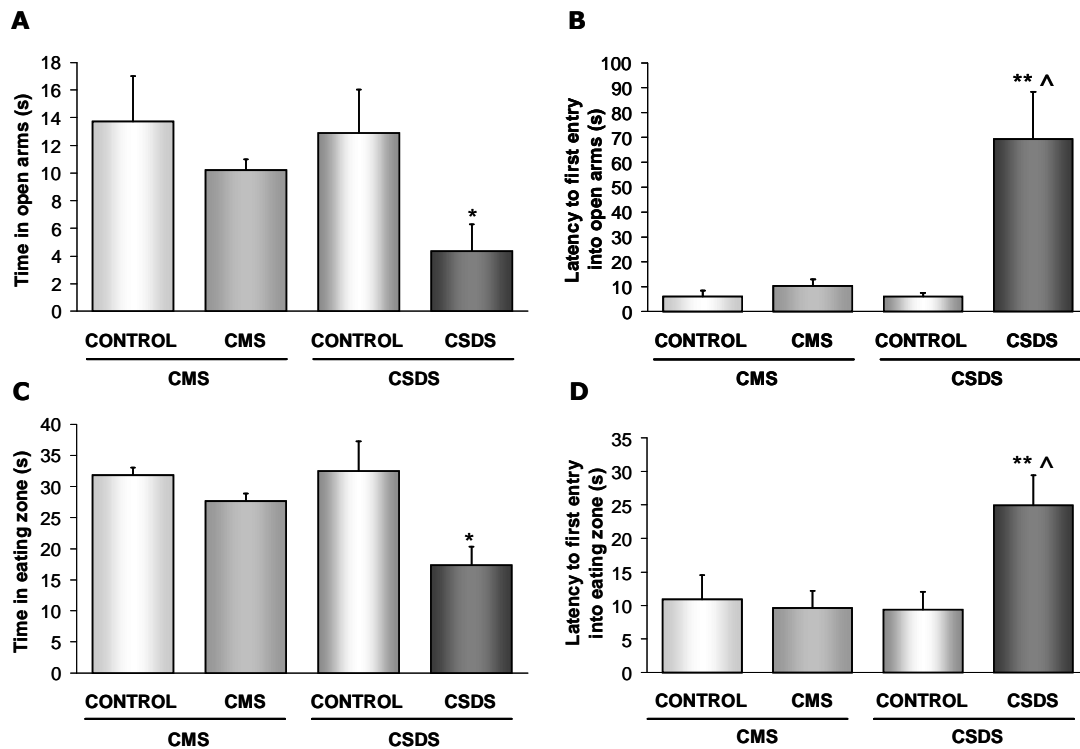


Figure 4. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress on anxiety behaviour in the elevated plus maze test (A,B) and in the novelty suppression of feeding test (C,D). Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of time spent in open arms (A) and latency time to first entrance into the open arms (B) in the elevated plus maze test, and time spent in the eating zone (C) and the latency time to first approach to the eating zone (D) in the novelty suppression of feeding test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control, ^ $p<0.05$ vs corresponding CMS).

Social interaction test. Significant differences were observed in the time spent in the interaction zone ("target"- "no target") ($F_{3,56} = 3.088$, $n=15$, $p<0.05$). *Post hoc* analysis revealed that mice exposed to CSDS showed a decreased social behaviour compared to corresponding controls ($p<0.05$) (Figure 5).

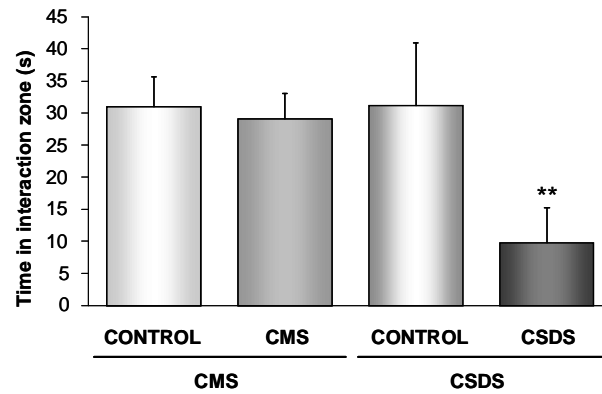


Figure 5. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress on social behaviour in the social interaction test. Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of the time spent in the interaction zone with target minus time spent in the interaction zone without target (** $p<0.01$ vs corresponding control).

3.3 Recognition memory

Novel object recognition test. Significant differences were found in short-term ($F_{3,56}=4.753$, $n=15$, $p<0.05$) (**Figure 6A**) and in the long-term recognition memory ($F_{3,56}=4.413$, $n=15$, $p<0.05$) (**Figure 6B**). Post hoc analysis revealed that in both cases mice exposed to CMS showed memory impairment compared to control mice ($p<0.05$). In addition no place preference (A and A') was observed in the sample phase in any of the groups

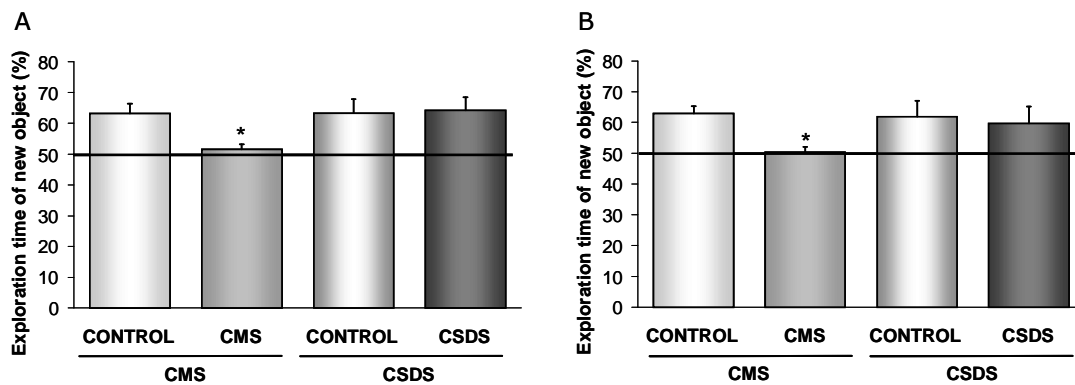


Figure 6. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress on short-term memory (A) and long-term memory (B) in the novel object recognition test. Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of percentage of time exploring new object 1 hour (A) and 24 hours after the sample face (B) (* $p<0.05$ vs corresponding control).

3.4 Motor activity and body weight gain

Significant differences were observed in the distance travelled ($F_{3,56} = 4.753$, $n=15$, $p < 0.05$). *Post hoc* analysis revealed a significant increase in motor activity in those mice exposed to CSDS compared to corresponding controls ($p < 0.05$) (**Figure 7A**).

Weight gain increased gradually across the 10 days time blocks both in the CMS and CSDS model. In the CMS procedure, no changes between groups were observed in body weight gain (**Figure 7B**). Mice exposed to CSDS did not gain weight during the CSDS procedure compared to control mice ($p < 0.01$) (**Figure 7C**).

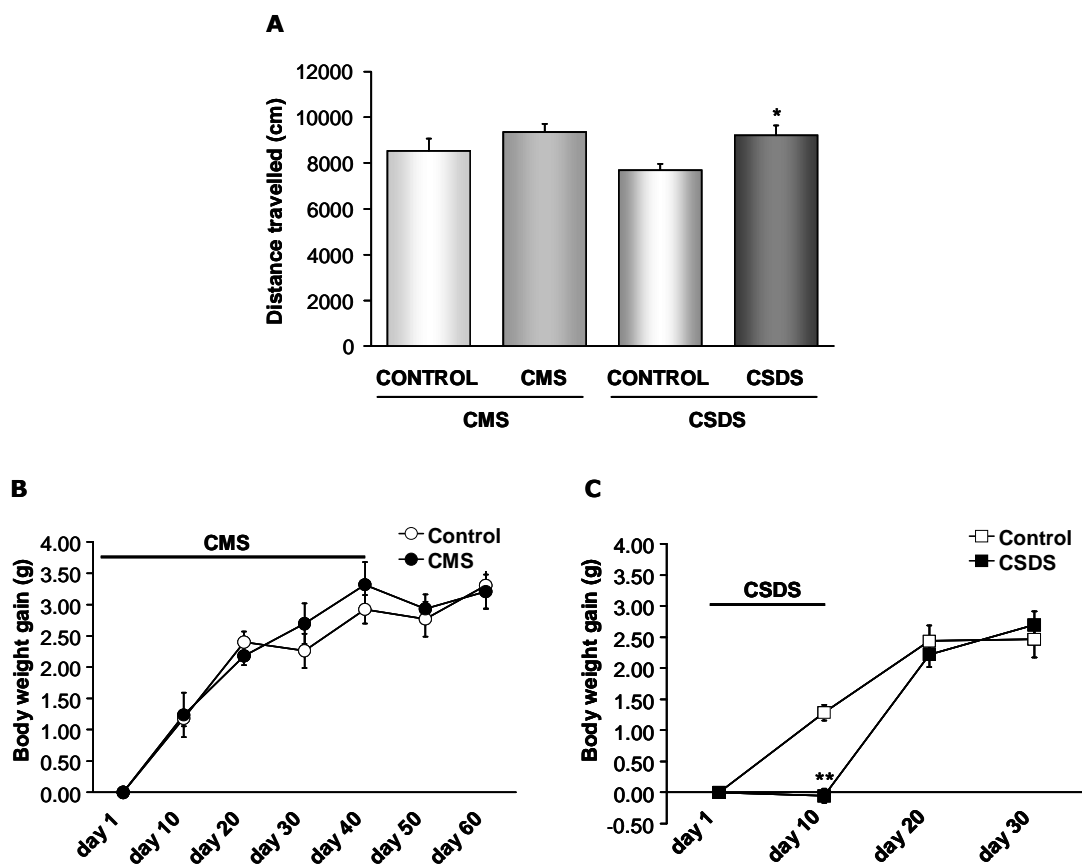


Figure 7. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress on weight gain (A,B) and motor activity (C). Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of the weight gain from the day 1 of the CMS (A) and CSDS (B) procedure and the distance travelled during 30 minutes (C) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs corresponding control).

3.5 Neurotransmitters brain levels

In the frontal cortex (**Figure 8A**), significant differences among groups were observed in the dopamine (DA) ($F_{3,56} = 3.605$, $n=15$, $p<0.05$) and in GABA ($F_{3,56} = 4.029$, $n=15$, $p<0.05$) levels. *Post hoc* analysis revealed a significant decrease in DA levels in mice exposed to CSDS compared to corresponding controls ($p<0.05$) and to CMS mice ($p<0.05$). Both CMS and CSDS mice showed decreased GABA levels ($p<0.05$) compared to non-stressed controls. In addition, differences were also observed in the excitatory/inhibitory ratio (Glut/GABA) ($F_{3,56} = 9.273$, $n=15$, $p<0.01$), showing an increased ratio in both stressed mice ($p<0.05$).

In the hippocampus (**Figure 8B**), no significant changes were observed in neurotransmitters levels in any form of stress.

In the raphe nuclei (**Figure 8C**), significant differences among groups were observed in the dopamine (DA) ($F_{3,56} = 3.380$, $n=15$, $p<0.05$), glutamate ($F_{3,56} = 4.548$, $n=15$, $p<0.01$) and GABA ($F_{3,56} = 3.212$, $n=15$, $p<0.05$) levels. *Post hoc* analysis revealed a significant decrease in DA levels in mice exposed to CSDS compared to corresponding controls ($p<0.05$). Moreover, mice exposed to CMS showed a significant increase in glutamate levels ($p<0.01$) and a decrease in GABA levels ($p<0.01$). Consequently, significant differences ($F_{3,56} = 7.391$, $n=15$, $p<0.01$) in the excitatory/inhibitory ratio were also observed. The increased ratio was observed in CMS mice compared to corresponding controls ($p<0.05$) and to those exposed to CSDS ($p<0.05$).

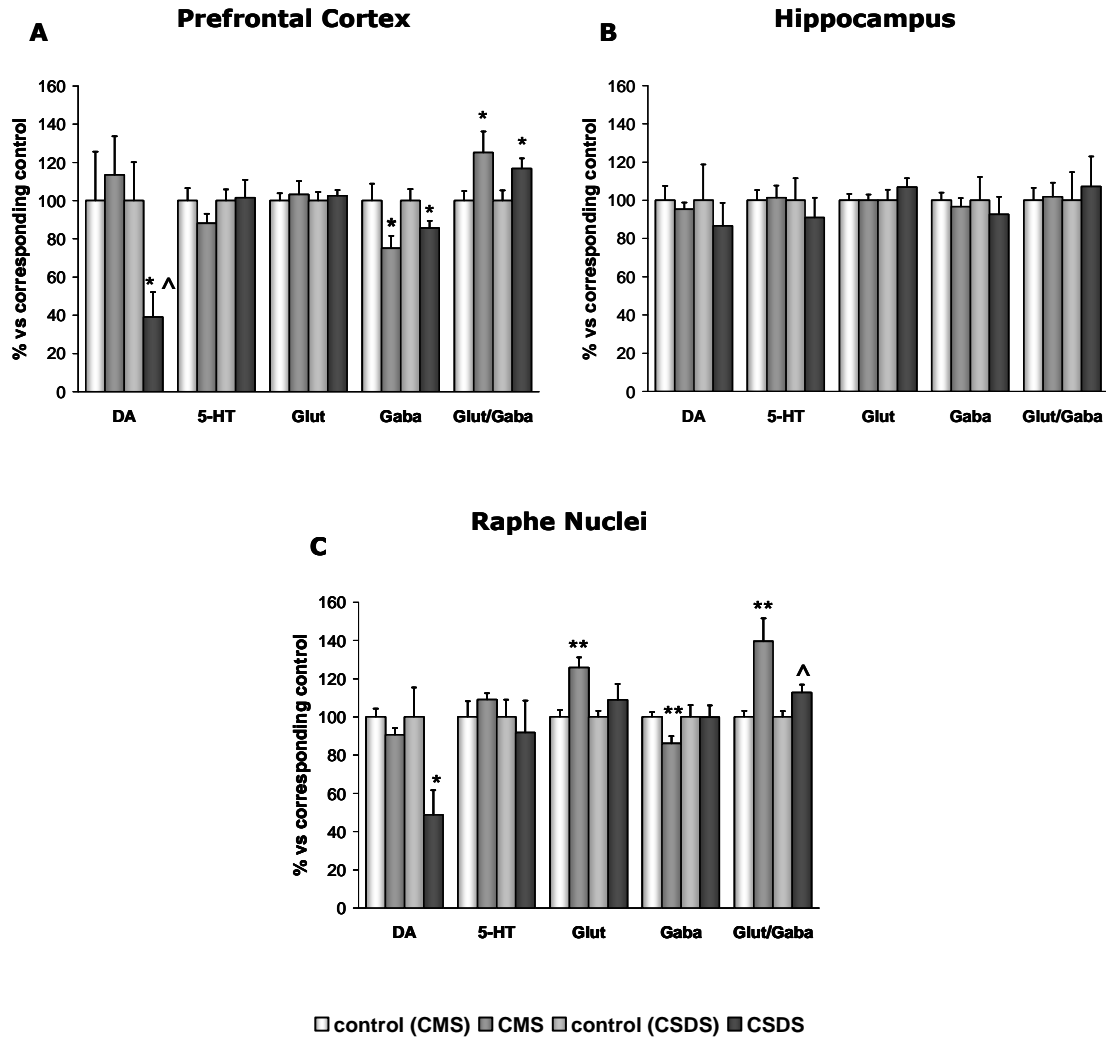


Figure 7. Effect of chronic mild stress and chronic social defeat stress on glutamate, GABA, 5-HT and dopamine levels in the prefrontal cortex (A), hippocampus (B) and raphe nuclei (C). Data show mean \pm SEM ($n=15$ mice/group) of the percentage versus control of dopamine (DA), serotonin (5-HT), glutamate (Glut) and GABA levels and excitatory/inhibitory index (glut/GABA) in the prefrontal cortex (A), hippocampus (B) and dorsal raphe nucleus (C) measured by HPLC (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control, ^ $p<0.05$ vs corresponding CMS).

4. DISCUSSION

These results show that environmental and social forms of chronic stress induce different behavioural and neurochemical profiles. Specifically, the environmental chronic mild stress (CMS) model induced anhedonia, helplessness and memory impairment. On the other hand, the chronic social defeat stress (CSDS) model induced anhedonia, anxiety, decreased sociability and hyperactivity. While both models induced an increase in the excitatory/inhibitory ratio in the prefrontal cortex, CMS altered importantly this balance in the brainstem. However, only CSDS decreased dopamine levels in the prefrontal cortex and brainstem. We suggest that these neurochemical differences may account for the observed different behavioural profiles of the two models. Moreover, the two models address distinct clinical aspects of depressive disorders.

Behaviour is differently affected by CMS and CSDS

Anhedonia, defined as a reduced ability to experience pleasure, is considered a core symptom of major depressive disorders according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM). In addition, anhedonia constitutes an important sign of other psychiatric disorders like schizophrenia as well as several other maladaptive behaviours (Andreasen and Olsen, 1982; Loas, 1996; Blanchard et al. 2001; Van Nimwegen, 2005; Velthorst et al. 2011). Yet, at the experimental level, anhedonia as a core sign of major depression has been extensively studied in different animal models by analysing reactivity to different rewards such as preference for sweet solutions or intracranial self-stimulation (Von Frijtag et al. 2002; Willner et al. 2005; Elizalde et al. 2008, García-García et al. 2009).

Both CMS and CSDS induced long-term anhedonia in mice measured as a decrease of the sucrose intake three weeks after the termination of the stress procedure. Yet, the two models showed a different latency time for the induction of this depressive behaviour. CMS induced a decrease in sucrose intake from the second week of the stress that was maintained after the cessation of stress, as previously shown (Elizalde et al. 2008; 2010). Conversely, the anhedonic effect of CSDS was only observed three weeks after the end of the procedure. Moreover, twenty-four hours after, sucrose intake index in

CSDS mice was even higher than in controls, which disagree with other studies reporting anhedonia just after the end of the defeats (Wilkinson et al. 2009; Krishnan et al. 2007). We suggest that while CSDS induces long-term anhedonia (VonFrijtag et al. 2002; Covington et al. 2009), it stimulates the rewarding system in the short-term (Miczek et al. 2008). Therefore, unlike the CMS model, our study suggests that the CSDS model could be used as model of depression only in the long term.

Helpless behaviour was evaluated using the forced-swimming test in which immobility reflects that the animals are resigned to their fate and have given up hope (Porsolt, 1977). While CMS induced long-term helpless behaviour measured one month after the stress procedure, as previously observed (Elizalde et al. 2008: 2010), no changes were detected in CSDS mice. Perhaps, the increased locomotor activity observed in mice exposed to CSDS, could contribute to the observed lack of differences. On the other hand, it should be acknowledged that control mice for both the CMS and CSDS models were housed individually for nine and six weeks and that this could constitute *per se* a model of social isolation inducing depressive-like behaviours (Wallace et al. 2009). Therefore social isolation in control mice could induce a ceiling effect for some behaviour in these models. For instance, the lack of effect of CSDS in helpless behaviour or of CMS on motor activity could be interpreted in this light.

Anxiety is a frequent comorbid feature of depression and therefore the presence of anxiety-like symptoms in chronically stressed mice is not surprising. Although previous studies have shown that CMS induces anxious behaviour in the short-term (Elizalde et al. 2008), no signs of anxiety were observed here one month after the stress procedure. On the other hand, CSDS mice showed a marked anxious profile in both tests in agreement with previous findings (Krishnan et al. 2007). Similarly, while no changes in social interaction were observed in CMS mice, we found a significant decrease in the time spent in the interaction zone in CSDS mice, a clear symptom of decreased sociability or social anxiety. These results agree with previous studies using this test and showing that socially defeated mice become persistently aversive toward social stimuli (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Krishnan et al. 2007; Lutter et al. 2008; Covington et al. 2009; Wilkinson et al. 2009; Lagace et al. 2010). Importantly, in these studies, the

reversal of CSDS-induced social avoidance by repeated antidepressant treatment have suggested that this behavioural pathology might be relevant to human depression (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Yan et al. 2010).

Lines of evidences suggest that impaired cognition is a core element of depression and that antidepressant therapy may improve the cognitive function (Austin et al. 1999, 2001; Levkovitz et al. 2002; Sheline et al. 2006; Bearden et al. 2006). Moreover, recent clinical studies have shown that different cognitive dysfunctions associated to major depression (including episodic memory) vary as a function of the depressive disorder (Airaksinen et al. 2004). We investigated whether CMS or/and CSDS would significantly impair memory performance in mice using novel object recognition (NOR) task. In rodents, discrimination of object familiarity has been shown to be dependent on normal function of the prefrontal cortex (PFC) (Meunier et al. 1997; Ragozzino et al. 2002; Akirav and Maroun 2006). It was clearly demonstrated that CMS indeed impaired short-term and long-term episodic memory performance one month after the termination of the stress, as previously reported (Elizalde et al. 2008). On the other hand, in mice exposed to CSDS no changes were observed in recognition memory.

CMS and CSDS induce distinct neurochemical changes

Neurochemical changes associated with chronic stress have been extensively studied in neuronal circuits classically associated to major depression such as the prefrontal cortex (PFC), hippocampus and the raphe nuclei (Miczek et al. 2008).

In the prefrontal cortex, a decrease of GABA was observed in both the CMS and the CSDS models leading to an increase in the excitatory-inhibitory (glutamate/GABA) ratio. Decreased levels of GABA have been already shown in CMS (Shalaby and Kamal, 2009) or social isolation (Pibiri et al. 2008; Bortolato et al. 2011). Interestingly, clinical studies have also shown that this imbalance is associated with anhedonia in patients (Sanacora et al. 2004; Gabbay, 2012) and is normalised by chronic antidepressant treatment (Sanacora et al. 2002). Moreover, an excess of activity in the prefrontal cortex has been correlated with the severity of anhedonia in depressed patients (Gorwood, 2008).

On the other hand, the brain reward system consists of extensive neural pathways that are served primarily, although not exclusively, by the chemical neurotransmitter dopamine (Howland, 2012). These pathways may be involved in the development of anhedonia in major depression (Kranz et al. 2010). Thus, the decrease in dopamine levels observed in the prefrontal cortex and dorsal raphe nucleus of CSDS mice could also contribute to the development of long-term anhedonia (Miczek et al. 2011). Moreover, decreased cortical dopamine levels have linked to hyperactivity (Watt et al. 2009) and anxiety (Biggio et al. 1990; Broersen et al. 1995). In addition, our results agree with previous studies reporting a decrease cortical dopamine after social defeat in the long term (Watt y col., 2009). Matching with our study, a dopamine hypofunction in the prefrontal cortex has been reported in different social anxiety disorders (Richard et al. 1996; Heydari and Le Mellédo, 2002).

The raphe nucleus is the primary 5-HT source to the forebrain and a dysfunction of this system has been traditionally linked to major depression (Michelsen et al. 2008; Lowry et al. 2008). In our studies, we observed that 5-HT levels were not significantly affected by stress in the brain stem. However, CMS induced a long-term increase in the excitatory glutamate and a decrease in the inhibitory GABA amino acids leading to an increase of the excitatory-inhibitory ratio. Among the mechanism that mediate 5-HT neuron control, the prefrontal cortex (PFC) raphe pathway is reported to be one of the key neuroanatomical substrates in controlling the impact of high levels of stress in the raphe (Amat et al. 2005). Specifically, glutamatergic descending pathways from the PFC modulate 5-HT activity in the dorsal raphe nucleus (DRN) by synapsing directly into 5-HT cell bodies (Celada et al. 2001) or acting indirectly through GABAergic interneurons to inhibit 5-HT release (Hajós et al. 1998; Varga et al. 2001; Tao and Auerbach, 2003). Moreover, caudal DRN 5-HT activation has been shown to mediate learned helplessness in rodents (Maier and Watkins, 2005; Amat et al. 2005; Hammack et al. 2012). Thus, the development of long-lasting helplessness in CMS mice could be related to an enhanced excitatory glutamate control over the ascending 5-HT activity. A previous study has evidenced that swim stress elevates glutamate release in the DRN from afferents synapsing on 5-HT neurons, potentially enhancing its excitability (Kirby et al. 2007). Moreover, immunohistochemical studies have shown that CMS induces an over-activation

of 5-HT cells in the DRN (Elizalde et al. 2010). Similarly, a poor aminoacid cortical control over the 5-HT function could also affect recognition memory in CMS mice (Lieben et al. 2006; King et al. 2009).

Yet, serotonin, which is highly suggested as one main neurotransmitter implicated in major depression (Michelsen et al., 2008; Lowry et al., 2008), was not altered in any of the brain regions studied for both models. However, it should be acknowledged that this hypothesis is mainly based on the well known clinical effect of selective serotonin reuptake inhibitors (Schildkraut et al., 1965; Manji et al., 2001). Conversely, 5-HT levels in animal stress models (Gronli et al., 2007) or the main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the cerebrospinal fluid of depressed patients are unchanged (Roy et al 1991; Geraciotti et al 1997; Placidi et al., 2001).

Taken together, these studies show clearly the two models induce distinct behavioural and neurochemical profiles in mice. CMS induces a depressive-like profile including anhedonia, helplessness and memory impairment. However, CSDS could be modeling clinical aspects of different disorders such as depression, social anxiety and/or post-traumatic stress disorder. We suggests that while depressive-like behaviours might be associated to altered aminoacid neurotransmission in cortical and brain stem areas, CSDS induced anxiety behaviours might be linked to specific alteration of dopaminergic pathways involved in rewarding processes.

Acknowledgements

We are very grateful to Ms Sandra Lizaso and Ms Mari Luz Muro for her excellent technical assistance. This work was supported by Laboratories Servier S.L., the Ministry of Science and Innovation (SAF2008-02217, Spanish Government and SAF2011-27910) and a fellowship from the Spanish Government (Department of Education) to N. Elizalde.

References

- Akirav I, Maroun M (2006) Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex*. 16, 1759-65
- Allen NB, Badcock PB (2003) The social risk hypothesis of depressed mood: evolutionary, psychosocial, and neurobiological perspectives. *Psychol Bull*. 129, 887-913
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci*. 8, 365-71
- Andreasen NC, Olsen S (1982) Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry*. 39, 789-94
- Airaksinen E, Larsson M, Lundberg I, Forsell Y (2004) Cognitive functions in depressive disorders: evidence from a population-based study. *Psychol Med*. 34, 83-91
- Austin MP, Mitchell P, Wilhelm K, Parker G, Hickie I, Brodaty H, Chan J, Eysers K, Milic M, Hadzi-Pavlovic D (1999) Cognitive function in depression: a distinct pattern of frontal impairment in melancholia? *Psychol Med*. 29, 73-85
- Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (2001) Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. *Br J Psychiatry*. 178, 200-6
- Bearden CE, Glahn DC, Monkul ES, Barrett J, Najt P, Villarreal V, Soares JC (2006). Patterns of memory impairment in bipolar disorder and unipolar major depression. *Psychiatry Res*. 142, 139-50
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*. 311, 864-8
- Biggio G, Concas A, Corda MG, Giorgi O, Sanna E, Serra M (1990) GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol Ther*. 48, 121-42
- Bjorkqvist K (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav*. 73, 435-42

- Blanchard JJ, Horan WP, Brown SA (2001) Diagnostic differences in social anhedonia: a longitudinal study of schizophrenia and major depressive disorder. *J Abnorm Psychol.* 110, 363-71.
- Bortolato M, Devoto P, Roncada P, Frau R, Flore G, Saba P, Pistritto G, Soggiu A, Pisanu S, Zappala A, Ristaldi MS, Tattoli M, Cuomo V, Marrosu F, Barbaccia ML (2011) Isolation rearing-induced reduction of brain 5 α -reductase expression: relevance to dopaminergic impairments. *Neuropharmacology.* 60, 1301-8
- Broersen LM, Heinsbroek RP, de Bruin JP, Laan JB, Joosten RN, Olivier B (1995) Local pharmacological manipulations of prefrontal dopamine affect conflict behaviour in rats. *Behav Pharmacol.* 6, 395-404
- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci.* 21, 9917-29
- Collimore KC, Carleton RN, Hofmann SG, Asmundson GJ (2010) Posttraumatic stress and social anxiety: the interaction of traumatic events and interpersonal fears. *Depress. Anxiety.* 27, 1017-26
- Covington HE 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty S.J., Nestler EJ (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci.* 29, 11451-60
- Denmark A, Tien D, Wong K, Chung A, Cachat J, Goodspeed J, Grimes C, Elegante M, Suci C, Elkhayat S, Bartels B, Jackson A, Rosenberg M, Chung KM, Badani H, Kadri F, Roy S, Tan J, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I, Gilder T, Kalueff AV, (2010) The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behav Brain Res* 208, 553-9
- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM, (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment *Psychopharmacology* 199, 1-14

- Elizalde N, García-García AL, Totterdell S, Gendive N, Venzala E, Ramirez MJ, Del Rio J, Tordera RM (2010) Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. *Psychopharmacology*. 210, 393-406
- Friedman MJ, Resick PA, Bryant RA, Strain J, Horowitz M, Spiegel D (2011) Classification of trauma and stressor-related disorders in DSM-5. *Depress Anxiety*. 28, 737-49
- Gabbay V, Mao X, Klein RG, Ely BA, Babb JS, Panzer AM, Alonso CM, Shungu DC (2012) Anterior cingulate cortex γ -aminobutyric acid in depressed adolescents: relationship to anhedonia. *Arch Gen Psychiatry*. 69: 139-49.
- Garcia-Alloza M, Tsang SW, Gil-Bea FJ, Francis PT, Lai MK, Marcos B, Chen CP, Ramirez MJ (2005) Involvement of the GABAergic system in depressive symptoms of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 27, 1110–1117
- Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Matrov D, Harro J, Wojcik SM, Venzala E, Ramírez MJ, Del Rio J, Tordera RM (2009) Increased vulnerability to depressive-like behavior of mice with decreased expression of VGLUT1. *Biol Psychiatry*. 66, 275-82
- Geraciotti TD Jr, Loosen PT, Ekhaton NN, Schmidt D, Chambliss B, Baker DG, Kasckow JW, Richtand NM, Keck PE Jr, Ebert MH (1997) Uncoupling of serotonergic and noradrenergic systems in depression: preliminary evidence from continuous cerebrospinal fluid sampling. *Depress Anxiety*. 6, 89-94
- Gorwood P (2008) Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin Neurosci*. 10, 291-9
- Gronli J, Fiske E, Murison R, Bjorvatn B, Sorensen E, Ursin R, Portas CM (2007) Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats A microdialysis study in an animal model of depression. *Behav Brain Res*. 181, 42-51
- Gross C, Santarelli L, Brunner D, Zhuang X, Hen R (2000) Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biol Psychiatry*. 48, 1157-63
- Hajós M, Richards CD, Székely AD, Sharp T (1998) An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience*. 87, 95-108

- Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR (2012) Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: implications for PTSD and mood disorders. *Neuropharmacology*. 62, 565-75
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol*. 1, 293-319
- Heydari B, Le Mellédo JM (2002) Low pregnenolone sulphate plasma concentrations in patients with generalized social phobia. *Psychol Med*. 32, 929-33
- Howland RH (2012) The use of dopaminergic and stimulant drugs for the treatment of depression. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*. 50, 11-4
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) The assessment of dependence in the study of stressful life events: validation using a twin design. *Psychol Med*. 29,1455-60
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001) Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 158, 582-6
- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol*. 48, 191-214
- King MV, Spicer CH, Sleight AJ, Marsden CA, Fone KC (2009) Impact of regional 5-HT depletion on the cognitive enhancing effects of a typical 5-HT(6) receptor antagonist, Ro 04-6790, in the Novel Object Discrimination task. *Psychopharmacology*. 202, 111-23
- Kirby LG, Pan YZ, Freeman-Daniels E, Rani S, Nunan JD, Akanwa A, Beck SG (2007) Cellular effects of swim stress in the dorsal raphe nucleus. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 712-23
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl*. 640, 69-72
- Kranz GS, Kasper S, Lanzenberger R (2010) Reward and the serotonergic system. *Neuroscience*. 166, 1023-35

- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 131, 391-404
- Krishnan V, Berton O, Nestler E (2008) The use of animal models in psychiatric research and treatment. *Am J Psychiatry*. 165, 1109
- Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, Nestler EJ, Krishnan V, Eisch AJ (2010) Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107, 4436-41
- Lagerspetz K, Tirri R (1961) The induction of physiological tolerance to promazine in mice. *Ann Med Exp Bio I Fenn. Suppl* 5, 1-24
- Levkovitz Y, Caftori R, Avital A, Richter-Levin G (2002) The SSRIs drug Fluoxetine, but not the noradrenergic tricyclic drug Desipramine, improves memory performance during acute major depression. *Brain Res Bull*. 58, 345-50
- Lieben CK, Steinbusch HW, Blokland A (2006) 5,7-DHT lesion of the dorsal raphe nuclei impairs object recognition but not affective behavior and corticosterone response to stressor in the rat. *Behav Brain Res*. 168,197-207
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92,180-5
- Loas G (1996) Vulnerability to depression: a model centered on anhedonia. *J Affect Disord*. 41, 39-53
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. 1148, 86-94
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM (2008) The orexigenic

- hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci.* 11, 752-3
- Maier SF, Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 829-41
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med.* 7, 541-7
- Mazure CM, Bruce ML, Maciejewski PK, Jacobs SC (2000) Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response. *Am J Psychiatry.* 157, 896-903
- Meunier M, Bachevalier J, Mishkin M (1997) Effects of orbital frontal and anterior cingulate lesions on object and spatial memory in rhesus monkeys. *Neuropsychologia.* 35, 999-1015
- Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HW (2008) The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 172, 233-64
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE 3rd (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.* 120, 102-28
- Miczek KA, Nikulina EM, Shimamoto A, Covington HE 3rd (2011) Escalated or suppressed cocaine reward, tegmental BDNF, and accumbal dopamine caused by episodic versus continuous social stress in rats. *J Neurosci.* 31, 9848-57
- Monroe SM, Torres LD, Guillaumot J, Harkness KL, Roberts JE, Frank E, Kupfer D (2006) Life stress and the long-term treatment course of recurrent depression: III Nonsevere life events predict recurrence for medicated patients over 3 years. *J Consult Clin Psycho.* 74,112-20
- Perez-Otaño I, Herrero MT, Oset C, De Ceballos ML, Luquin MR, Obeso JA, Del Rio J (1991) Extensive loss of brain dopamine and serotonin induced by chronic administration of MPTP in the marmoset. *Brain Res.* 567, 127-132

- Pibiri F, Nelson M, Guidotti A, Costa E, Pinna G (2008) Decreased corticolimbic allopregnanolone expression during social isolation enhances contextual fear: A model relevant for posttraumatic stress disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 5567-72
- Placidi GP, Oquendo MA, Malone KM, Huang YY, Ellis SP, Mann JJ (2001) Aggressivity, suicide attempts, and depression: relationship to cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels. *Biol Psychiatry*. 50, 783-91
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266, 730-2
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 33: 88-109
- Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (2002) The effects of prelimbic and infralimbic lesions on working memory for visual objects in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 77, 29-43
- Richard IH, Schiffer RB, Kurlan R (1996) Anxiety and Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 8, 383-92
- Rohde P (2001) The relevance of hierarchies, territories, defeat for depression in humans: hypotheses and clinical predictions. *J Affect Disord*. 65, 221-30
- Roy A, DeJong J, Lamparski D, George T, Linnoila M (1991) Depression among alcoholics: Relationship to clinical and cerebrospinal fluid variables. *Arch Gen Psychiatry*. 48, 428-432
- Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G, Usiello A, Centonze D (2008) Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci*. 28, 7284-92
- Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH (2002) Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiatry*. 159, 663-5
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 61, 705-13

- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry.* 122, 509-522
- Shalaby A, Kamal S (2009) Effect of Escitalopram on GABA level and anti-oxidant markers in prefrontal cortex and nucleus accumbens of chronic mild stress-exposed albino rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 1, 154-161
- Sheline YI, Barch DM, Garcia K, Gersing K, Pieper C, Welsh-Bohmer K, Steffens DC, Doraiswamy PM (2006) Cognitive function in late life depression: relationships to depression severity, cerebrovascular risk factors and processing speed. *Biol Psychiatry.* 60, 58-65
- Tao R, Auerbach SB (2003) Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. *Brain Res.* 961, 109-20
- Tordera RM, Garcia-García AL, Elizalde N, Segura V, Aso E, Venzala E, Ramírez MJ, Del Rio J (2011) Chronic stress and impaired glutamate function elicit a depressive-like phenotype and common changes in gene expression in the mouse frontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol.* 21, 23-32
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci.* 9, 519-25
- Van Nimwegen L, de Haan L, Van Beveren N, Van den Brink W, Linszen D (2005) Adolescence, schizophrenia and drug abuse: a window of vulnerability. *Acta Psychiatr Scand. Suppl* 427, 35-42
- Varga V, Székely AD, Csillag A, Sharp T, Hajós M (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurons. *Neuroscience.* 106, 783-92
- Velthorst E, Nieman DH, Veling W, Klaassen RM, Dragt S, Rietdijk J, Ising H, Wunderink L, Linszen DH, de Haan L, van der Gaag M (2011) Ethnicity and baseline symptomatology in patients with an At Risk Mental State for psychosis. *Psychol Med.* 11, 1-10

- Vieira DS, Naffah-Mazacoratti MG, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Faulhaber MH, Cavaleiro EA, Peres MF (2006) Cerebrospinal fluid GABA levels in chronic migraine with and without depression. *Brain Res.* 1090:197-201
- Von Frijtag JC, Van den Bos R, Spruijt BM (2002) Imipramine restores the long-term impairment of appetitive behavior in socially stressed rats. *Psychopharmacology.* 162, 232-8
- Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, Cao JL, Kirk A, Chakravarty S, Kumar A, Krishnan V, Neve RL, Cooper DC, Bolaños CA, Barrot M, McClung CA, Nestler EJ (2009) CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci.* 12, 200-9
- Wagner KV, Wang XD, Liebl C, Scharf SH, Müller MB, Schmidt MV (2011) Pituitary glucocorticoid receptor deletion reduces vulnerability to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology.* 36,579-87
- Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL (2009) Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav Neurosci.* 123, 564-76
- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthall W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ (2009) Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci.* 29, 7820-32
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 52,90-110
- Yan HC, Qu HD, Sun LR, Li SJ, Cao X, Fang YY, Jie W, Bean JC, Wu WK, Zhu XH, Gao TM (2010) Fuzi polysaccharide-1 produces antidepressant-like effects in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13, 623-33

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action and interaction with biological risk factors

Psychopharmacology, 2012, published

Resumen

Justificación. El estrés crónico de derrota social (CSDS) ha sido propuesto como un modelo de depresión. Sin embargo, la mayoría de los estudios de CSDS se basan sólo en el análisis de la evitación social inducida por estrés. Por otra parte, la validez predictiva del modelo ha sido poco analizada y mucho menos su interacción con factores de riesgo biológicos.

Objetivos. En este trabajo hemos explorado la validez del CSDS como modelo de depresión. Además, se ha estudiado el efecto de la disminución de transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) como factor potencial para el aumento de fenotipo depresivo.

Métodos. Los ratones fueron expuestos a CSDS (10 días), seguido de un tratamiento con solución salina, venlafaxina, fluoxetina o tianeptina (30 días). Se realizó una batería de test conductuales para medir la actividad motora, la memoria, la ansiedad, la interacción social, la desesperación conductual y el comportamiento anhedónico. Además, se estudiaron las alteraciones conductuales del CSDS sobre ratones heterocigotos VGLUT1 (VGLUT1 +/-), así como la regulación de ARNm de VGLUT1.

Resultados. CSDS indujo anhedonia, desesperación conductual, hiperactividad, ansiedad, evitación social y miedo, así como disminución del ARNm de VGLUT1 en la amígdala. El tratamiento crónico con venlafaxina mostró actividad antidepresiva, y la venlafaxina y la tianeptina se comportaron como ansiolíticos eficaces. La evitación social inducida por CSDS fue revertida por la tianeptina. La fluoxetina no fue capaz de revertir la mayoría de las alteraciones conductuales. Ratones VGLUT1 +/- mostraron una mayor vulnerabilidad a la evitación social inducida por estrés.

Conclusión. Sugerimos que CSDS no es un modelo puro de depresión. De hecho, aborda aspectos más relevantes de trastornos de ansiedad. En primer lugar, la anhedonia y la evitación social inducida por CSDS no se asocian en este modelo. Además, CSDS podría estar afectando principalmente a áreas del cerebro involucradas en el procesamiento de la conducta social, como la amígdala, donde los mecanismos glutamatérgicos podrían desempeñar un papel clave.

Abstract

Rationale. Chronic social defeat stress (CSDS) has been proposed as a model of depression. However, most CSDS studies rely only on analysis of stress-induced social avoidance. Moreover, the predictive validity of the model has been poorly analyzed let alone its interaction with biological risk factors.

Objectives. Here, we explore the validity of CSDS as a depression model. Further, the effect of decreased vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1), as a potential factor enhancing a depressive-like phenotype, was studied.

Methods. Mice were exposed to CSDS (10 days) followed by saline, venlafaxine, fluoxetine or tianeptine treatment (30 days). The battery of behaviors included motor activity, memory, anxiety, social interaction, helplessness and anhedonic-like behaviour. Moreover, the behavioral effect of CSDS in VGLUT1 heterozygous (VGLUT1+/-) mice was studied as well as the regulation of VGLUT1 mRNA.

Results. CSDS induced anhedonia, helplessness, hyperactivity, anxiety, social avoidance and freezing as well as downregulation of VGLUT1 mRNA in amygdale. Repeated venlafaxine showed antidepressant-like activity and both venlafaxine and tianeptine behaved as effective anxiolytics CSDS-induced social avoidance was reverted by tianeptine. However, fluoxetine failed to revert most of the behavioral alterations VGLUT1+/- mice showed an enhanced vulnerability to stress-induced social avoidance.

Conclusion. We suggest that CSDS is not a pure model of depression. Indeed it addresses relevant aspects of anxiety-related disorders. Firstly, CSDS induced anhedonia and social avoidance behaviours are not associated in this model. Moreover, CSDS might be affecting brain areas mainly involved in the processing of social behavior, such as the amygdale, where glutamatergic mechanism could play a key role.

Keywords: chronic social defeat stress, depression, anxiety, social interaction, antidepressant, VGLUT1

1. INTRODUCTION

Major depression has been often described as a stress-related disorder since there is good evidence that both onset and relapse of depressive disorders can be precipitated by repeated stress or severe stressful experiences (Kessler, 1997; Kendler et al. 1999; 2001; Monroe et al. 2006; Hammen, 2005; Mazure et al. 2000). In addition, some biological risk factors could potentiate stress consequences, enhancing vulnerability to depression (Kendler et al. 1998; Hicks et al. 2009; Molteni et al. 2009).

Over the last decades, mouse specific models have been developed in an attempt to mimic some of the environmental or biological factors contributing to the induction of depressive disorders in humans. Among them, the chronic mild stress (CMS) model reproduces core clinical symptoms such as long-lasting anhedonia and helplessness (Elizalde et al. 2008) and has demonstrated a good predictive validity as a model of depression (Willner 2005; Elizalde et al. 2008; Tordera et al. 2011). Moreover, it interacts negatively with some biological factors (Garcia-García et al. 2009; Froger et al. 2004). Among them, recent clinical (Uezato et al. 2009) and preclinical studies (Tordera et al. 2007 and García-García et al. 2009) have linked decreased levels of the synaptic vesicle protein (SVP) vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) to depressive like behavior. Specifically, studies with the VGLUT1 heterozygous mice (VGLUT1+/-) show that decreased VGLUT1 levels affects glutamate transmission (Balschun et al. 2010) and increases vulnerability to depressive-like behavior after chronic mild stress (Garcia-Garcia et al. 2009).

Nevertheless, in recent years, models based on social conflict have been proposed to have clear advantages over environmental models because they involve a social form of stress, which may be relevant to stress-induced psychopathology in humans (Krishnan et al. 2008). For instance, the chronic social defeat stress (CSDS) model is based in the induction of "social subordination" caused by short periods of struggle and continued fellowship with a dominant animal. A number of hierarchical relations studies show that animals that have been "subordinated" by the dominant individuals of the same species suffer signs of stress (Lagerspetz and Tirri 1961, Koolhaas et al. 1997) including social avoidance, anxiety, decreased grooming, hyperactivity and increased vulnerability to

addiction (Krishnan et al. 2007, Rossi et al. 2008, Denmark et al. 2010). Moreover, significant changes in brain function, physiology, neurotransmitters and hormone levels have been reported (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001, Berton et al. 2006, Lutter et al. 2008, Wagner et al. 2011).

Importantly, defeat-induced social avoidance in mice can persist for weeks or even months and its reversal by repeated antidepressant treatment with the tricyclic imipramine and the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine suggests that this behavioral pathology may be relevant to human depression (Yan et al. 2010; Berton et al. 2006). However, it should be acknowledged that social avoidance is a psychiatric phenomenon common to various disorders in humans, such as general anxiety, social phobia and post-traumatic stress disorder (Berton et al. 2006). On the other hand, to our knowledge, only one study has examined the long-term effects of CSDS in behaviors more closely related to depression such as reactivity to rewards or helpless behavior (Krishnan et al. 2007) and yet, no studies have analyzed the reversible action of a course of antidepressant treatment. Moreover, until now, potential biological markers of enhanced vulnerability to depressive-like phenotype have not been studied in this animal model. Thus, further work is needed to more completely characterize the clinical relevance of the social defeat protocol.

Here, we have further explored the validity of the CSDS model in the long-term as a model of depression. Firstly, we have studied the long-term behavioral effects of individual housing, CSDS and chronic treatment with antidepressants. Secondly, we have investigated whether CSDS interacts negatively with decreased VGLUT1 levels, previously reported as a biological marker of increased vulnerability to depressive like behavior after chronic stress (García-García et al. 2009).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals and drug treatment

For the first experiment, male C57BL/6 mice (Harlan, France, 8-10 weeks of age) were used. For the second, heterozygous VGLUT1 male mice (VGLUT1+/-) and wild-type littermates (WT) (8-10 weeks of age) were bred in the animal house of the University of Navarra from heterozygous fathers (Dr. S. Wojcik, Gottingen, Germany) and wild type (WT) mothers (Harlan, France). Generations beyond the tenth (F10) of backcrossing with C57BL/6 mice were used. Animals were maintained in a temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity-controlled room ($55 \pm 2\%$) on a 12 h light-dark cycle (lights on at 08:00 h).

Fluoxetine HCl 10 mg/kg i.p. (Interchim, Montluçon, France), venlafaxine HCl 20 mg/kg i.p. and tianeptine sodium 10 mg/kg i.p. (kindly donated by Servier SL, Paris, France) were dissolved in saline (0.9 %) and administered once daily i.p. (at 1 p.m). Doses were corrected to mg free base/kg. Despite the different half-life of the drugs used, a single daily dose was selected in order to reduce to a minimum the stress of the injection in control mice. At these doses, fluoxetine has shown to effectively counteract the effects of social defeat stress in mice (Berton et al. 2006, Rygula et al. 2006a,b) and both venlafaxine and tianeptine show antidepressant-like action in the forced swimming test (Berrocoso et al. 2004, Svenningsson et al. 2008). Moreover, though tianeptine is usually administered two or three times daily to patients given its short half-life, chronic studies in mice suggests that it is effective when administered once daily (Svenningsson et al. 2008).

Experimental procedures and animal husbandry were conducted according to the principles of laboratory animal care as detailed in the European Communities Council Directive (2003/65/EC) and approved by the Ethical Committee of University of Navarra.

2.2. Experimental design

In the first experiment (**Figure 1**), we studied the long-term effects of individual housing *per se* and chronic social defeat stress (CSDS) as well as repeated antidepressant

treatments on different behaviors. CSDS was applied for 10 days and during this time CSDS mice (n=72 mice) were housed individually in cages with two compartments separated by a metallic mesh being a dominant mouse the partner. During this time, control mice (singly group) (n = 72), were singly housed in similar cages with a mouse of the same strain in the other half of the cage. Twenty-four hours after the last session both control and CSDS mice were housed in individual cages. Moreover, an extra group of saline treated mice (n = 18) remained group-housed (6 mice per cage) all the time as a naive control (grouped group). Mice (n= 18 mice/group) received daily (i.p.) injections of antidepressants (fluoxetine, venlafaxine or tianeptine) or saline during the following 30 days. Mice were killed 21-24 h after the last drug injection, the brains removed and kept at -80 °C for neurochemical studies.

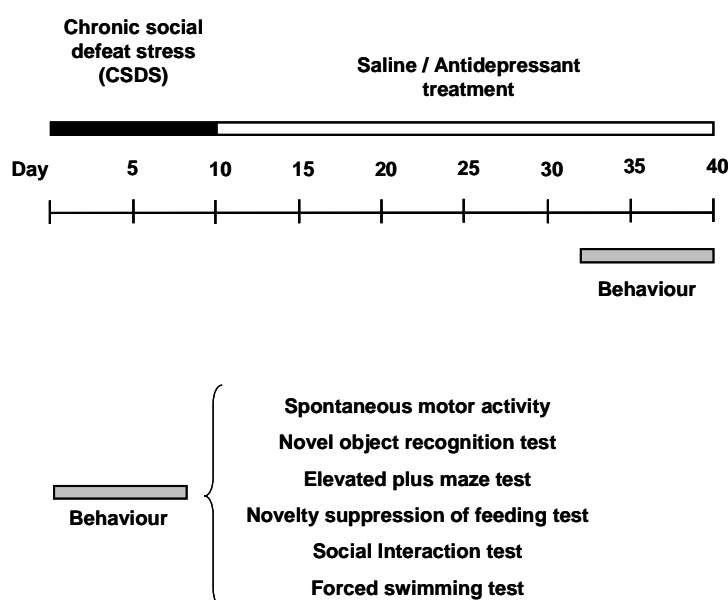


Figure 1. Experimental design of CSDS paradigm, antidepressant treatment and behavioural tests.

In the second experiment, the effect of CSDS in VGLUT1+/- mice (n=18 mice/group) and WT littermates (n=18/group) was studied. In both experiments, a battery of behavioral test was applied on the fourth week.

Tests were performed in the following order: spontaneous motor activity (day 1), novel object recognition (days 2 and 3), tests of anxiety (novelty suppression feeding and elevated plus-maze) (days 5 and 6), social interaction test (day 7), and test of depression

(forced swimming test, FST) (day 9). Tests were performed from 9:00-1:00 p.m. 21-24 h after the last drug injection.

In addition, anhedonic-like behavior was evaluated by monitoring of sucrose intake every 10 days (Elizalde et al. 2008).

2.3. Chronic social defeat stress procedure

Chronic social defeat stress (CSDS) procedure was carried out using Tsankova et al., (2006) protocol with minor modifications. Briefly, experimental mice were submitted to social defeat stress for 10 consecutive days. Every day, each mouse was introduced into the home cage of an unfamiliar resident. Resident mice were CD1 retired breeders selected for their attack latencies reliably shorter than 30 s upon three consecutive screening tests. Once the experimental mouse had been physically defeated by 3 attacks, both animals (defeated and aggressor) were maintained in sensory contact for 24 hours using a metallic mesh dividing the resident home cage in two halves. During the 10 days control mice were individually housed in equivalent cages but with a member of the same strain in the other half of the cage.

2.4. Sucrose intake test

Anhedonic-like behavior was evaluated by monitoring of sucrose intake (Elizalde et al. 2008). Every 10 days, mice were given a 15-h exposure to the sucrose solution (2.5%) and tap water from 6:00 p.m. until 09:00 h a.m. and during this test no stressors were applied. The position of the 2 bottles (right/left) was varied randomly from trial to trial. Body weight measurements were taken weekly and relative sucrose intake was calculated as absolute intake (g) per weight.

2.5. Behavioral Tests

Spontaneous locomotor activity

Locomotor activity was measured in an open field consisting of 9 black square boxes with light gray floor (43 x 50 x 45) using a video tracking system (Ethovision XT

5.0, Noldus Information Technology B. V., Wageningen, The Netherlands) in a softly illuminated experimental room. One mouse was placed in each cage and distance traveled (cm) and speed was recorded at 10 min intervals during a 30 min period.

Novel Object Recognition

Visual recognition memory was assessed with this test (Elizalde et al. 2008). On day 1, mice were individually placed for 30 min in the empty box to habituate them. On day 2, two identical objects were placed symmetrically and the mouse was video recorded for 5 min (sample phase). After a delay of 1 h or 24 h the mouse was placed back in the box and exposed to the familiar object and to a novel object a further 5 min. The total time spent exploring each of the two objects in the sample and retention phases were measured (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module). Percentage of exploration of the new object compared to the total exploration time in the retention test was calculated.

Elevated-Plus Maze

The elevated-plus maze (EPM) consisted of two open arms (30 × 5 cm), two enclosed arms (30 × 5 cm) and a central platform (5 × 5 cm) elevated 38.5 cm above the ground in a softly illuminated room (50 lux). During a 5-min session, percentage time in the open and central arms and number of head dips over the edge of open arms were calculated (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module).

Novelty suppression of feeding

Animals were food deprived for 24 hours before testing. The animals were then provided with food in a novel environment consisting of a transparent plastic open field (45 × 45 × 45 cm) with a pellet of food placed in the middle of the open field. The mice were placed into the periphery of the open field and during a 5 min period, the latency to approach to the food and the total amount of time feeding were scored (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module).

Social interaction test

This test measured the approach-avoidance behavior towards an unfamiliar social target (Tsankova et al. 2006). The arena is a transparent plastic open field (45 x 45 x 45 cm) maintained in a very softly illuminated room (50 lux). Each experimental mouse was introduced into the open field and its trajectory was tracked for two consecutive sessions of 2.5 min. During the second session ("target"), a social target animal (an unfamiliar dominant CD1 male mouse or a mouse from the same strain) had been introduced into a metallic mesh cage (10.5 x 9 cm) located at one end of the field. The time that the experimental mouse spent in the "interaction zone" (7 cm wide corridor surrounding the little metallic cage) both in the "no target" and "target" conditions were recorded (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module).

Forced Swimming Test

Mice were placed individually for 6 min into glass cylinders (height 24 cm, diameter 13 cm) containing 14 cm of water, maintained at 22–23°C. The duration of immobility was recorded during the last 4 min of the 6 min testing period (Ethovision XT).

2.6. *In situ* hybridization studies

Coronal brain sections (14 µm thick) were serially cut with a cryostat and prepared for *in situ* hybridisation (Elizalde et al. 2010). Briefly, the oligonucleotide 5'-CGGGGGCCTCGGAGGCTGC-ACTGTGCTGTGTGGCCCCGTAGGA-3' (Sigma Genosis, Haverhill, UK) complementary to the VGLUT1 mouse gene was 3'-tail labelled with [³⁵S]dATP, specific activity > 1000 Ci/mmol (GE Healthcare Biosciences, Alcobendas, Spain), using terminal deoxynucleotide transferase (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA). The sections were incubated overnight in humid chambers with 200 µL hybridization buffer containing 1 × 10⁶ cpm of the ³⁵S-ATP labeled antisense. After incubation, slices were washed, air-dried, and exposed to Biomax MR film (Kodak, Rochester, NY, USA) for 3 days.

The relative abundance of mRNA in each region was determined by densitometric quantification of autoradiograms using an image analysis system (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD, USA) correcting for non-specific signals.

2.7. Statistical analysis

In the first experiment, we firstly aimed to study possible altered behaviours induced by individual housing *per se*, compared to those induced only by the CSDS model which includes individual housing plus social defeat. In order to do that CSDS mice, individual housed control mice and control grouped mice were compared in the different behavioural paradigms (Figures 2 and 3). Secondly, we studied the effect of antidepressant treatment on CSDS in the different behavioural paradigms (Figures 4 and 5).

The effect of individual housing and CSDS on weight gain and sucrose intake was analyzed using two-way ANOVA being time the within-subjects factor and housing conditions the between-subjects factor. A three-way ANOVA, being stress and treatment or stress and genotype the between subjects factors and time the within-subjects factor, was applied to study the effect of antidepressant treatment and genotype on weight gain and sucrose intake. Individual measures for each time point were compared among the groups using one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

The effect of individual housing and CSDS on different behavioral parameters was compared using one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. The effect of antidepressant treatment or genotype and CSDS was analyzed using two-way ANOVA (stress, treatment or stress, genotype). Significant interactions were followed by Tukey *post hoc* test.

VGLUT1 mRNA expression in different brain regions were analyzed using a Student *t*-test.

3. RESULTS

3.1. Long-term behavioral changes induced by individual housing and CSDS

Body weight. As expected, weight gain increased gradually across the 10 days time blocks, and differences among the groups were shown ($F_{2, 51} = 16.551$, $n=18$, $p<0.001$). Body weight was affected by defeat stress on day 10 of the CSDS procedure ($F_{1, 51} = 26.808$, $n=18$, $p<0.01$). Mice exposed to CSDS, did not gain weight during the CSDS procedure compared to both singly and grouped housed mice ($p < 0.01$) (**Figure 2A**).

Motor activity. Differences among the groups in motor activity were revealed ($F_{2, 51} = 6.229$, $n=18$, $p<0.01$). Specifically, defeated mice showed hyperactivity compared to both singly and grouped housed mice ($p<0.05$) (**Figure 2B**).

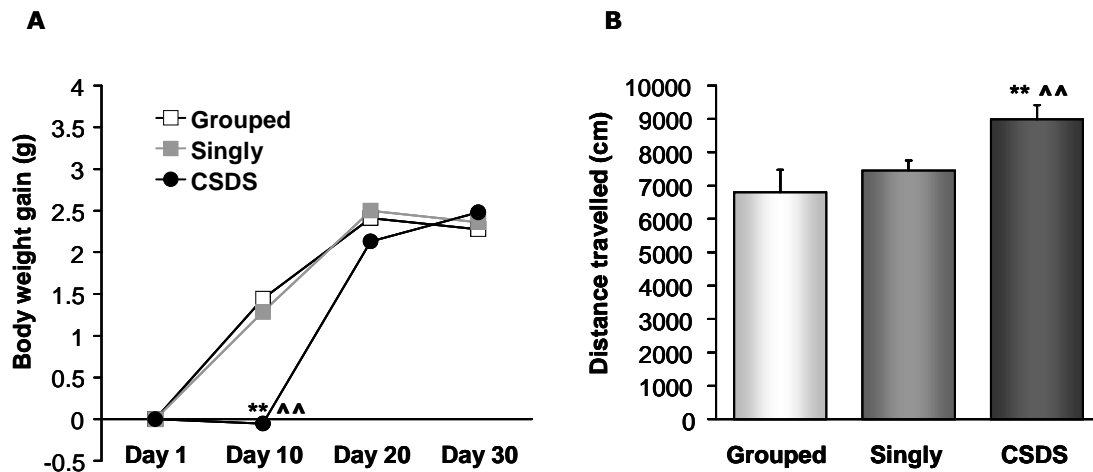


Figure 2. Effect of social isolation and chronic social defeat stress on weight gain (A) and motor activity (B). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the weight gain from the day 1 of the CSDS procedure (A) and distance travelled during 30 minutes (B). (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs isolated control; ^^ $p<0.01$ vs grouped control).

Novel object recognition. Short and long-term memory in the novel object recognition (NOR) test was not affected either by individual housing or stress (Data not shown).

Elevated plus maze and novelty suppression of feeding. In the elevated plus maze, one-way ANOVA revealed significant differences among the groups both in the time spent ($F_{2, 51} = 19.198$, $n=18$, $p<0.01$) and in the latency to first entrance ($F_{2, 51} = 11.630$, $n=18$, $p<0.01$) into the open arms. CSDS mice showed less time in open arms compared to both

grouped ($p < 0.01$) and singly housed ($p < 0.05$). Singly housed mice also spent less time in open arms compared to grouped controls ($p < 0.05$) (**Figure 3A**). CSDS mice also showed a significant increase in latency to first entrance into the open arms compared to both singly and grouped housed controls ($p < 0.01$) (**Figure 3B**).

In the novelty suppression of feeding test significant differences among groups both in the time spent eating ($F_{2,51} = 15.491$, $n=18$, $p < 0.01$) and in the latency to first approach to eating zone ($F_{2,51} = 4,494$, $n=18$, $p < 0.05$) were found. Both, singly housed and CSDS mice showed less time eating compared to grouped controls ($p < 0.01$). Moreover, time eating in defeated mice was lower compared to singly housed ($p < 0.01$) (**Figure 3C**). Latency to first approach to the eating zone was significantly higher only in the CSDS group ($p < 0.05$) (**Figure 3D**).

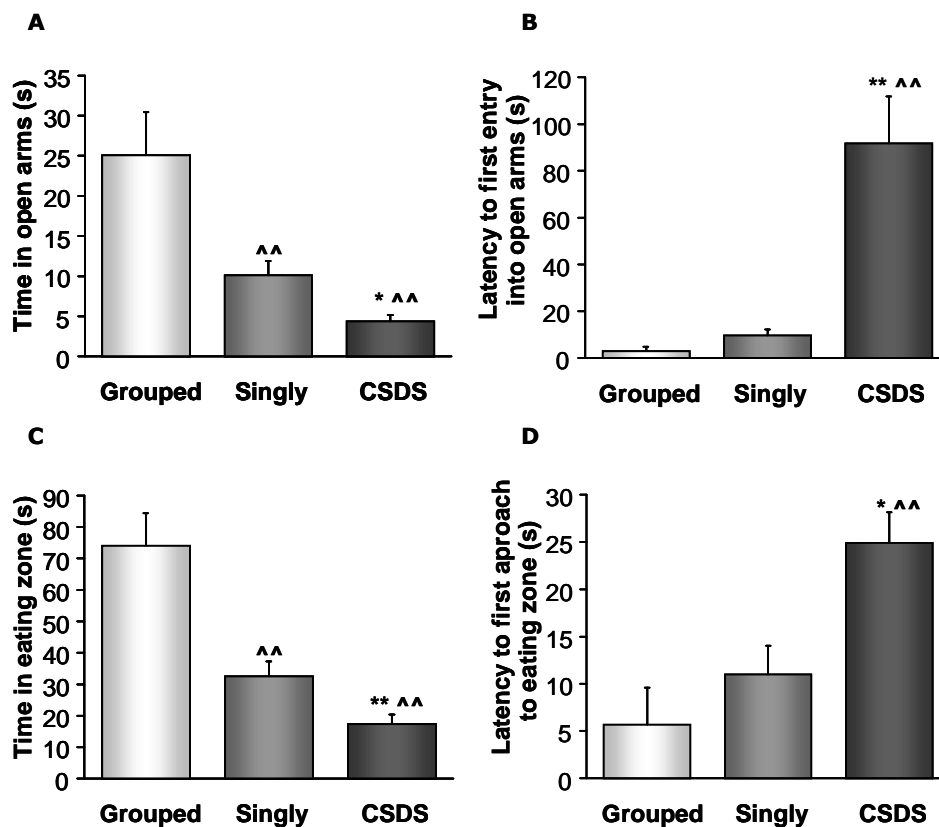


Figure 3. Effect of social isolation and chronic social defeat stress anxiety behaviour in the elevated plus maze test (A,B) and in the novelty suppression of feeding test (C,D). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) time spent in open arms (A), latency time to first entrance to the open arms (B), time spent in the eating zone (C) and the latency time to first approach to the eating zone (D) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs isolated control; ^^ $p < 0.01$ vs grouped control).

Social interaction test. A significant interaction among the groups (control grouped, singly housed, CSDS exposed) and mouse strain used as target (dominant, same strain) was observed both in interaction ($F_{2, 51} = 12,99$, $n=18$, $p<0.01$) and freezing times ($F_{2, 51} = 5.70$, $n=18$, $p<0.01$). With a dominant mouse, CSDS mice showed a significant decrease in interaction times ($p<0.01$) compared to both individualized and grouped controls. With a mouse of the same strain, both individualized ($p<0.05$) and CSDS ($p<0.01$) mice showed a significant decrease in the interaction time compared to grouped controls (**Figure 4A**).

In addition, freezing time was increased in CSDS mice with a dominant mouse, ($p<0.05$) compared to both singly housed and grouped controls. However, with a mouse of the same strain no significant differences among groups were found (**Figure 4B**).

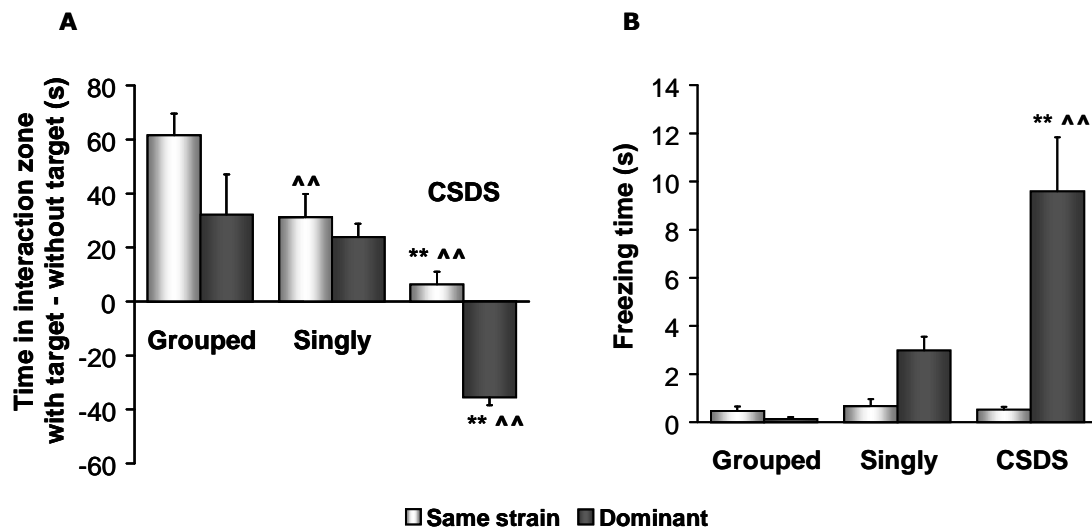


Figure 4. Effect of social isolation and chronic social defeat stress on the social behavior (A) and freezing (B) in the social interaction. Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the difference of time spent in the interaction zone in the presence and the absence of a target (A) freezing time in the presence of a target (B) in the social interaction test, using as a target a mouse of the same strain or an aggressive mouse (dominant). (** $p<0.01$ vs isolated control; ^^ $p<0.01$ vs grouped control).

Helpless behavior. Both singly housed and CSDS mice showed a similar significant increase in immobility time compared to house grouped mice ($F_{2, 51} = 4.122$, $n=18$, $p<0.05$) (**Figure 5A**).

Sucrose intake test. In this test, sucrose intake varied across 10 days time blocks, and differences among the groups were shown ($F_{2, 51} = 4.532$, $n=18$, $p<0.05$). Specifically, on day 10, singly housed showed a significant decrease ($p<0.05$) in sucrose intake compared to grouped controls and CSDS mice ($F_{2, 51} = 4.242$, $n=18$, $p<0.05$). On day 30, CSDS induced a decrease in sucrose intake ($p<0.05$) that was higher than the decrease induced by individual housing ($p<0.05$) ($F_{2, 51} = 9.648$, $n=18$, $p<0.05$) (**Figure 5B**).

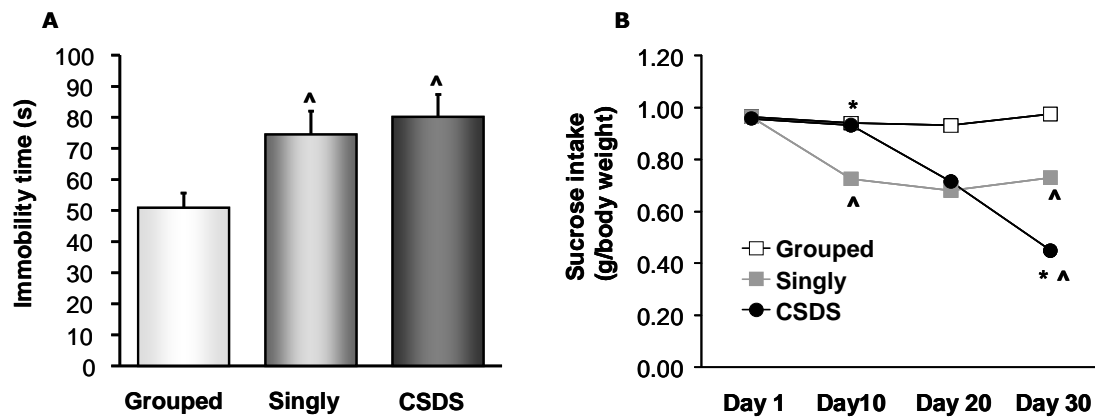


Figure 5. Effect of chronic social defeat stress and antidepressant treatment on the depressive like behaviour in the forced swimming test (A) and the sucrose intake test (B). Data show mean \pm SEM of the immobility time in the forced swimming test (A) and sucrose intake (g/body weight) in the sucrose intake test (B). (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control; $\wedge p<0.05$, $\wedge\wedge p<0.01$ vs corresponding saline)

3.2. Effect of antidepressants on long-term behavioural changes induced by CSDS

Body weight. Body weight was affected by defeat stress on day 10 of the CSDS procedure ($F_{1, 136} = 74.662$, $n=18$, $p<0.01$). However, none of the antidepressant treatments affected to body weight gain in both CSDS and control mice (**Figure 6A**).

Locomotor activity. A significant interaction between stress and treatment was found in spontaneous locomotor activity ($F_{3, 136} = 4.214$, $n=18$, $p<0.01$). The hyperactivity shown by CSDS saline treated mice ($p<0.01$) was reverted by repeated treatment with both venlafaxine and tianeptine ($p<0.05$). However, repeated fluoxetine failed to revert this hyperactivity (**Figure 6B**).

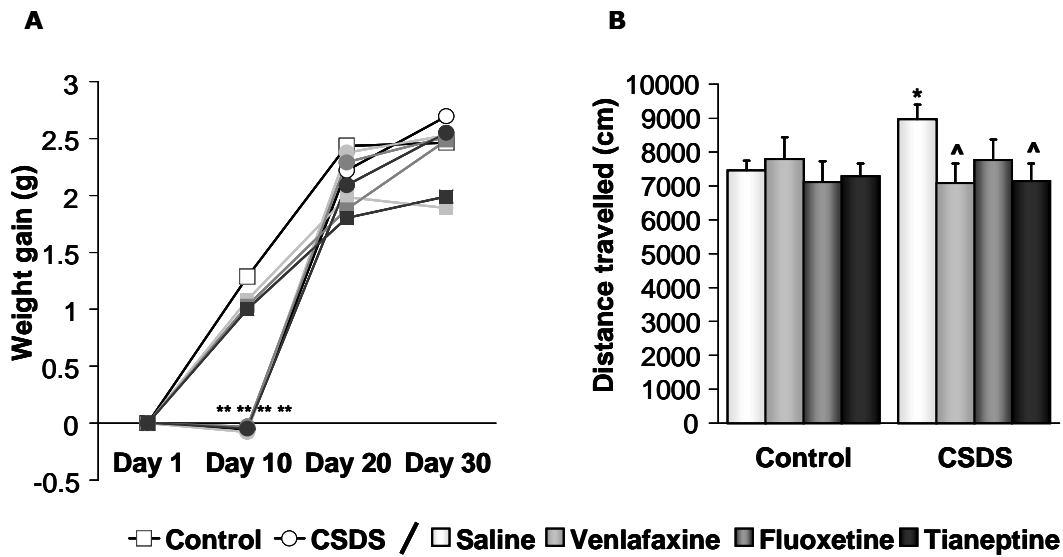


Figure 6. Effect of chronic social defeat stress and antidepressant treatment on weight gain (A) and motor activity (B). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the weight gain from the day 1 of the CSDS procedure (A) and distance travelled during 30 minutes (B (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control; ^ $p<0.05$ vs corresponding saline).

Elevated plus maze and novelty suppression of feeding. In the elevated plus maze, a significant interaction between stress and treatment was found in both time spent into the open arms ($F_{3, 136} = 2.969$, $n=18$, $p<0.05$) and latency time to first enter into the open arms ($F_{3, 136} = 6.328$; $p<0.01$). Interestingly, both venlafaxine and tianeptine treatments reverted significantly the decrease in time spent in open arms induced by CSDS ($p<0.05$) (**Figure 7A**). In addition, CSDS induced a striking increase in latency time ($p<0.01$) that was fully reverted by all the treatments ($p<0.01$) (**Figure 7B**). In the novelty suppression of feeding test, a significant effect of stress ($F_{1, 136} = 10.037$, $n=18$, $p<0.01$) and treatment ($F_{3, 136} = 4.746$, $n=18$, $p<0.01$) was found in time eating. While CSDS saline treated mice showed a significant decrease in time eating compared to controls ($p<0.01$) repeated treatment with tianeptine increased it ($p<0.05$) (**Figure 7C**). In addition, CSDS increased significantly latency to first approach ($p<0.05$) and both venlafaxine and tianeptine were able to revert this effect ($p<0.01$) ($F_{3, 136} = 4.245$, $n=18$, $p<0.01$) (**Figure 7D**). However, fluoxetine decreased per se the time in the eating zone and increase the latency to first approach to the eating zone ($p<0.05$).

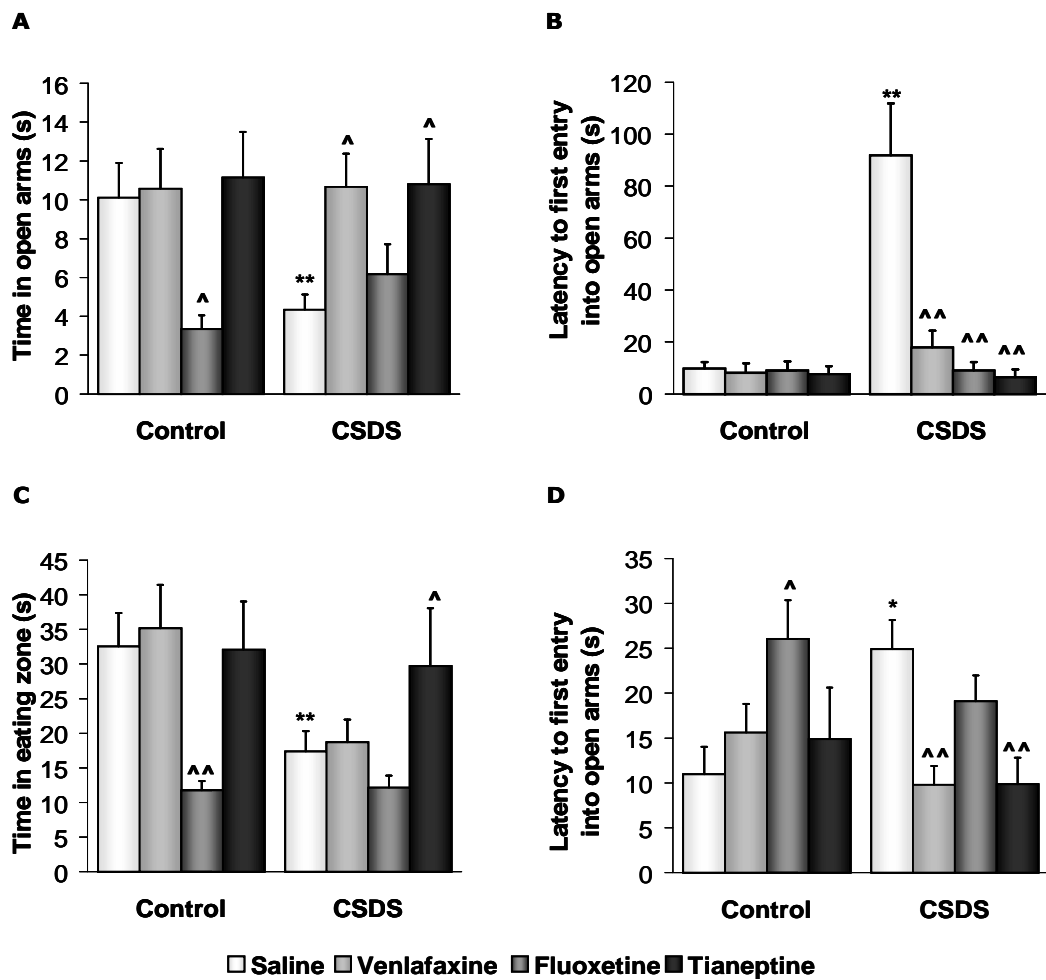


Figure 7. Effect of chronic social defeat stress and antidepressant treatment on anxiety behavior in the elevated plus maze test (A,B) and in the novelty suppression of feeding test (C,D). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) time spent in open arms (A), latency (s) to first entrance to the open arms (B), time spent in the eating zone (C) and the latency to first approach to the eating zone (D) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control; ^ $p<0.05$, ^^ $p<0.01$ vs corresponding saline).

Social interaction. An interaction between stress and treatment was found in the social interaction test both in the presence of a mouse of the same strain ($F_{3, 136} = 2.935$, $n=18$, $p<0.05$) or a dominant mouse ($F_{3, 136} = 2.853$, $n=18$, $p<0.05$). In both cases, CSDS exposed groups showed a significant decrease in exploration time differences (exploration time with target – without target) compared to controls. Only tianeptine treatment was able to revert partially the social avoidance behavior induced by CSDS ($p<0.01$) in the presence of a mouse from the same strain ($p<0.05$) (**Figure 8A**) or a dominant ($p<0.01$) (**Figure 8B**).

In addition, a significant interaction between stress and treatment was found in the freezing time with a dominant mouse ($F_{3, 136} = 2.974$, $n=18$, $p<0.05$). CSDS induced a striking increase in the freezing time ($p<0.01$) that was fully reverted by both venlafaxine ($p<0.01$) and tianeptine treatments ($p<0.01$) (**Figure 8C**) while no effect was observed with fluoxetine treatment. However, with a mouse of the same strain, freezing time was not affected either by stress or treatments (**Figure 8D**).

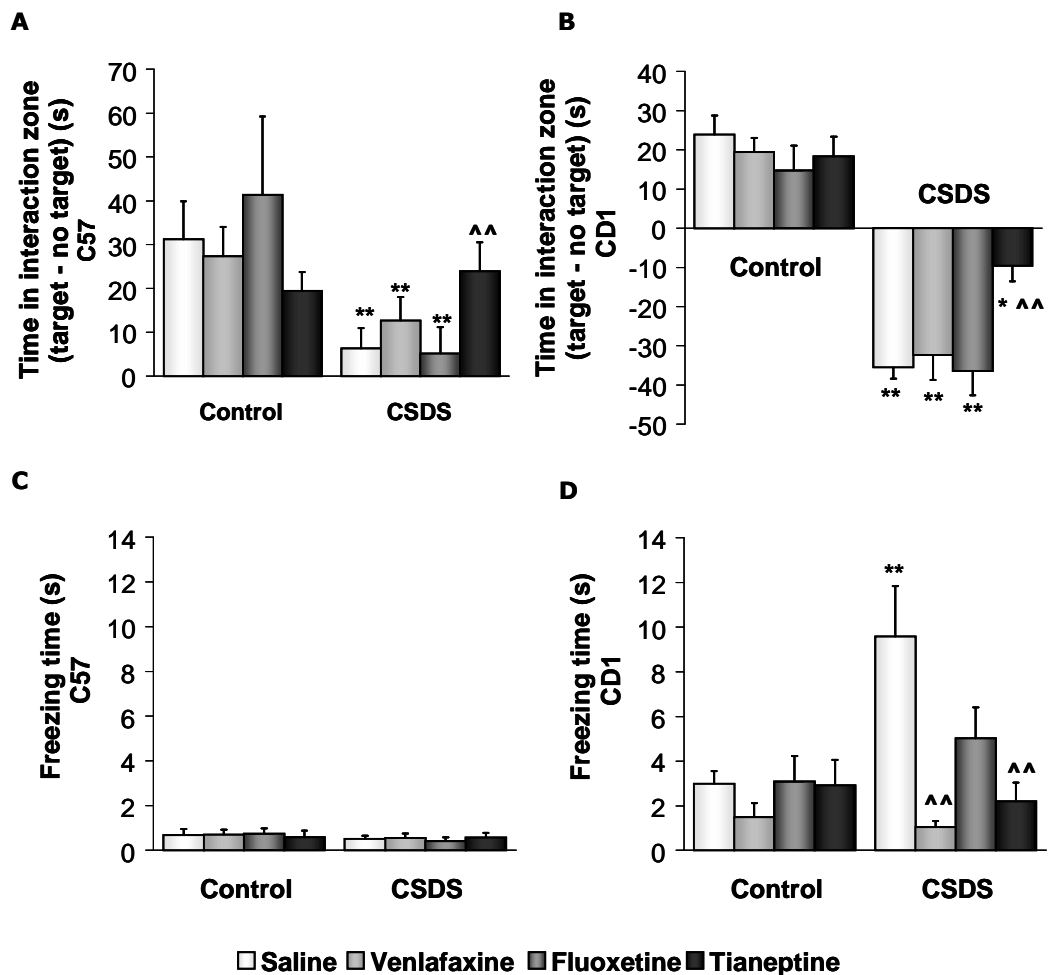


Figure 8. Effect of chronic social defeat stress and antidepressant treatment on the social behavior (A,B) and freezing (C,D) in the social interaction test. Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the difference of time spent in the interaction zone in the presence and the absence of a target (mouse of the same strain A, aggressive mouse B) and freezing time in the presence of a target (mouse of the same strain C, aggressive mouse D). (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs corresponding control; ^ $p<0.05$, ^^ $p<0.01$ vs corresponding saline)

Forced swimming test. A significant effect of treatment ($F_{3, 136} = 3.969$; $p < 0.05$) was found in the forced swimming test. CSDS did not affect helpless behavior compared to controls. Venlafaxine treatment decreased the immobility time compared to both control and CSDS saline treated mice ($p < 0.05$) (**Figure 9A**).

Sucrose intake test. In a pilot study, fluoxetine showed an anorectic effect itself and therefore was excluded of this study. A significant effect of stress ($F_{1,102} = 4.375$, $n=18$,; $p < 0.05$) was found on day 10. On day 30, an interaction between stress and treatment was found ($F_{2,102} = 3.801$, $n=18$, $p < 0.05$). Post-hoc analysis showed a significant decrease in sucrose intake in saline treated mice exposed to CSDS compared to the control ones, and this effect was reverted by venlafaxine treatment (**Figure 9B**). On day 30, tianeptine treatment showed a tendency to revert the decrease in sucrose intake induced by CSDS but this effect was not significant.

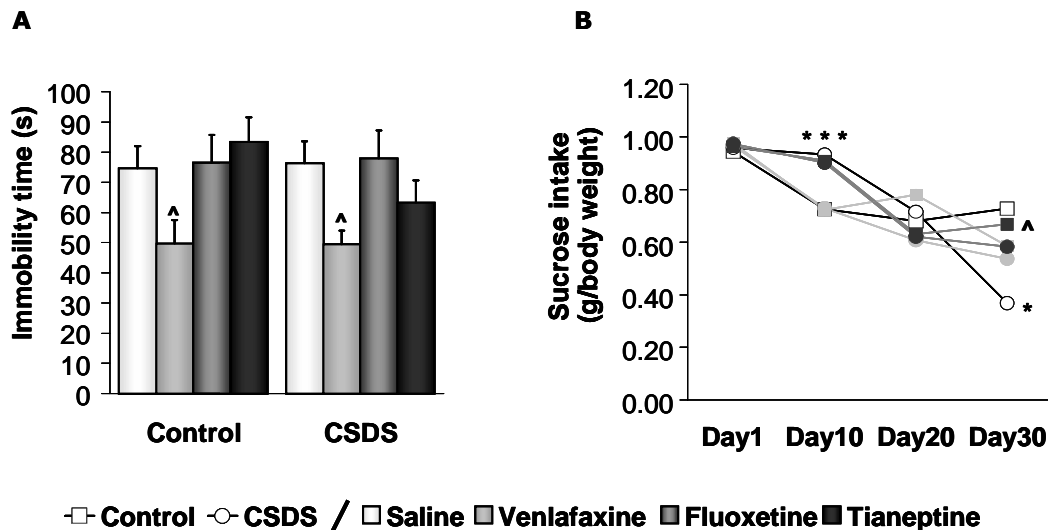


Figure 9. Effect of chronic social defeat stress and antidepressant treatment on the depressive like behaviour in the forced swimming test (A) and the sucrose intake test (B). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the immobility time in the forced swimming test (A) and sucrose intake (g/body weight) in the sucrose intake test (B). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs corresponding control; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ vs corresponding saline)

3.3. Behavioral effects of CSDS in VGLUT1+/- mice

No differences in genotype (VGLUT1+/- vs WT) were observed in body weight gain, locomotor activity and anxiety behavior of mice exposed to CSDS (**Figure 10**).

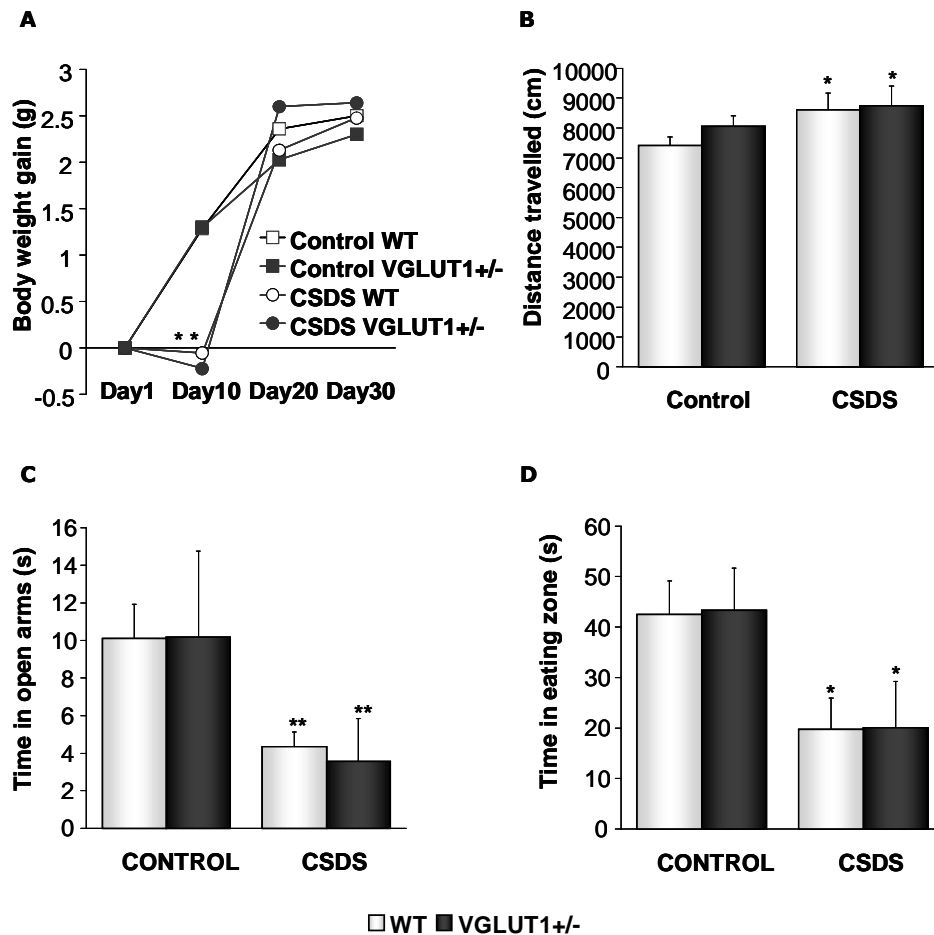


Figure 10. Effect of social defeat stress in VGLUT1+/- and WT littermates on the weight gain (A), motor activity (B) and anxiety-like behaviour in the elevated plus maze test (C) and in the novelty suppression of feeding test (D). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the weight gain from the day 1 of the CSDS procedure (A) and mean \pm SEM of the distance travelled during 30 minutes (B). In the measurement of anxiety behaviour, data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the time spent in open arms (C) in the elevated plus maze test. In the novelty suppression of feeding test, data show mean \pm SEM of the time spent in the eating zone (D) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. corresponding WT).

An interaction between stress and genotype was found in the social interaction test both with a mouse from the same strain ($F_{1, 68} = 3.974$, $n=18$, $p<0.05$) and a dominant mouse ($F_{1, 68} = 6.980$, $n=18$, $p<0.01$). With a mouse of the same strain, both CSDS groups

showed a decrease in exploration time differences being this decrease higher for VGLUT1+/- CSDS mice ($p < 0.01$) (**Figure 11A**). With a dominant mouse, *post hoc* analysis showed that VGLUT1+/- control mice showed a decrease in exploration time compared to WT littermates. However, no effect of genotype was observed after CSDS since both groups showed similar decrease in exploration time (**Figure 11B**). Both control and CSDS VGLUT1+/- mice showed higher freezing time compared to their corresponding WT (**Figure 11C**) ($F_{1, 68} = 4,912$, $n=18$, $p < 0.05$, effect of genotype). With a dominant mouse, both WT and VGLUT1+/- CSDS mice increased significantly the freezing time (**Figure 11D**) ($F_{1, 68} = 4.173$; $p < 0.05$, effect of stress).

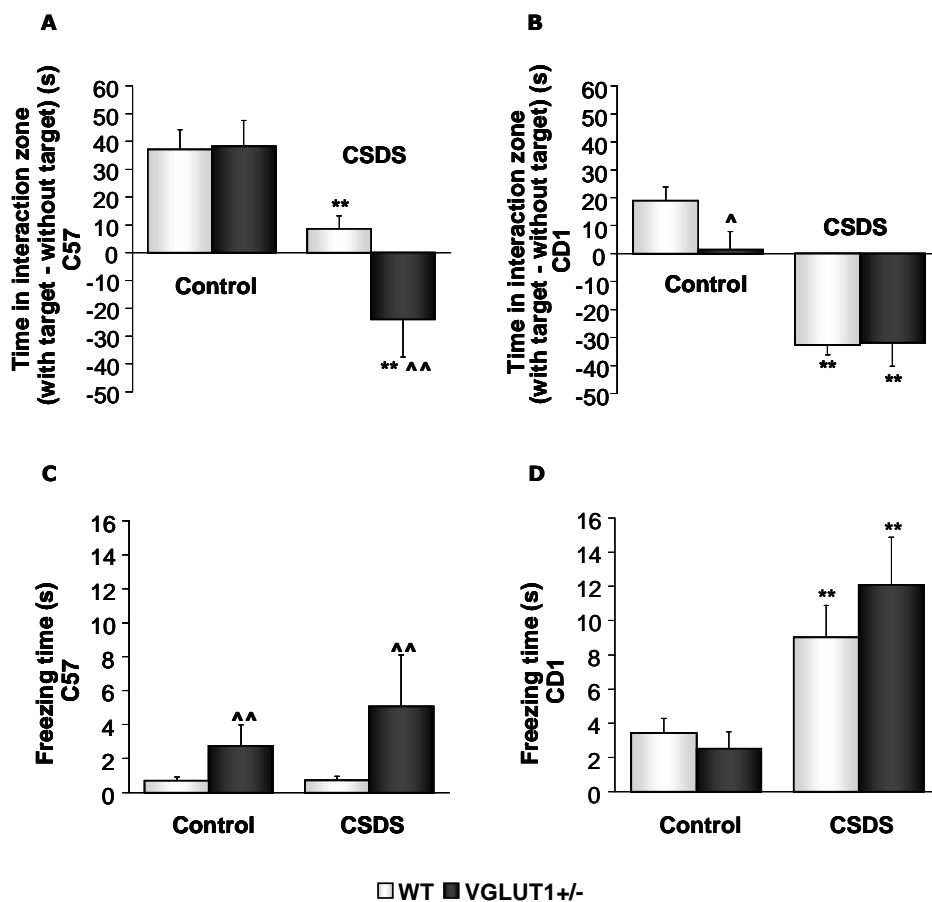


Figure 11. Effect of chronic social defeat stress in VGLUT1+/- and WT littermates on the social behavior (A,B) and freezing (C,D) in the social interaction test. Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the difference of time spent in the interaction zone in the presence and the absence of a target (mouse of the same strain A, aggressive mouse B) and freezing time in the presence of a target (mouse of the same strain C, aggressive mouse D). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs corresponding control; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ vs corresponding WT).

No interaction between genotype and stress on immobility time was shown. Both VGLUT1+/- control and defeated mice showed an increase in immobility time compared to their corresponding WT ($F_{1,68} = 6.496$, $n=18$, $p<0.01$, effect of genotype) (**Figure 12A**).

Prior to onset of CSDS, we observed an effect of genotype ($F_{1,68} = 5.776$, $n=18$, $p<0.05$) indicating that VGLUT1+/- mice showed a decrease in sucrose intake compared to WT mice. On day 30, a significant interaction between stress and genotype was observed ($F_{1,68} = 6.213$, $n=18$, $p<0.05$). WT CSDS mice showed a significant decrease in sucrose intake compared to their corresponding controls (**Figure 12B**).

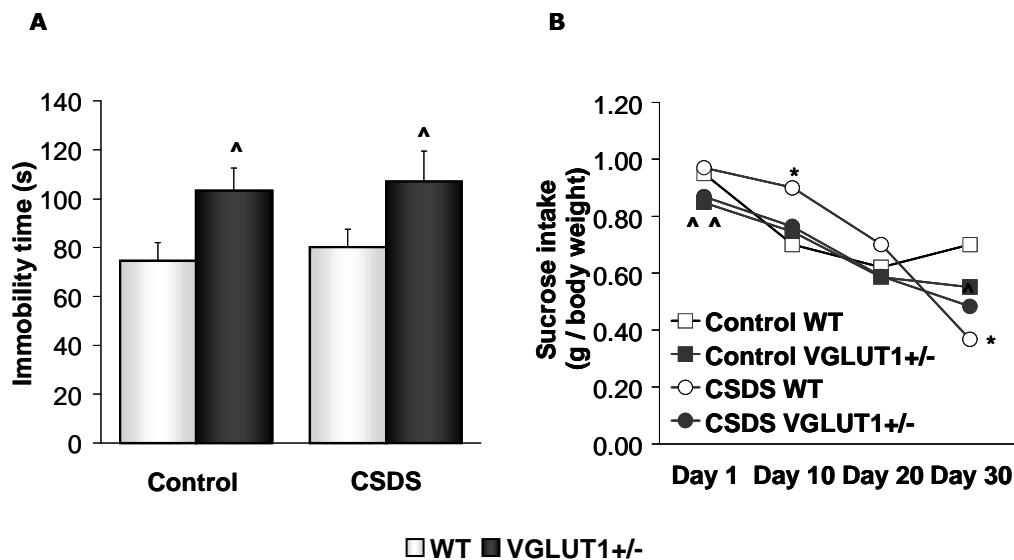


Figure 12. Effect of chronic social defeat stress in VGLUT1+/- and WT littermates the depressive like behavior in the forced swimming test (A) and the sucrose intake test (B). Data show mean \pm SEM ($n=18$ mice/group) of the immobility time in the forced swimming test (A) and sucrose intake (g/body weight) in the sucrose intake test (B). (* $p<0.05$, vs corresponding control; [^] $p<0.05$, ^{^^} $p<0.01$ vs corresponding WT).

3.4. Cortical regulation of VGLUT1 mRNA levels by chronic social defeat stress

CSDS induced a significant decrease ($p<0.05$) of VGLUT1 mRNA in the amygdale compared to control saline treated mice (singly housed) (75.3 ± 5.4 % of controls) (**Figure 13**).

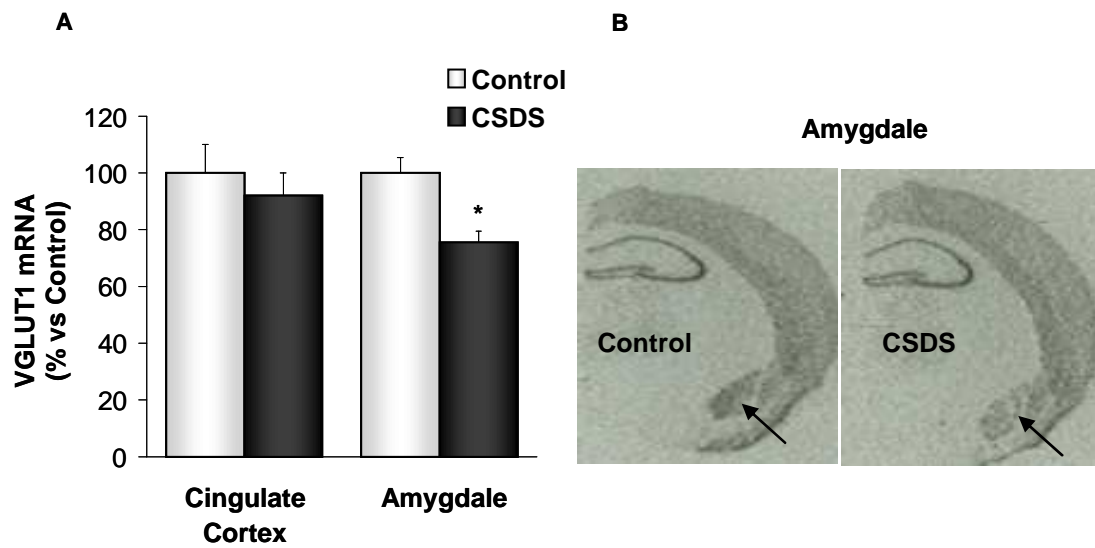


Figure 13. Effect of chronic social defeat stress in VGLUT1 mRNA levels in cingulated cortex and amygdale. Data show mean \pm SEM of VGLUT1 mRNA (%vs control) in the cingulated cortex and amygdale (A) measured by in situ hybridization. In B, autoradiogram showing VGLUT1 mRNA expression in the amygdale.

4. DISCUSSION

The present study was aimed at investigating the validity of the chronic social defeat stress (CSDS) as a model of depression. The long-term behavioral effects of mice exposed to CSDS and their response to chronic treatment with different classes of antidepressants was studied. In addition, the effect of CSDS in VGLUT1+/- mice, considered a genetic model of increased vulnerability to depressive-like behaviors after stress (García-García et al. 2009), was tested.

CSDS addressed core and common symptoms of depression such as long-term anhedonia and helplessness, as well as other clinical aspects highly comorbid with major depression such as anxiety and social avoidance. Other alterations were hyperactivity, freezing behavior and changes in body weight gain. Repeated treatment with the antidepressant venlafaxine was effective at reverting anhedonia, and reduced helpless behavior in the forced swimming test. Moreover, both venlafaxine and tianeptine behaved as effective anxiolytics. However, CSDS-induced social avoidance was reverted only by tianeptine. On the other hand, VGLUT1+/- and WT mice, were equally vulnerable to anhedonia or helplessness after stress. Yet, the heterozygous mice showed an enhanced vulnerability to stress-induced social avoidance phenotype. Further, CSDS induced a down regulation of VGLUT1 mRNA in the amygdale.

Anhedonia, or the diminished capacity to experience pleasure, is a core symptom of depressive disorders (Willner, 1991). In rodents, many studies support the validity of the sucrose intake/preference paradigm to measure anhedonic-like behavior (Willner 2005). In addition, helplessness is considered a common symptom of depression (Seligman, 1975) and the most widely used paradigm in rodents to measure this behavior is the forced swimming test (FST) (Porsolt et al. 1977). Twenty days after the defeat procedure, both social isolation and CSDS induced anhedonic-like behavior being the effect of CSDS significantly higher. Moreover, both individual housed and defeated mice showed similar immobility times in the forced swimming test suggesting that helpless behavior in the CSDS model is exclusively dependent on individual housing. These results support previous studies suggesting that individual housing per se could be considered a good model of social isolation inducing depressive-like behaviors (Wallace et al. 2009). Venlafaxine treatment was the only antidepressant effective to revert anhedonic-like

behavior induced by CSDS after repeated administration and, as expected (Kulkarni and Dhir, 2007), it reduced helpless behavior in control and defeated mice. However neither fluoxetine nor tianeptine showed anti-immobility action. These results suggest a modest additional impact of long-term CSDS compared to social isolation in terms of modelling depression. Moreover, the limited response to antidepressants questions the predictive validity of the model. Yet, this is a single dose study and therefore we can not exclude the possibility that higher doses of these drugs or in the case of tianeptine, administering two-three injections per day, given its short half-life, become equally effective to reverse depressive-like behaviours. Other behaviors possibly related to development of depressive-like syndrome might be changes in weight gain and hyperlocomotion (Gupta, 2009). On the other hand, control mice (singly group) showed anhedonic-like behavior after ten days of individual housing in cages with two compartments separated by a metallic mesh being mouse of the same strain the partner. In contrast, this effect was not observed in CSDS mice despite that, during this time, they were individually housed in similar cages. These results that are difficult to interpret, could suggest that social defeat and continued fellowship with a dominant partner might stimulate the rewarding system in the short-term (Miczek et al. 2008).

Anxiety is a frequent comorbid feature of depression (Kessler et al. 2007) and therefore the presence of anxiety-like symptoms in chronically stressed mice are not surprising. CSDS mice showed indistinctly a remarkable anxiety in both test (EPM and NSF) higher than that exhibited by individual housing. These results agree with previous findings showing the appearance of an "anxious profile" (Krishnan et al. 2007) in CSDS mice, as well as in social isolation (Ago et al. 2007; Kawasaki et al. 2011) using several anxiety paradigms. Interestingly, both venlafaxine and tianeptine behaved as effective anxiolytics in both test. Moreover, these drugs reversed effectively CSDS-induced effects in freezing and motor activity which agrees with studies suggesting that these behaviours are related to anxiety (Fegley et al., 2008; Slattery et al., 2011). In addition, our results match well with clinical studies showing the anxiolytic action of venlafaxine and tianeptine (Brion et al. 1996; Davidson et al. 1999; Rickels et al. 2000).

Social withdrawal is a psychiatric phenomenon common to different disorders in humans, such as depression, social phobia and post-traumatic stress disorder (Friedlander et al. 2004; Berton et al. 2006). Using the social interaction test, recent studies show that socially defeated mice become persistently aversive toward social stimuli (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Krishnan et al. 2007; Lutter et al. 2008; Covington et al. 2009; Wilkinson et al. 2009; Lagace et al. 2010). Importantly, in these studies, the reversal of CSDS-induced social avoidance by repeated antidepressant treatment suggested that this behavioral pathology might be relevant to human depression (Yan et al. 2010; Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006). However, these studies did not examine the concurrence of social avoidance with other core and typical depressive-like behaviors. In addition, most of them use a former aggressor as a social target (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Krinhana et al. 2008) and therefore one can not discriminate between decreased social behavior and the natural fearful reaction caused by a reencounter with a dominant strain. Here, social approach and freezing behavior toward both a dominant mouse and a mouse from the same strain as social targets were measured. As expected, we found that the aversive response in the CSDS mice was clearly more robust when a former dominant was used as a social target in the wire cage. Indeed, in the presence of an aggressor, time spent in the interaction zone is much lower than that spent in the habituation phase. Among the three antidepressants, only repeated tianeptine was able to increase this interaction time although, it was not even able to overcome the time spent during the habituation. However, both tianeptine and venlafaxine reverted completely the marked freezing behavior induced by CSDS, which could be interpreted as a natural expression of fear. On the other hand, in the presence of a mouse of the same strain, CSDS induced a decrease in the interaction zone and repeated tianeptine was able to revert it. The different action of venlafaxine and tianeptine on typical depressive-like behaviors (e.g. anhedonia and helplessness) and social avoidance strongly suggest that the underpinning chemical mechanisms of these symptoms are unrelated. For instance, the antianhedonic action of antidepressants that act increasing noradrenalin levels in the brain has been clearly shown in other models (Willner 2005). By contrast, tianeptine, a glutamate modulator (McEwen et al., 2010) has shown to modulate stress-mediated changes in glutamate efflux in regions such as the amygdale, classically involved in social behavior (Reznikov et al. 2007). Thus, the

different action of antidepressants on social avoidance, argue against recent studies (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Krishnan V et al. 2007; Lutter et al. 2008; Wilkinson et al. 2009; Covington et al. 2009; Lagace et al. 2010) that rely only in the social interaction test as a valid paradigm to measure depressive-like behavior in defeated mice. Perhaps, stress-induced social avoidance could be better modeling clinical aspects of other disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD). Supporting this idea, different clinical studies show the higher effectiveness of tianeptine compared to monoaminergic antidepressants in these disorders (Besançon G et al. 1993; Aleksandrovskiĭ et al. 2005; Onder et al., 2006; Romyantseva and Stepanov 2008). We suggest that methodological differences might account for this discrepancy. Again, higher doses of these drugs should be tested to study its effectiveness to reverse social avoidance.

Many clinical studies support the antidepressant and anxiolytic action of chronic fluoxetine in depressed patients (Schoevers et al., 2008). In our studies, the lack of effectiveness of fluoxetine in the different behavioral paradigms disagrees with previous studies showing the antidepressant and anxiolytic-like activity of this SSRI in the long-term (Kulkarni and Dhir, 2007; Dulawa and Hen 2005) as well as its efficacy at preventing stress-induced social avoidance in mice (Tsankova et al. 2006; Berton et al. 2006). Indeed, the observed anxiogenic behavior in both anxiety tests in control mice would match with experimental and clinical studies showing how initiation of selective serotonin-reuptake inhibitor treatment elicits anxiety in depressive illness patients (Goodnick and Goldstein, 1998; Robert et al., 2011). The dose of fluoxetine used (10 mg/kg) has shown to block effectively 5-HT transporter *in vitro* and anti-immobility action in acute studies (Tordera et al. 2002; Kulkarni and Dhir, 2007). Perhaps, the lack of effect of fluoxetine in these tests could be due to the fact that these tests were carried out the morning after the last drug injection (at 13:00 h) and therefore, neurotransmitter levels in the brain might not be high enough to induce an antidepressant-like action. Further studies using higher doses would be needed to elucidate this hypothesis. Yet, the fact that fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine have a half-life considerably long suggest that after repeated once daily, fluoxetine dosing steady state is reached. On the other hand the lack of effect of fluoxetine could be related to the relatively short duration

of the treatment. In keeping with this idea, SSRIs often require at least 4–6 weeks to achieve clinical benefits in depressed patients (Nierenberg, 2001). Another possible explanation is that C57/BL6 mice have been reported to be less responsive to SSRIs in the FST compared to other mouse strains (Lucki et al. 2001).

Unlike other forms of chronic stress (Garcia-Garcia et al. 2009), decreased VGLUT1 levels did not behave as a biological risk factor of enhanced vulnerability to depressive-like behavior in this model. Yet, the observed enhanced vulnerability to stress-induced social avoidance of VGLUT1^{+/-} mice together with the stress-induced down regulation of VGLUT1 mRNA found in the amygdala suggests that the CSDS model could affect brain areas mainly involved in sociability. Moreover, it proposes a key role for this transporter in this brain area as a biological mediator of social behavior.

Taken together, these results have promoted some knowledge on the complexity of the CSDS model. Firstly, given the variety of altered behaviors induced, CSDS should not be considered as a pure model of depression. Secondly, the different action of antidepressants on the core symptom anhedonia and on social interaction suggests that neurochemical mechanism underpinning these behaviors is unrelated. Thirdly, unlike other forms of chronic stress, CSDS might be affecting brain areas mainly involved in the processing of social behavior and glutamatergic mechanism in these areas could play a key role. Thus, CSDS might be modeling clinical aspects of disorders such as post-traumatic stress disorder.

Acknowledgements

We are very grateful to Ms Sandra Lizaso and M.L. Muro for her excellent technical assistance. We are also very grateful to Dr. S. Wojcik (Gottingen, Germany) for the generous gift of the VGLUT1+/- mice. This work was supported by Laboratories Servier S.L., the Ministry of Science and Innovation (SAF2008-02217, Spanish Government) and a fellowship from the Spanish Government (Department of Education) to N. Elizalde.

References

- Ago Y, Takahashi K, Nakamura S, Hashimoto H, Baba A, Matsuda T (2007) Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test. *J Pharmacol Sci.* 104:153-8
- Aleksandrovskii IuA, Avedisova AS, Boev IV, Bukhanovskii AO, Voloshin VM, Tsygankov BD, Shamrei BK (2005) Efficacy and tolerability of coxil (tianeptine) in the therapy of posttraumatic stress disorder. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 105: 24-9
- Balschun D, Moechars D, Callaerts-Vegh Z, Vermaercke B, Van Acker N, Andries L, D'Hooge R (2010) Vesicular glutamate transporter VGLUT1 has a role in hippocampal long-term potentiation and spatial reversal learning. *Cereb Cortex* 20: 684-93
- Berrocioso E, Rojas-Corrales MO, Micó JA (2004) Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like effect of venlafaxine in the forced swimming test in mice. *Neurosci Lett.* 363:25-8
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ and Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864-8
- Besançon G, Servillat T, Albert E (1993) Drugs for stress. *Encephale* 19 Spec No 1: 203-7
- Bjorkqvist K (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav* 73: 435-42
- Brion S, Audrain S, de Bodinat C (1996) Major depressive episodes in patients over 70 years of age. Evaluation of the efficiency and acceptability of tianeptine and mianserin. *Presse Med* 25: 461-8
- Covington HE 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ. (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 29: 11451-60

- Davidson JR, DuPont RL, Hedges D, Haskins JT (1999) Efficacy, safety, and tolerability of venlafaxine extended release and buspirone in outpatients with generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 60: 528-35
- Denmark A, Tien D, Wong K, Chung A, Cachat J, Goodspeed J, Grimes C, Elegante M, Suciuc C, Elkhayat S, Bartels B, Jackson A, Rosenberg M, Chung KM, Badani H, Kadri F, Roy S, Tan J, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I, Gilder T, Kalueff AV (2010) The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behav Brain Res* 208: 553-9
- Dulawa SC, Hen R (2005) Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:771-83.
- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 199: 1-14
- Elizalde N, Pastor PM, Garcia-García AL, Serres F, Venzala E, Huarte J, Ramírez MJ, Del Rio J, Sharp T, Tordera RM (2010) Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: chronic mild stress and decreased expression of VGLUT1. *J Neurochem.* 114:1302-14
- Fegley DB, Holmes A, Riordan T, Faber CA, Weiss JR, Ma S, Batkai S, Pacher P, Dobolyi A, Murphy A, Sleeman MW, Usdin TB (2008) Increased fear- and stress-related anxiety-like behavior in mice lacking tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Genes Brain Behav.* 7:933-42
- Friedlander AH, Friedlander IK, Marder SR (2004) Posttraumatic stress disorder: psychopathology, medical management, and dental implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:5-11
- 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, Lanfumey L (2004) Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. *J Neurosci* 24: 2787-96

- Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Matrov D, Harro J, Wojcik SM, Venzala E, Ramírez MJ, Del Rio J, Tordera RM (2009) Increased vulnerability to depressive-like behavior of mice with decreased expression of VGLUT1. *Biol Psychiatry* 66: 275-82
- Goodnick PJ, Goldstein BJ (1998) Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders--II. Efficacy and quality of life. *J Psychopharmacol* 12:S21-54
- Gupta RK. (2009) Major depression: an illness with objective physical signs. *World J. Biol. Psychiatry* 10:196-201
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* 1: 293-319
- Hicks BM, DiRago AC, Iacono WG, McGue M (2009) Gene-environment interplay in internalizing disorders: consistent findings across six environmental risk factors. *J Child Psychol Psychiatry* 50:1309-17
- Kawasaki T, Ago Y, Yano K, Araki R, Washida Y, Onoe H, Chaki S, Nakazato A, Hashimoto H, Baba A, Takuma K, Matsuda T (2011) Increased binding of cortical and hippocampal group II metabotropic glutamate receptors in isolation-reared mice. *Neuropharmacology* 60:397-404
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1998) Stressful life events and major depression: risk period, long-term contextual threat, and diagnostic specificity. *J Nerv Ment Dis* 186: 661-9
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) The assessment of dependence in the study of stressful life events: validation using a twin design. *Psychol Med* 29:1455-60
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001) Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry* 158:582-6
- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48: 191-214
- Kessler H, Roth J, von Wietersheim J, Deighton RM, Traue HC (2007) Emotion recognition patterns in patients with panic disorder. *Depress Anxiety*. 24:223-6.

- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640: 69-72
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131: 391-404
- Krishnan V, Berton O, Nestler E (2008) The use of animal models in psychiatric research and treatment. *Am J Psychiatry*. 165:1109
- Kulkarni SK, Dhir A (2007) Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1248-54.
- Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, Nestler EJ, Krishnan V, Eisch AJ (2010) Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4436-41
- Lagerspetz K, Tirri R (1961) The induction of physiological tolerance to promazine in mice. *Ann Med Exp Biol Fenn Suppl* 5: 1-24
- Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ (2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology* 155:315-22
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM (2008) The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci* 11: 752-3
- Mazure CM, Bruce ML, Maciejewski PK, Jacobs SC (2000) Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response. *Am J Psychiatry* 157: 896-903

- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, Fuchs E. (2010) The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry*. 15:237-49
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE 3rd (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther* 120:102-28
- Molteni R, Calabrese F, Maj PF, Olivier JD, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2009) Altered expression and modulation of activity-regulated cytoskeletal associated protein (Arc) in serotonin transporter knockout rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 19: 898-904
- Monroe SM, Torres LD, Guillaumot J, Harkness KL, Roberts JE, Frank E, Kupfer D (2006) Life stress and the long-term treatment course of recurrent depression: III. Nonsevere life events predict recurrence for medicated patients over 3 years. *J Consult Clin Psycho*. 74:112-20
- Nierenberg AA (2001) Do some antidepressants work faster than others? *J Clin Psychiatry*. 62:22-5
- Onder E, Tural U, Aker T (2006) A comparative study of fluoxetine, moclobemide, and tianeptine in the treatment of posttraumatic stress disorder following an earthquake. *Eur Psychiatr* 21:174-9
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 229:327-36.
- Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J (2007) Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*. 25:3109-14
- Rickels K, Pollack MH, Sheehan DV, Haskins JT (2000) Efficacy of extended-release venlafaxine in nondepressed outpatients with generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 157: 968-74
- Robert G, Drapier D, Bentué-Ferrer D, Renault A, Reymann JM (2011) Acute and chronic anxiogenic-like response to fluoxetine in rats in the elevated plus-maze: modulation by stressful handling. *Behav Brain Res*. 220:344-8

- Rohde P (2001) The relevance of hierarchies, territories, defeat for depression in humans: hypotheses and clinical predictions. *J Affect Disord* 65: 221-30
- Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G, Usiello A, Centonze D (2008) Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci* 28: 7284-92
- Rumyantseva GM, Stepanov AL (2008) Post-traumatic stress disorder in different types of stress (clinical features and treatment). *Neurosci Behav Physiol* 38:55-61
- Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Hiemke C, Fuchs E, Rütger E, Havemann-Reinecke U (2006) Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. *Behav Pharmacol* 17:19-29
- Rygula R, Abumaria N, Domenici E, Hiemke C, Fuchs E (2006) Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behav Brain Res* 174:188-92
- Schoevers RA, Van HL, Koppelmans V, Kool S, Dekker JJ (2008) 1 Managing the patient with co-morbid depression and an anxiety disorder. *Drugs*. 68:1621-34
- Seligman ME (1975) *Helplessness: On depression, development, and death*. W.H. Freeman: San Francisco
- Slattery DA, Uschold N, Magoni M, Bär J, Popoli M, Neumann ID, Reber SO (2011) Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: Anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology*. Epub ahead of print
- Svenningsson P, Bateup H, Qi H, Takamiya K, Haganir RL, Spedding M, Roth BL, McEwen BS, Greengard P (2008) Involvement of AMPA receptor phosphorylation in antidepressant actions with special reference to tianeptine. *Genes Brain Behav*. 7:933-42.
- Tordera RM, Monge A, Del Río J, Lasheras B (2002) Antidepressant-like activity of VN2222, a serotonin reuptake inhibitor with high affinity at 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol* 442:63-71
- Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, Del Rio J (2007) Enhanced anxiety, depressive-like behavior and impaired recognition memory in

- mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)
Eur J Neurosci 25: 281-90
- Tordera RM, Garcia-García AL, Elizalde N, Segura V, Aso E, Venzala E, Ramírez MJ, Del Rio J (2011) Chronic stress and impaired glutamate function elicit a depressive-like phenotype and common changes in gene expression in the mouse frontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:23-32
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9: 519-25
- Uezato A, Meador-Woodruff JH, McCullumsmith RE (2009) Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Bipolar Disord* 11: 711-25
- Wagner KV, Wang XD, Liebl C, Scharf SH, Müller MB, Schmidt MV (2011) Pituitary glucocorticoid receptor deletion reduces vulnerability to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* 36:579-87
- Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, Cao JL, Kirk A, Chakravarty S, Kumar A, Krishnan V, Neve RL, Cooper DC, Bolaños CA, Barrot M, McClung CA, Nestler EJ (2009) CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci* 12:200-9
- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthal W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ (2009) Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci* 29: 7820-32
- Willner P (1991) Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci* 12:131-6
- Willner P. (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110
- Yan HC, Qu HD, Sun LR, Li SJ, Cao X, Fang YY, Jie W, Bean JC, Wu WK, Zhu XH, Gao TM (2010) Fuzi polysaccharide-1 produces antidepressant-like effects in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:623-33

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5

**Long-term neuroplasticity alterations induced by
chronic social defeat stress**

Resumen

En los últimos años, los modelos de estrés basados en conflictos sociales parecen tener claras ventajas sobre los modelos ambientales, dado que implican una forma social de estrés, que puede ser relevante a la psicopatología inducida por el estrés en los seres humanos. Estudios previos muestran que las conductas inducidas por el estrés crónico son reguladas, al menos en parte, por alteraciones en la estructura dendrítica y sináptica de regiones del cerebro involucradas en el procesamiento emocional como la corteza prefrontal (PFC) y la amígdala. el objetivo de este trabajo es estudiar el posible impacto del estrés crónico de derrota social en estructuras dendríticas y sinápticas de éstas regiones cerebrales. Además, se ha analizado la expresión de algunos de estos marcadores de plasticidad sináptica en respuesta a diferentes estímulos sociales.

Los ratones (C57BL/6) fueron expuestos a CSDS durante 10 días y un mes después de la terminación del procedimiento de estrés se realizaron los diferentes estudios neuroquímicos o de comportamiento. El CSDS indujo una regulación opuesta en la densidad de espinas dendríticas y de diferentes marcadores de plasticidad sináptica en la corteza prefrontal y en la amígdala. En concreto, mientras que en la corteza prefrontal la densidad de espinas dendríticas, la subunidad GluR1 del receptor AMPA, PSD95 y sinaptofisina se incrementaron, se encontró una disminución en la amígdala. Además, en la amígdala también se halló una disminución de la subunidad NR1 de NMDA, de mGluR4, del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de CREB. Los ratones estresados expuestos a la prueba de la interacción social con un ratón dominante mostraron un marcado aumento del tiempo de congelación así como un aumento en el ratio pCREB / CREB , proBDNF y BDNF maduro en la amígdala.

En conjunto estos resultados sugieren una función maladaptativa persistente de la corteza prefrontal y la amígdala en los ratones socialmente derrotados. Por otra parte, esta sería la primera evidencia de que reencuentros con estímulos sociales aversivos pueden desencadenar miedo condicionado en ratones socialmente derrotados y apoyan la validez del modelo de CSDS para modelizar aspectos clínicos del trastorno de estrés posttraumático.

Abstract

In recent years, models based on social conflict have been proposed to have clear advantages over environmental models because they involve a social form of stress, which may be relevant to stress-induced psychopathology in humans. Previous studies show that altered behaviours induced by other forms of stress are regulated, at least in part, by alterations in dendritic and synaptic structures of brain regions involved in emotional processing as the prefrontal cortex (PFC) and the amygdala. The aim of this work is to study the potential impact of the chronic social stress model (CSDS) on spine density and different synaptic plasticity markers. Moreover, we investigate the expression of some of these synaptic plasticity markers in response to different social stimuli.

Mice (C57BL/6) were exposed to CSDS for 10 days and different neurochemical or behavioural studies were performed one month after the termination of the stress procedure. CSDS induced an opposite regulation of the spine density and of different synaptic plasticity markers in the prefrontal cortex and the amygdala. Specifically while in the prefrontal cortex spine density, GluR1 AMPA receptor subunit, PSD95 and synaptophysin were increased, a decrease was found in the amygdala. In addition, in the amygdala a downregulation of NR1 NMDA subunit, mGluR4, brain derived neurotrophic factor (BDNF) and the cAMP response element-binding (CREB) was also found. Stressed mice exposed to the social interaction test with a dominant mouse experienced a marked freezing behaviour and showed increased pCREB/CREB ratio, proBDNF and mature BDNF in the amygdala.

Taken together these results suggest a persistent maladaptive function of the prefrontal cortex and amygdala of socially defeated mice. Moreover, this would be the first evidence that late reencounter with an aversive social stimuli can trigger fear conditioning in socially defeated mice and support the validity of the CSDS to model clinical aspects of the post-traumatic stress disorder.

Keywords: chronic social defeat stress, depression, anxiety, social interaction, glutamate, gaba, synaptic plasticity, dendritic spine

1. INTRODUCTION

Major depression and anxiety are chronic disabling disorders, still unresolved in terms of etiology and response to treatment. Exposure to stressful life events can lead to a state of anxiety that is useful to avoid similar potentially dangerous situations in the future. However they can also trigger exaggerated states that over time produce these mental illnesses (Kendler et al., 2001; Hammen, 2005; Slattery et al., 2012). In animal models of chronic stress or elevated corticosterone concentrations, it has been extensively documented a marked dendritic atrophy and loss of synapses in various brain regions (Sousa et al., 2000, Vyas et al., 2002, Tata and Anderson, 2010). Moreover, behavioral alterations found in these animals as anhedonia and helplessness are closely associated with dendritic retraction in prefrontal cortex and hippocampus (Bessa et al., 2009). This suggests that anxiety and depressive-like behaviours induced by chronic stress are regulated, at least in part, by alterations in dendritic and synaptic structure within brain regions known to be involved in emotional processing (Leuner and Shors, 2012). These regions include the prefrontal cortex (PFC), the amygdale and the hippocampus (LeDoux, 2003, Adhikari et al., 2010, Canteras et al., 2010; Davis et al., 2010, Fanselow and Dong, 2010). Importantly, the PFC appears to be a modulator region important for emotional control by preventing the impact of high levels of stress over the amygdale (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng et al., 2010), whilst the amygdale might be a trigger region predominantly responsible for eliciting certain emotions (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009).

However, most of these stress studies include chronic exposure to adverse environmental stimuli or application of restraint stress. In recent years, models based on social conflict have been proposed to have clear advantages over environmental models because they involve a social form of stress, which may be relevant to stress-induced psychopathology in humans (Krishnan et al. 2008). Specifically they could be useful for studying a number of mental disorders, including major depression, generalized anxiety

disorder, post-traumatic stress disorder and drug abuse (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001; Selten and Cantor-Graae, 2005; Krishnan et al., 2008). In addition, observations of human aggression, bullying, social subordination and humiliation could be also modelled (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001).

The chronic social defeat stress (CSDS) model is based in the induction of "social subordination" caused by short periods of struggle and fellowship continued with a dominant animal. A number of hierarchical relations studies show that animals that have been "subordinated" by the dominant individuals of the same species suffer signs of stress (Lagerspetz y Tirri, 1961, Koolhaas et al., 1997) including social avoidance, anxiety, decreased grooming, hyperactivity and increased vulnerability to addiction (Krishnan et al., 2007, Rossi et al., 2008, Denmark et al., 2010; Slattery et al., 2012). Furthermore, significant changes in brain function, physiology, neurotransmitters and hormone levels have been reported (Bjorkqvist, 2001; Rohde, 2001, Allen and Badcock, 2003, Berton et al., 2006, Lutter et al., 2008, Wagner et al., 2011; Selten and Cantor-Graae, 2007).

Recent behavioural studies carried out in our laboratory have shown that CSDS induces anhedonia, helplessness, hyperactivity, anxiety, social avoidance and freezing in the long term that persisted, at least, up to one month after the termination of the stress procedure (Venzala et al., 2012a, 2012b). In addition, these studies suggested that CSDS might be affecting brain areas involved in depression and anxiety, such as the prefrontal cortex and the amygdale, in where, glutamatergic mechanism could play a key role.

Given these previous evidences, and following the same experimental design, here we aim to study the potential impact of social stress in the dendritic and synaptic structure in the prefrontal cortex and amygdala. Specifically we have studied the long-term effects of CSDS on spine density, and differential expression of glutamate and GABA subunits as well as synaptic plasticity markers. Finally, we investigate whether the expression of any

of these synaptic plasticity markers could be linked to maladaptive responses to different social stimuli.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals and drug treatment

Male C57BL/6 mice (Harlan, France, 8-10 weeks of age) were used. Food and water were available *ad libitum* for the duration of the experimental procedures unless otherwise specified. Animals were maintained in a temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity-controlled room ($55 \pm 2\%$) on a 12 h light-dark cycle (lights on at 08:00 h).

Experimental procedures and animal husbandry were conducted according to the principles of laboratory animal care as detailed in the European Communities Council Directive (2003/65/EC) Spanish legislation (Real decreto 1201/2005) and approved by the Ethical Committee of University of Navarra.

2.2. Experimental design

In a first experiment, mice (C57BL/6 male, 8-10 weeks of age) were exposed to the CSDS procedure for 10 days. Twenty-four hours after the last session, both control (n=14) and defeated mice (n=14) were housed individually. Mice were killed in a randomized order 30 days after the CSDS procedure. Brain were quickly removed and prepared for spine density measurement (n=6 mice/group) and western blotting (n=8 mice/group)

In a second experiment, mice (C57BL/6 male, 8-10 weeks of age, n=24) were exposed to the same CSDS procedure for 10 days and posterior individual housing. On the fourth week after the CSDS, animals were divided in two subgroups and exposed to two different social interaction tests. Specifically, one of them consisted in the exposure to a mouse of the same strain and the other to a dominant mouse (CD1). Mice were sacrificed two hours after the social interaction test, brains removed and prepared for western blotting studies (n=6 mice/group; 4 groups).

2.3. Chronic social defeat stress procedure

Mice (8-10 weeks of age) were housed in individual cages and allowed for two weeks to habituate before beginning experimentation. Chronic social defeat stress (CSDS) procedure was carried out using a similar method described by Tsankova et al., (2006). Briefly, experimental mice were submitted to social defeat stress for 10 consecutive days. Every day, each mouse was introduced into the home cage of an unfamiliar resident. Resident mice were CD1 retired breeders selected for their attack latencies reliably shorter than 30 s upon three consecutive screening tests. Once the experimental mouse had been physically defeated by 3 attacks, both animals (defeated and aggressor) were maintained in visual and olfactory contact for 24 hours using a metallic mesh dividing the resident home cage in two halves. During the 10 days control mice were individually housed in equivalent cages but with members of the same strain in the opposite half.

2.4. Social interaction test

This test measured the approach-avoidance behaviour towards an unfamiliar social target (Tsankova et al., 2006). The arena is a transparent plastic open field (45 x 45 x 45 cm) maintained in a very softly illuminated room (50 lux). Each experimental mouse was introduced into the open field and its trajectory was tracked for two consecutive sessions of 2.5 min. During the first session ("no target") the open field contained an empty metallic mesh cage (10.5 x 9 cm) located at one end of the field. During the second session ("target"), the conditions were identical except that a social target animal (an unfamiliar dominant CD1 male mouse or a mouse from the same strain) had been introduced into the cage. Between the two sessions, the experimental mouse was removed from the arena, and was placed back into its home cage for approximately one min. The time that the experimental mouse spent in the "interaction zone" (7 cm wide corridor surrounding the little metallic cage) both in the "no target" and "target" conditions were recorded (Ethovision XT 5.0 plus multiple body point module).

2.5. Spine density measurements

A modified Golgi-Cox method was used (Glaser and Van der Loos, 1981). Briefly, brains were removed from the skull and placed in Golgi-Cox solution (1% potassium dichromate, 1% mercury chloride, 0.8% potassium chromate) for 3 weeks. Brains were then washed in water and 90% ethanol, and 200- μm -thick slices were cut on a vibratome and soaked in 16% ammonia solution for 1 h. After fixation in 1% sodium thiosulfate solution, slices were dehydrated and mounted with DPX. Slides were coded before quantitative analysis, and the code was broken only after the analysis was completed. To be selected for morphometric analysis, Golgi-impregnated cells had to be located within the prefrontal cortex and amygdala (**Figure 1**) and have consistent impregnation throughout untruncated dendrites. Dendrites were classified into primary and secondary dendrites: dendrites directly originating from cell soma were classified as primary dendrites, and those originating from primary dendrites were classified as secondary. Each selected neuron was captured in a Nikon Eclipse E600 light microscope, and images were recorded at a resolution of 1,000–1,500 dots per inch (dpi) using a digital camera (Nikon DXM 1200F). For each mouse, between 5 and 7 neurons (8–15 secondary dendritic segments were measured per neuron, at least 30- μm long) were analyzed.

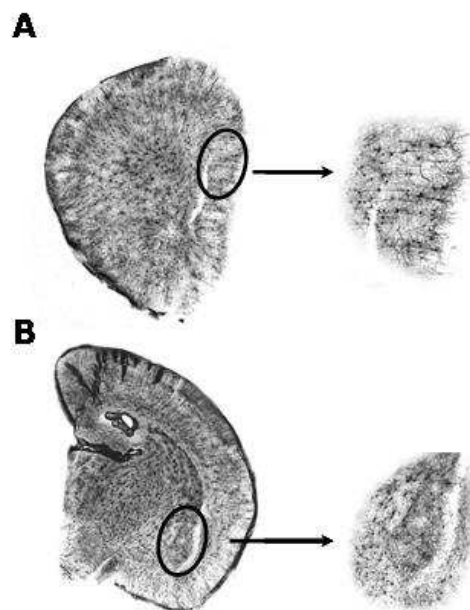


Figure 1: Coronal section of mouse brain: lines indicate areas of interest for the dendritic spine quantification. (A) The infra and prelimbic area of prefrontal cortex (PFC) and (B) the amygdala (AMYG).

2.6. Tissue preparation for western blotting

Animals were sacrificed by cervical dislocation and immediately the brain was removed, dissected for posterior western blot analysis.

For the dissection, an acrylic mouse brain slicer matrix was used with 1.0 mm coronal slice intervals (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA). Using a mouse brain atlas (Patrick et al., 2000), the infralimbic section of the PFC (bregma 2.20 mm through bregma 1.20 mm) 1 mm slice was then taken and dissected out bilaterally using a scalpel. For the amygdala (bregma -1.00 mm through bregma -2.00 mm), 1 mm slice was then taken and a 1 mm diameter area encompassing the lateral, basolateral, and central nucleus of the amygdala was dissected out bilaterally using a stainless steel punch tool (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA).

2.7. Western blot analysis

Prefrontal cortex and amygdala samples were homogenized in a cold lysis buffer containing protease inhibitors (0.2 M NaCl, 0.1 M HEPES, 10% glycerol, 200 mM NaF, 2 mM Na₄P₂O₇, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamide, 10 mg ml⁻¹ leupeptin, 400 U ml⁻¹ aprotinin). Homogenates were centrifuged at 14,000g for 20 min at 4°C, and the supernatant was aliquoted and stored at -80°C. Extracts were mixed with Laemmli's sample buffer boiled for 5 min. Assays were performed on a SDS-polyacrilamide gel (7.5%) and transfer to nitrocellulose membrane. The antibodies used are described in (**Table 2**). Immunopositive bands were visualized by a chemiluminescent method (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). The optical density of reactive bands visible on x-ray film was determined densitometrically. β -actin was used as internal control. Results were expressed as percentage of OD values of controls.

Table 2: Proteins analysed and primary antibody used in western blotting

Protein	Primary antibody (dilution)	Molecular weight (KDa)
NR1	Rabbit anti-NR1 (1:5000) ^f	120
NR2a	Rabbit anti-NR2a (1:5000) ^c	180
NR2b	Rabbit anti-NR2b (1:5000) ^f	166
GluR1	Rabbit anti-GluR1 (1:5000) ^e	106
GluR2/3	Rabbit anti-GluR2/3 (1:5000) ^f	110
GABAARα3	Rabbit anti GABAAR α 3 (1:5000) ^a	59
GABABR1	Rabbit anti GABAB1(1:5000) ^d	106
mGluR4	Rabbit anti-mGluR4 (1:5000) ^g	100
Pro-BDNF	Rabbit anti-pro-BDNF (1:1000) ^a	28
BDNF	Rabbit anti-BDNF (1:1000) ^a	14
Creb	Rabbit anti-Creb (1:1000) ^b	43
p-Creb	Rabbit anti-p-Creb (1:1000) ^a	43
Synaptophysin	Mouse anti-synaptophysin (1:5000) ^c	38
PSD95	Rabbit anti-PSD95 (1:5000) ^b	95
β-actin	Mouse anti- β -actin (1:10000) ^a	42

Commercial companies were: ^a Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA. ^b Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA. ^c Millipore, Billerica, Massachusetts, USA. ^d ABCAM, Cambridge, UK. ^e Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA. ^f Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA. ^g Chemicon International, Temecula, CA, USA.

2.8. Statistical analysis

Spine density and western-blot studies of the first experiment were analyzed using Student's *t*-test analysis (control *versus* CSDS).

Social interaction and freezing behavior as well as differential expression of synaptic plasticity markers two hours after exposure to the social interaction test were analyzed by two way ANOVA (stress, type of social target used) followed by Tukey *post-hoc* test.

3. RESULTS

3.1. Dendritic spine density:

In the long term, CSDS induced a significant increase (26.53%) in secondary dendrite's spine density in the infralimbic region of the medial prefrontal cortex (mPFC) ($p < 0.05$). Control mice showed an average of 3.44 ± 0.24 spines per $10 \mu\text{m}$ while animals exposed to CSDS had an average of 4.35 ± 0.16 spines per $10 \mu\text{m}$ (**Figure 2**).

On the contrary, a significant reduction (34.27%) of secondary dendrite's spine density was observed in the basolateral nucleus of the amygdala mice exposed to CSDS ($p < 0.05$). While control mice had an average of 6.2 ± 0.09 spines per $10 \mu\text{m}$, mice exposed to CSDS showed an average of 4.07 ± 0.27 spines per $10 \mu\text{m}$ (**Figure 2**).

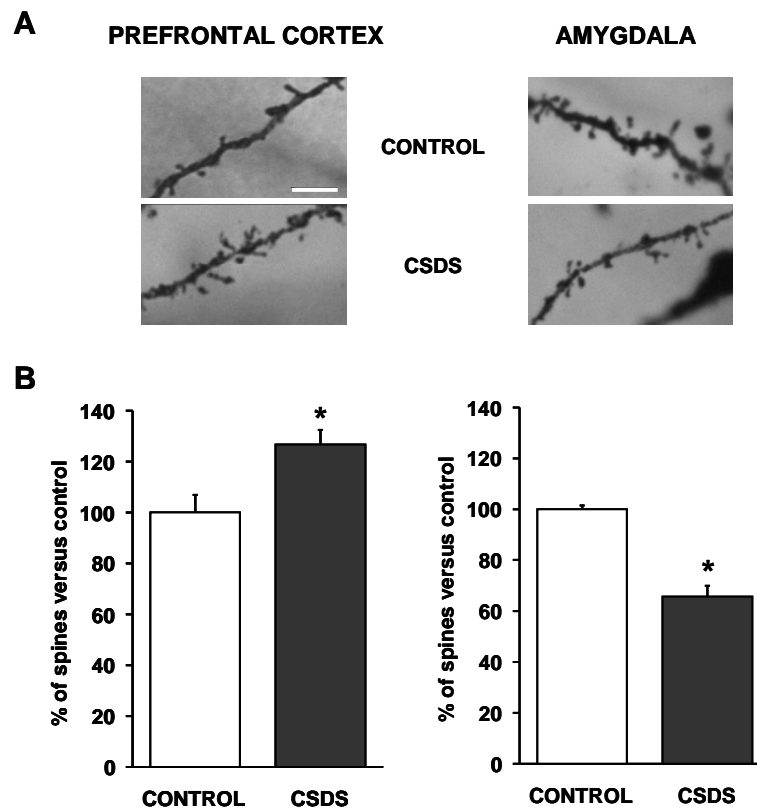


Figure 2: Effect of CSDS on dendritic spine formation in the prefrontal cortex and the amygdala. Data show mean \pm SEM ($n=6$ mice/group) of percentage of dendritic spine density compared to control mice (B) ($*p < 0.05$ vs. control) and the representative images of dendrites in those areas (A) (scale bar $5\mu\text{m}$).

3.2. Protein expression of different glutamate and GABA receptor subunits

While no changes in the expression of the different NMDA receptor subunits were found in the PFC, mice exposed to CSDS showed decrease ($p < 0.05$) of NMDA receptor subunit NR1 in the amygdale (**Figure 4A,B**).

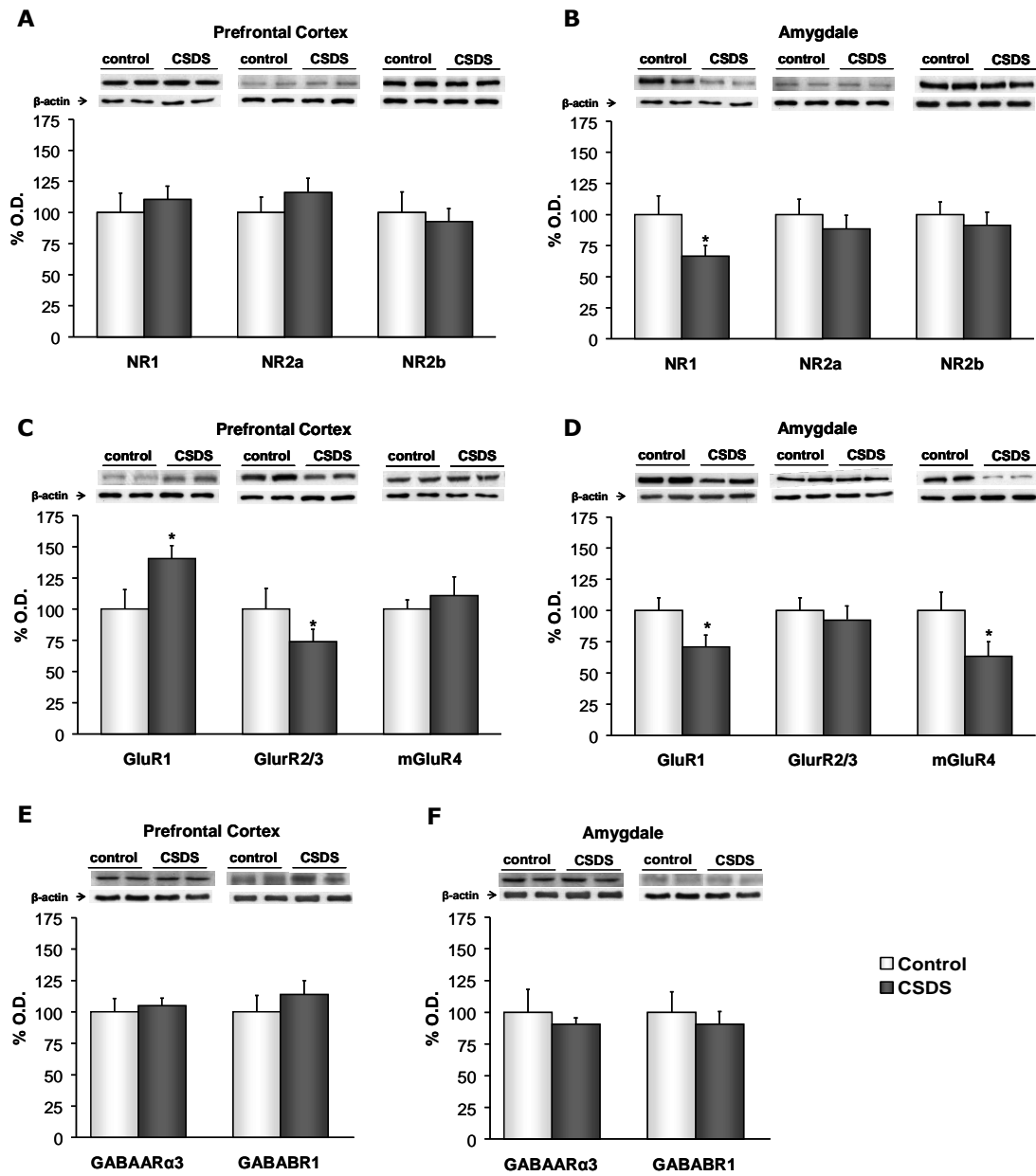
Analysis of AMPA receptor subunits revealed a significant upregulation ($p < 0.05$) of GluR1 and downregulation ($p < 0.05$) of GluR2/3 subunits in the PFC. However, in the amygdale, of GluR1 subunit appear to be downregulated ($p < 0.05$). In addition, in this area a downregulation ($p < 0.05$) of mGluR4 receptor was observed (**Figure 4C,D**).

No changes in the expression of GABA receptor subunits GABRAAR α 3 and GABABR1 were observed (**Figure 4E,F**).

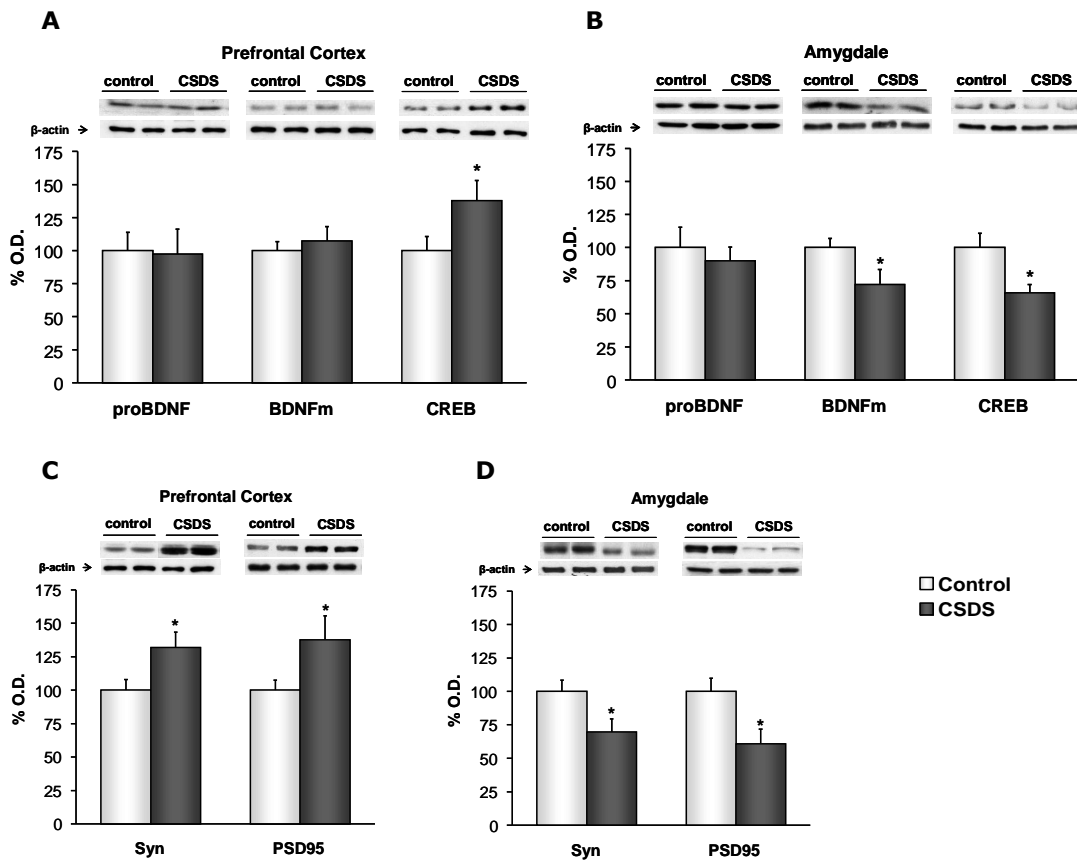
3.3. Protein expression of different neuronal plasticity markers

An opposite regulation of the cAMP response element-binding protein (CREB) was observed in the PFC and amygdale in mice exposed to CSDS. While in the PFC, CREB was upregulated ($p < 0.05$) in mice exposed to CSDS, in the amygdale, mature BDNF (mBDNF) and CREB showed a significant decrease ($p < 0.05$) (**Figure 5A,B**).

The opposite regulation of synaptophysin (Syn) and postsynaptic density protein 95 (PSD95) in the PFC and amygdale was also observed. Mice exposed to CSDS showed a significant increase ($p < 0.05$) in the PFC and a significant decrease ($p < 0.05$) in the amygdale (**Figure 5C,D**) of these proteins.



Figures 4: Effect of CSDS in the regulation of different proteins involved in the glutamate and GABA cycle in the prefrontal cortex and the amygdale. Data show mean \pm SEM ($n=8$ mice/group) of percentage of optical density compared to controls.



Figures 5: Effect of CSDS in the regulation of different proteins involved in the synaptic plasticity changes in the prefrontal cortex and the amygdale. Data show mean \pm SEM ($n=8$ mice/group) of percentage of optical density compared to controls.

3.4. Effect of CSDS on social interaction test using two different social stimuli

A significant interaction between stress and mouse strain used as social target was observed in the social interaction test ($F_{1,20} = 4.532$, $n=20$, $p<0.05$). Posterior analysis revealed that mice exposed to CSDS showed decrease social interaction with a mouse of the same strain ($p<0.01$) and that decrease was even higher in the presence of a dominant mouse ($p<0.01$). (**Figure 6A**)

In freezing time, a significant interaction between stress and mouse strain used as social target was also observed ($F_{1,20}=4.564$; $n=20$; $p<0.05$). Mice exposed to CSDS showed increased freezing behaviour in the presence of a dominant mouse compared to controls

($p < 0.01$) and compared to stressed mice in the presence of a mouse of the same strain ($p < 0.01$). (**Figure 6B**)

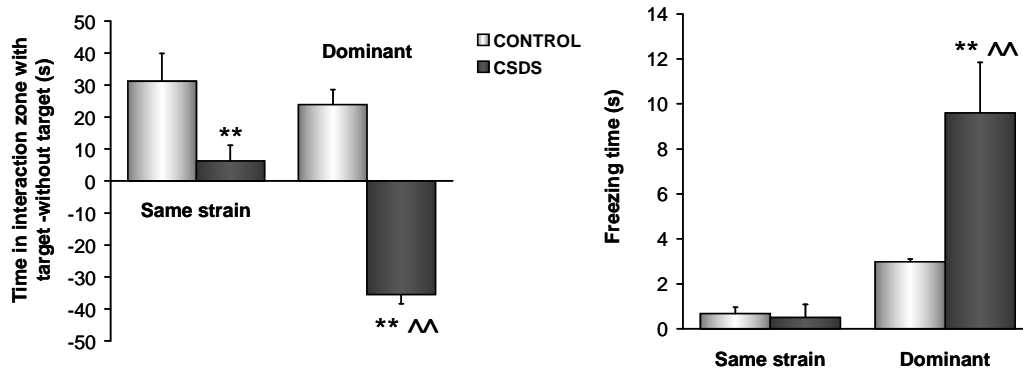


Figure 6: Effect of chronic social defeat stress and target mouse strain on the social behaviour (A) and freezing (B) in the social interaction test. Data show mean \pm SEM ($n=6$ mice/group) of the difference of time spent in the interaction zone in the presence and the absence of a target (mouse of the same strain or dominant mouse) (A) and freezing time in the presence of a target (B). (** $p < 0.01$ vs corresponding control, ^ $p < 0.01$ vs. corresponding same strain).

3.5. Expression of synaptic plasticity markers using two different social stimuli

In the measurement of pCREB/CREB ratio significant effect of stress was observed in the amygdala ($F_{1,20}=4.401$; $n=10$; $p < 0.05$). Mice exposed to CSDS showed an increase of pCREB/CREB ratio after the exposure to a dominant mouse (CD1) ($p < 0.05$) compared to control ones. In the hippocampus an interaction between stress and mouse strain used as social target was also observed ($F_{1,20}=9.400$; $n=10$; $p < 0.01$). Mice exposed to CSDS showed a significant increase in pCREB/CREB ratio after the exposure to a C57 mouse ($p < 0.05$). In addition, while no changes were observed in CSDS mice in the presence of a CD1 mouse, control mice in the presence of CD1 mouse also showed significant increase in pCREB/CREB ratio ($p < 0.05$) (**Figure 7A**).

Significant interaction between stress and social target was observed in the amygdala both in proBDNF ($F_{1,20}=8.362$; $n=10$; $p < 0.01$) and mature BDNF ($F_{1,20}=4.401$; $n=10$; $p < 0.05$) expression levels. In the presence of a dominant CD1 mouse, mice exposed to

CSDS showed a significant increase of pro BDNF and BDNF compared to corresponding control ($p < 0.05$; $p < 0.05$) and compared to the exposure to a C57 mouse ($p < 0.01$; $p < 0.05$) (**Figure 7B,C**).

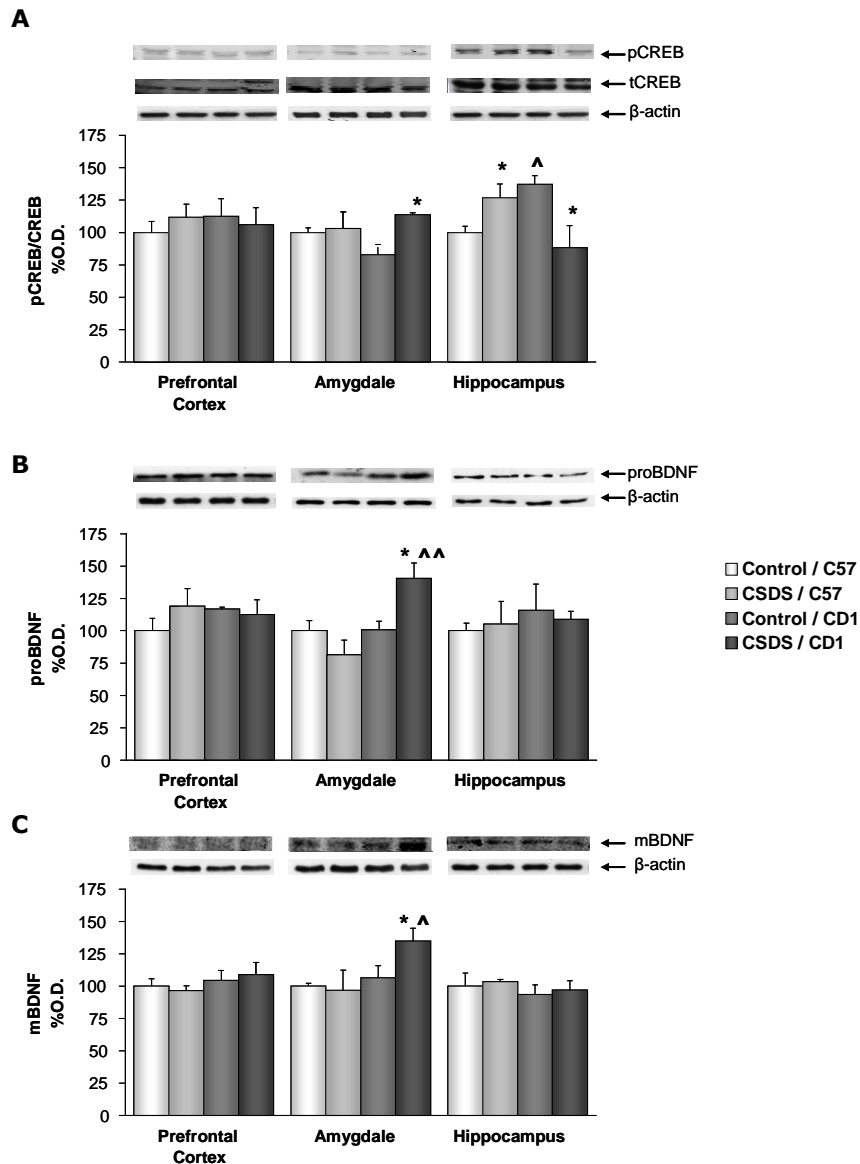


Figure 7: Effect of chronic social defeat stress and target mouse strain on the expression of synaptic plasticity markers in the prefrontal cortex, amygdale and hippocampus. Data show mean \pm SEM ($n=6$ mice/group) of the percentage of optical density compared to controls exposed to C57 mouse of the ratio pCREB/CREB (A), proBDNF (B) and mature BDNF (C). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. corresponding control; $\wedge p < 0.05$, $\wedge\wedge p < 0.01$ vs. corresponding C57).

4. DISCUSSION

In recent years, models based on social conflict have been proposed to have clear advantages over environmental models because they involve a social form of stress, which may be relevant to stress-induced psychopathology in humans (Krishnan et al. 2008). The aim of this work was to study the potential impact of social stress in the long term in dendritic and synaptic structures in brain regions known to be involved in emotional processing (Leuner and Shors, 2012) as the prefrontal cortex (PFC) and amygdale (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009). We have used a chronic social defeat stress model (CSDS) which has been previously shown to induce anhedonia, helplessness, hyperactivity, anxiety, social avoidance and freezing in the long term (Venzala et al., 2012a, 2012b). Moreover, we investigate whether maladaptive responses associated with different social avoidance behaviours could be linked to differential expression of any of these synaptic plasticity markers.

CSDS induces opposite changes in synaptic plasticity in the PFC and the amygdale

Alteration in dendritic spine density is a common symptom of multiple neuropsychiatric disorders (Penzes et al., 2011). In animal models of chronic stress or elevated corticosterone concentrations, it has been extensively documented a marked dendritic atrophy and loss of synapses in various brain regions (Sousa et al., 2000, Vyas et al., 2002, Tata and Anderson, 2010). Moreover, behavioral alterations found in these animals such as anhedonia and helplessness, has been associated to dendritic retraction in different brain areas (Bessa et al, 2009) including PFC and hippocampus. In our study, we observed that while in the amygdale dendritic spine density is decreased in mice exposed to CSDS when analysed one month after the stress procedure, in the PFC, the results were the opposite. The PFC appears to be a modulator region important for emotional control by preventing the impact of high levels of stress over the amygdale (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng et al., 2010). Thus, the apparent generation of new connections in the PFC and the retraction of spines in the amygdale one month after CSDS could be an adaptive mechanism directed to protect the amygdale

from new aversive experiences (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng et al., 2010).

Yet, although a larger number of spines seem to be representative of larger number of synapses, some of them could be silent. Silent synapses have been suggested to represent a functional reserve that may be important for the expression of neuroplasticity phenomena (Charpier et al., 1995). The conversion to active synapses implies the appearance of functional AMPA receptors either by *de novo* synthesis or by some modification which enables them (Issac et al., 1995; Liao et al., 1995). Besides the number of receptors, it is necessary the presence of certain proteins that anchor the receptor into the membrane, as PSD95 (Liu and Zukin, 2007) or some transcriptional factors that allowed the spine growth and formation such as the cAMP response element-binding (CREB) protein or the brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Jagasia et al., 2009).

We observed that mice exposed to CSDS had an overexpression of GluR1 and a downregulation of GluR2/3 subunits in the PFC. Given that GluR2 subunit is less permeable to calcium and therefore modulate negatively LTP formation, these studies agree with studies that show that LTP and synaptic strength is associated with an increase in spine density (Engert and Bonhoeffer 1999; Maletic-Savatic et al. 1999; Nägerl et al. 2004). Moreover, the increase of PSD95, synaptophysin and CREB proteins further support the idea that the new spines formed in the PFC are active.

On the other hand, in the amygdale, we observed a downregulation in spine density as well as of different glutamate receptor subunits and proteins involved in the spine formation. Our results disagree with previous studies showing a hypertrophy of the amygdale after exposure to chronic stress (Leuner and Shors, 2012), an increase in the spine density and of glutamate transmission (Brorson et al., 1994; Liu and Zukin, 2007). A possible explanation for this discrepancy could be that the excess of glutamate release following stress in the short-term could induce neurotoxicity and spine retraction in the long term (Hasbani et al., 2001). In addition, most of them have studied the impact of stress shortly after (usually one day or one week after) the stress exposure while in our study spine density was counted one month after the termination of the CSDS procedure.

Moreover, these studies were based on other forms of stress, not social, like for instance chronic exposure to adverse environmental stimuli or application of restraint stress. Indeed, it has been largely demonstrated that different forms of stress could generate different responses in the brain system (Engelmann et al., 2004, Miczek et al., 2008, Venzala et al., 2012a). On the other hand, as said before, a hypertrophy of the prefrontal cortex could exert an increased feedback control over the amygdala (Akirav and Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng et al., 2010).

Our data agree with clinical studies that rely on the importance of the dysfunctions of these regions in a variety of neuropsychiatric disorders. For instance, the activity (Drevets et al., 2008) and connectivity (Sheline et al., 2010) in the mPFC is known to be elevated in depression and normalized after effective treatment (Holtzheimer and Mayberg, 2011). Moreover, a hypoactivity of the amygdala have been described in children with mood disorders (Thomas et al., 2001, Beesdo et al., 2009). Furthermore, findings in anxious adolescents (Roberson-Nay et al., 2006; McClure et al., 2007; Monk et al., 2008) and in individuals at risk for anxiety disorders (Pérez-Edgar et al., 2007) show also altered amygdala function.

Synaptic plasticity markers of maladaptive response to social aversive stimuli in the amygdala

Social withdrawal is a psychiatric phenomenon common to different disorders in humans, such as depression, social phobia and post-traumatic stress disorder (Friedlander et al. 2004; Berton et al. 2006). Using the social interaction test, recent studies show that socially defeated mice become persistently aversive toward social stimuli (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Krishnan et al. 2007; Lutter et al. 2008; Covington et al. 2009; Wilkinson et al. 2009; Lagace et al. 2010). However, we have observed that most of these studies use a former aggressor as a social target (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006; Krishana et al. 2008). In a previous study carried out in our lab (Venzala et al., 2012a), we observed that the aversive response in the CSDS mice was clearly more robust when a former dominant was used as a social target in the wire cage than when used a mouse of the same strain. Moreover, CSDS mice

also experienced a marked freezing behaviour toward the dominant mouse. This study allowed us to discriminate between decreased social behaviour and the natural fearful reaction caused by a reencounter with a dominant strain. The behavioural data obtained here entirely agree with this previous study.

Here we have explored the possible regulation of some synaptic plasticity markers in control and CSDS mice following exposure to these two different social stimuli. Specifically, the expression of CREB and its phosphorylated form pCREB, BDNF and its immature form proBDNF were studied in the prefrontal cortex, hippocampus and amygdale.

In agreement with previous studies (Rattiner et al., 2004; Chhatwal et al., 2006), the amygdale appeared to be the brain region mainly affected by a fearful stimulus. Stressed mice exposed to the social interaction test using a dominant mouse exhibited an increased in pCREB/CREB ratio, proBDNF and mature BDNF in the amygdale compared to control groups as well as to CSDS mice exposed to a mouse of the same strain. Conversely, no changes were observed in the prefrontal cortex. These results suggest a maladaptive response in the amygdale of defeated mice towards an aversive stimulus and further support the role of this brain region in the integration of emotions (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009). Moreover, they match previous studies showing the role of BDNF within the amygdale acting through the TrkB receptor in learning of conditioned fear (Rattiner et al., 2004). Further, this would be the first evidence that a late reencounter with an aversive social stimuli can trigger fear conditioning in socially defeated mice and, as suggested in our previous studies (Venzala et al., 2012a), support the validity of CSDS to model clinical aspects of post-traumatic stress disorders.

Acknowledgements

We are very grateful to Ms Sandra Lizaso, Ms Mari Luz Muro and Mikel Aleixo, for her excellent technical assistance. This work was supported by Laboratories Servier S.L., the Ministry of Science and Innovation (SAF2008-02217, Spanish Government and SAF2011-27910)

References

- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2010) Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron*. 65:257-69
- Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast*. 30873:11
- Allen NB, Badcock PB (2003) The social risk hypothesis of depressed mood: evolutionary, psychosocial, and neurobiological perspectives. *Psychol Bull* 129: 887-913
- Beesdo K, Knappe S, Pine DS (2009) Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *Psychiatr Clin North Am*. 32:483-524
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864-8
- Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pego JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Front Behav Neurosci* 3:1.
- Bjorkqvist K (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav* 73: 435-42
- Brorson JR, Manziolillo PA, Miller RJ (1994) Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*. 14:187-97
- Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, Carobrez Ade P, Guimarães FS (2010) Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci*. 2:77-96
- Charpier S, Behrends JC, Triller A, Faber DS, Korn H (1995) "Latent" inhibitory connections become functional during activity-dependent plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:117-20.
- Chhatwal JP, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2006) Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nat Neurosci*. 9:870-2

- Covington HE 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty S.J., Nestler EJ (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci.* 29, 11451-60
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C (2010) Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology.* 35:105-35
- Denmark A, Tien D, Wong K, Chung A, Cachat J, Goodspeed J, Grimes C, Elegante M, Suci C, Elkhayat S, Bartels B, Jackson A, Rosenberg M, Chung KM, Badani H, Kadri F, Roy S, Tan J, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I, Gilder T, Kalueff AV (2010) The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behav Brain Res* 208: 553-9
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct.* 213:93-118
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25:132-49
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature.* 399:66-70
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* 65:7-19
- Friedlander AH, Friedlander IK, Marder SR (2004) Posttraumatic stress disorder: psychopathology, medical management, and dental implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:5-11
- Furmark T (2009) Neurobiological aspects of social anxiety disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 46:5-12

- Glaser EM, Van der Loos H (1981) Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods*. 4:117-25.
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol*. 1:293-319
- Hasbani MJ, Schlieb ML, Fisher DA, Goldberg MP (2001) Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci*. 21:2393-403
- Holtzheimer PE, Mayberg HS (2011) Stuck in a rut: Rethinking depression and its treatment. *Trends Neurosci* 34:1–9 Thomas
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*. 15:427-34
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC (2009) GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 29:7966-77
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001) Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 15:582-6
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl*. 640, 69-72
- Krishnan V, Berton O, Nestler E (2008) The use of animal models in psychiatric research and treatment. *Am J Psychiatry*. 165, 1109
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131: 391-404
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL,

- Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131: 391-404
- Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, Nestler EJ, Krishnan V, Eisch AJ (2010) Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4436-41
- Lagerspetz K, Tirri R (1961) The induction of physiological tolerance to promazine in mice. *Ann Med Exp Biol Fenn Suppl* 5: 1-24
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8:413-26
- LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol.* 23:727-38
- Leuner B, Shors TJ (2012) Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience.* (Epub ahead of print)
- Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature.* 375:400-4
- Liu SJ, Zukin RS (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30:126-34
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM (2008) The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci.* 11, 752-3
- Maeng LY, Waddell J, Shors TJ (2010) The prefrontal cortex communicates with the amygdala to impair learning after acute stress in females but not in males. *J Neurosci.* 30:16188-96
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science.* 283:1923-7

- McClure EB, Parrish JM, Nelson EE, Easter J, Thorne JF, Rilling JK, Ernst M, Pine DS (2007) Responses to conflict and cooperation in adolescents with anxiety and mood disorders. *J Abnorm Child Psychol.* 35:567-77
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE 3rd (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.* 120:102-28
- Monk CS, Telzer EH, Mogg K, Bradley BP, Mai X, Louro HM, Chen G, McClure-Tone EB, Ernst M, Pine DS (2008) Amygdala and ventrolateral prefrontal cortex activation to masked angry faces in children and adolescents with generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 65:568-76
- Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron.* 44:759-67
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 14:285-93
- Pérez-Edgar K, Roberson-Nay R, Hardin MG, Poeth K, Guyer AE, Nelson EE, McClure EB, Henderson HA, Fox NA, Pine DS, Ernst M (2007) Attention alters neural responses to evocative faces in behaviorally inhibited adolescents. *Neuroimage.* 35:1538-46
- Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci.* 24:4796-806
- Roberson-Nay R, McClure EB, Monk CS, Nelson EE, Guyer AE, Fromm SJ, Charney DS, Leibenluft E, Blair J, Ernst M, Pine DS (2006) Increased amygdala activity during successful memory encoding in adolescent major depressive disorder: An fMRI study. *Biol Psychiatry.* 60:966-73
- Rohde P (2001) The relevance of hierarchies, territories, defeat for depression in humans: hypotheses and clinical predictions. *J Affect Disord* 65: 221-30
- Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G, Usiello A, Centonze D (2008) Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci.* 28, 7284-92

- Selten JP, Cantor-Graae E (2005) Social defeat: risk factor for schizophrenia? *Br J Psychiatry* 187: 101-2
- Selten JP, Cantor-Graae E (2007) Hypothesis: social defeat is a risk factor for schizophrenia? *Br J Psychiatry Suppl.* 51:s9-12
- Sheline YI, Price JL, Yan Z, Mintun MA (2010) Resting-state functional MRI in depression unmasks increased connectivity between networks via the dorsal nexus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11020–11025
- Slattery DA, Uschold N, Magoni M, Bär J, Popoli M, Neumann ID, Reber SO (2012) Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology.* 37:702-14
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience.* 97:253-66
- Tata DA, Anderson BJ (2010) The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiol Behav.* 99:186-93
- Thomas KM, Drevets WC, Dahl RE, Ryan ND, Birmaher B, Eccard CH, Axelson D, Whalen PJ, Casey BJ (2001) Amygdala response to fearful faces in anxious and depressed children. *Arch Gen Psychiatry.* 58:1057-63
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9: 519-25
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Delagrangé P, Tordera RM (2012a) Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology.* (Epub ahead of print)
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Tordera RM (2012b) Social versus environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol.* (Epub ahead of print)

- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 22:6810-8.
- Wagner KV, Wang XD, Liebl C, Scharf SH, Müller MB, Schmidt MV (2011) Pituitary glucocorticoid receptor deletion reduces vulnerability to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology.* 36,579-87
- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthall W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ (2009) Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci.* 29, 7820-32

CAPÍTULO 6

CAPÍTULO 6

Discusión general

La depresión mayor y la ansiedad son trastornos psiquiátricos crónicos, aún sin resolver en cuanto a su etiología y respuesta al tratamiento. Así, la depresión constituye una de las patologías psiquiátricas más frecuentemente diagnosticadas en los países desarrollados alcanzando unas cifras de incidencia del 5% en la población europea. Junto a ella, la ansiedad es también una patología muy frecuente que puede manifestarse sola o de manera comórbida con la depresión u otras enfermedades llegando a alcanzar una prevalencia del 20%. Teniendo en cuenta que se trata de enfermedades crónicas, estas cifras desvelan además de una enorme carga social en términos de sufrimiento humano para pacientes y familiares, un elevado coste económico para los países desarrollados.

Se acepta que la etiología de la depresión y la ansiedad está bajo la influencia ambiental y genética. Entre los factores ambientales destaca el estrés (Lloyd, 1980; Kessler, 1997; Paykel, 2003; Hammen, 2005; Pittenger y Duman, 2008) y entre sus diversas formas, el estrés crónico parece un mejor vaticinador de los síntomas depresivos y ansiosos que el estrés agudo (McGonagle y Kessler, 1990). Así, la exposición a eventos estresantes de la vida puede llevar a un estado de ansiedad que si bien es útil para evitar situaciones similares potencialmente peligrosas en el futuro, también pueden desencadenar estados exagerados que a largo plazo deriven en estas patologías neuropsiquiátricas (Kessler, 1997; Kendler y col., 1999; 2001; Mazure y col., 2000; Hammen, 2005; Monroe y col., 2006; Pittenger y Duman, 2008; Slattery y col., 2012).

Generalmente, la investigación sobre el estrés crónico se ha centrado en sus efectos sobre la salud, y en los factores biológicos y psicológicos implicados. Sin embargo, recientemente se está prestando atención al estudio sobre la naturaleza de los agentes estresantes y, en cómo estos pueden influir en la diferente sintomatología que presentan los pacientes. Así, se ve la necesidad de estudiar separadamente la influencia de un estrés crónico de tipo ambiental (ruido, hacinamiento, polución, catástrofes naturales, trabajo por turnos, etc.) y de tipo social, al cuál muchas personas son frecuentemente sometidas por sus congéneres como situaciones de agresividad, subordinación, humillaciones o bullying entre otras.

Por ello, a nivel experimental, en las últimas décadas se han desarrollado modelos de estrés crónico en ratón con la intención de mimetizar situaciones de la vida cotidiana en personas adultas. Algunos se basan en el estrés ambiental, como el estrés crónico

suave (chronic mild stress, CMS); mientras que otros se basan más en factores sociales como el estrés crónico de derrota social (chronic social defeat stress, CSDS). Sin embargo si bien numerosos estudios han confirmado la validez del CMS, la validez aparente y predictiva del CSDS como modelo de depresión no está en absoluto consolidada ni a nivel conductual ni neurobiológico.

De acuerdo con estas consideraciones, los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral han sido estudiar a nivel experimental primeramente la relevancia del tipo de estrés crónico, social o ambiental, para el desarrollo de distintas enfermedades neuropsiquiátricas. En el marco de este objetivo, nos proponemos estudiar la relevancia del estrés crónico social para el desarrollo de la depresión clínica.

Para ello, en primer lugar se comenta el estudio comparativo de las alteraciones conductuales y neuroquímicas inducidas por el modelo ambiental CMS y social CSDS. En segundo lugar se comenta el estudio sobre la validez del CSDS como modelo animal de depresión. Concretamente, se discutirán aquellos estudios dirigidos a discriminar el fenotipo conductual inducido por la subordinación social, determinar la validez predictiva del modelo utilizando distintas clases de antidepresivos, así como su interacción con posibles factores biológicos de vulnerabilidad aumentada al estrés. Por último se comentarán los efectos del CSDS sobre marcadores de plasticidad sináptica, en distintas regiones implicadas en la integración de procesos afectivos como la corteza prefrontal y la amígdala.

1. ESTRÉS SOCIAL VERSUS ESTRÉS AMBIENTAL

1.1. Efectos conductuales

En primer lugar se evaluó el efecto del ECS y el CSDS sobre una batería de test conductuales entre los que se incluyen la valoración de la anhedonia, desesperación conductual, actividad motora, ansiedad, interacción social y valoración del estado cognitivo.

La anhedonia, o la disminución de la capacidad de experimentar placer, es un síntoma principal de los trastornos depresivos (Willner, 1991). En los roedores, muchos estudios apoyan que la medida del consumo de sacarosa es paradigma válido para medir comportamiento de tipo anhedónico (Willner y col., 2005). Además, la desesperación conductual se considera un síntoma central de la depresión (Seligman, 1975) y el paradigma más utilizado en los roedores para medir este comportamiento es el test de natación forzada o el test de Porsolt (Porsolt y col., 1977).

La ansiedad es una característica comórbida frecuente de la depresión (Kessler y col., 2007) y por lo tanto la presencia de síntomas de ansiedad en ratones crónicamente estresados no es sorprendente. Se utilizaron dos paradigmas validados para la ansiedad etológica como son el laberinto elevado y el test de supresión de comida.

La evitación social es un fenómeno común a diferentes trastornos psiquiátricos en los seres humanos, como la depresión, fobia social y trastorno de estrés postraumático (Friedlander y col., 2004;.. Berton y col., 2006). Este comportamiento lo evaluamos mediante el test de la interacción social.

Por último, muchos estudios sugieren que el deterioro cognitivo es un síntoma central de la depresión y que la terapia con antidepresivos puede mejorar la función cognitiva (Austin y col., 1999, 2001; Levkovitz y col., 2002; Bearden y col., 2006; Sheline y col., 2006). Así, estudios clínicos recientes han demostrado que el déficit cognitivo asociado a la depresión mayor varía en función del estado depresivo (Airaksinen y col., 2004). Por ello, se ha investigado comparativamente si el CMS y/o el CSDS afectan significativamente a la memoria de reconocimiento mediante el test de reconocimiento de nuevo objeto.

En el presente trabajo hemos observado que los tipos de estrés crónico, social y ambiental, inducen un fenotipo conductual distinto en los ratones. En concreto, los ratones sometidos al estrés ambiental (CMS) presentaron anhedonia, desesperación conductual y un claro deterioro de la memoria de reconocimiento, resultados que corroboran con estudios anteriores (Elizalde y col., 2008). Por otro lado, el estrés social (CSDS) indujo síntomas centrales de la depresión, como anhedonia a largo plazo, así como otros aspectos clínicos altamente comórbidos con la depresión mayor como la ansiedad y la evitación social. Además, este modelo fue capaz de generar otras alteraciones como hiperactividad, miedo y cambios en el peso corporal.

Estos datos nos sugieren que ambos modelos generan un perfil conductual diferente en los roedores. Así, parece que el CMS induce un perfil más tipo depresivo mientras que el CSDS estaría generando una conducta relacionada con aspectos clínicos comunes a distintos trastornos como la depresión, la ansiedad generalizada y/o el trastorno de estrés postraumático.

1.2. Efectos neuroquímicos

Este trabajo muestra que los tipos de estrés crónico, social y ambiental, inducen diferentes perfiles neuroquímicos en la corteza prefrontal y en el tronco encefálico.

En la corteza prefrontal, se observó una disminución de GABA tanto en los ratones sometidos a CMS, como a CSDS, que conducen a un aumento en el cociente excitatorio-inhibitorio (glutamato/GABA). Esta disminución de los niveles de GABA ha sido ya señalada en el CMS (Shalaby y Kamal, 2009) o el aislamiento social (Pibiri y col., 2008; Bortolato y col., 2011). Además, estudios clínicos también han demostrado que este desequilibrio se asocia con el estado anhedónico en pacientes deprimidos (Sanacora y col., 2004; Gabbay, 2011) y se normaliza tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Sanacora y col., 2002).

Por otro lado, solo el CSDS indujo en la corteza prefrontal una clara disminución de los niveles de dopamina (DA), lo cual, también podría contribuir al desarrollo de la anhedonia en este modelo (Miczek y col., 2011). Por otra parte, la disminución de los niveles corticales de dopamina se ha relacionado con la hiperactividad (Watt y col 2009) y

la ansiedad (Biggio y col 1990; Broersen y col 1995). Además, nuestros resultados coinciden con estudios previos que reportan una disminución de la dopamina cortical después de la derrota social a largo plazo (Watt y col., 2009). También, algunos estudios han mostrado una disminución de la función dopaminérgica en la corteza prefrontal en pacientes con diferentes trastornos de ansiedad social (Richard y col., 1996; Heydari y Mellédo, 2002).

Los núcleos del rafe son la principal fuente de 5-HT en el cerebro anterior y una disfunción de este sistema ha sido tradicionalmente ligada a la depresión mayor (Michelsen y col., 2008; Lowry y col., 2008). En nuestros estudios, se observó que los niveles de 5-HT no se vieron afectados significativamente por el estrés en el tronco cerebral. Sin embargo, el CMS indujo un aumento a largo plazo de glutamato y una disminución de GABA, que condujo a un aumento del cociente excitatorio-inhibitorio. De acuerdo con estudios previos, una excesiva regulación glutamatérgica sobre la actividad ascendente 5-HT en los núcleos del rafe podría explicar la desesperación conductual a largo plazo que presentan los ratones sometidos a CMS (Celada y col., 2001; Kirby y col., 2007; Hammack y col., 2012).

Es su conjunto, se sugiere que estas diferencias neuroquímicas pueden ser responsables de los distintos perfiles de comportamiento observados de los dos modelos. Así, proponemos que mientras que los síntomas más depresivos podrían estar asociados a una alteración en el cociente excitatorio/inhibitorio en la corteza prefrontal y el tronco del encéfalo, la ansiedad inducida por el CSDS podría estar más asociada a alteraciones específicas de las vías dopaminérgicas implicadas en los procesos de recompensa.

2. ESTRÉS CRÓNICO SOCIAL: VALIDEZ DEL MODELO DE CSDS

2.1. Aislamiento *versus* derrota social

El protocolo de CSDS a largo plazo implica someter a los animales a cuatro semanas de aislamiento en jaulas individuales tras el proceso de derrota social. Este aislamiento indujo de por sí anhedonia, desesperación conductual, ansiedad y disminución de la sociabilidad en los roedores lo cual corrobora que el aislamiento social es también un modelo de depresión (Wallace y col., 2009). Sin embargo, excepto la desesperación conductual, las demás conductas fueron significativamente más alteradas en los ratones que habían sido sometidos a CSDS lo que sugiere que la subordinación social es una forma de estrés más severa.

2.2. Validez predictiva del CSDS

En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento crónico con antidepresivos de distinta acción farmacológica como fluoxetina, venlafaxina y tianeptina sobre las alteraciones conductuales inducidas por el CSDS y observamos que la validez predictiva del CSDS como modelo de depresión queda cuestionada. Por un lado, la fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina), muy valorada en la clínica (Schoevers y col., 2008), no fue capaz de revertir ninguna alteración generada por el CSDS. Por otro lado, la venlafaxina (inhibidor de la recaptación de serotonina) aunque revirtió la mayoría de la sintomatología generada por el estrés, no fue capaz de revertir la marcada evitación social que presenta este modelo. Por último, la tianeptina (modulador glutamatérgico) fue el único tratamiento que revirtió parcialmente la evitación social. Por el contrario, ésta no pudo revertir las conductas tipo depresivas como la anhedonia y la desesperación conductual.

Por otro lado, la diferente acción de los antidepresivo noradrenérgico venlafaxina y glutamatérgico tianeptina sobre las conductas depresivas y de evitación social respectivamente, evidencia que los mecanismos neuroquímicos que sustentan estos comportamientos no están relacionados entre sí.

2.3. Interpretación del test de la interacción social

La evitación social es un fenómeno común a diferentes trastornos psiquiátricos en los seres humanos, como la depresión, fobia social y trastorno de estrés postraumático (Friedlander y col., 2004; Berton y col., 2006). Utilizando la prueba de la interacción social, diversos estudios muestran que los ratones socialmente derrotados presentan una aversión persistente hacia los estímulos sociales (Berton y col., 2006; Tsankova y col., 2006; Krishnan y col., 2007; Lutter y col., 2008; Covington y col., 2009; Wilkinson y col., 2009; Lagace y col., 2010). Sin embargo, estos estudios no examinan la concurrencia de evitación social con otros comportamientos típicamente depresivos como la anhedonia o la desesperación conductual. Además, mientras que algunos estudios utilizan un ratón dominante como individuo de interacción otros utilizan un ratón de la misma especie (Berton y col., 2006; Tsankova y col., 2007; Krishnan y col., 2008).

En nuestro estudio se realizó el test de la interacción social en presencia de un ratón de la misma especie y de un ratón dominante, lo cual nos permitió discriminar adecuadamente entre la evitación social causada por los efectos del CSDS o la causada por una reacción natural de miedo a reencontrarse con un ratón dominante.

Sin embargo, como hemos mencionado en el punto anterior, la falta de eficacia de los antidepresivos en revertir la evitación social, iría en contra de algunos estudios recientes (Berton y col., 2006; Tsankova y col., 2006; Krishnan y col., 2008; Lutter y col., 2008; Wilkinson y col., 2009; Covington y col., 2009; Lagace y col., 2010) que se basan sólo en la prueba de la interacción social como un paradigma válido para medir el comportamiento de tipo depresivo en ratones derrotados.

2.4. Interacción del estrés social con niveles disminuidos de VGLUT1

Los ratones heterocigóticos para el transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1+/-) son un modelo de vulnerabilidad genética aumentada a la conducta depresiva inducida por el estrés ambiental (García-García y col., 2009). En nuestro modelo, los ratones VGLUT1+/- sometidos a estrés social no mostraron empeoramiento

en síntomas de depresión o ansiedad, pero sí mostraron una marcada vulnerabilidad a la evitación social inducida por el CSDS. Además se observó una disminución de RNA mensajero de VGLUT1 en la amígdala, región clásicamente implicada en la conducta social (Chhatwal y col., 2006), en ratones salvajes sometidos a CSDS. Estos estudios sugieren que la disminución del VGLUT1 en la amígdala podría ser un factor biológico de vulnerabilidad a la evitación social tras la exposición a estrés social. Por otro lado, estos estudios evidencian una vez más la diferente acción del estrés ambiental y el social sobre el sistema nervioso central

En su conjunto este estudio sugiere que el CSDS no es un modelo puro de depresión sino que más bien modela aspectos clínicos comunes a la depresión, ansiedad generalizada o al trastorno de estrés postraumático. Además el CSDS podría afectar regiones cerebrales implicadas en la conducta social como la amígdala, donde, mecanismos glutamatérgicos podrían jugar un papel clave.

3. REGULACIÓN DE MARCADORES DE PLASTICIDAD SINÁPTICA POR EL ESTRÉS SOCIAL

3.1. Efecto del CSDS a largo plazo

La alteración en la densidad de las espinas dendríticas es un síntoma común de múltiples trastornos neuropsiquiátricos (Penzes y col., 2011). En modelos animales de estrés crónico o de altas concentraciones de corticosterona, ha sido ampliamente documentada una marcada atrofia dendrítica y pérdida de sinapsis en varias regiones del cerebro (Sousa y col., 2000, Vyas y col., 2002, Tata y Anderson, 2010). Por otra parte, las alteraciones de comportamiento que se encuentran en estos animales, como la anhedonia y la desesperación conductual, se ha asociado a la retracción dendrítica en diferentes áreas del cerebro (Bessa y col, 2009) como la corteza prefrontal y el hipocampo. En nuestro estudio, se observó que mientras que la densidad de las espinas dendríticas en la amígdala estaba disminuida un mes después de la exposición al CSDS, en la corteza prefrontal, contrariamente, los resultados mostraron un aumento. La corteza prefrontal es un modulador importante de las emociones y se ha visto que actúa previniendo los efectos deletéreos de un estrés elevado en la amígdala (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng et al, 2010). Por lo tanto, la generación de nuevas conexiones en la corteza prefrontal y la retracción de espinas en la amígdala un mes después del CSDS podría ser un mecanismo de adaptación dirigido a proteger la amígdala de las nuevas experiencias adversas (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng y col., 2010).

También observamos que los ratones expuestos a CSDS presentaron una sobre-expresión de GluR1 y una baja regulación de subunidades GluR2/3 en la corteza prefrontal. Teniendo en cuenta que GluR2 es menos permeable al calcio y que modula negativamente la potenciación a largo plazo, nuestros resultados concuerdan con los estudios previos que asocian un aumento de la fortaleza sináptica con un aumento en la densidad de espinas dendríticas (Engert y Bonhoeffer de 1999; Maletic-Savatic et al 1999; Nägerl et al. 2004). Por otra parte, el aumento de las proteínas PSD95, sinaptofisina y CREB apoyan la idea de que las nuevas espinas formadas en la corteza prefrontal son maduras.

Por otro lado, en la amígdala, se observó una disminución de la densidad de espinas, así como de diferentes subunidades de receptores de glutamato y proteínas implicadas en la maduración de las mismas. Estos resultados no coinciden con estudios previos que muestran una hipertrofia de la amígdala después de la exposición al estrés crónico (Leuner y Shors, 2012), así como un aumento en la densidad y de la transmisión del glutamato (Brorson y col., 1994; Liu y Zukin, 2007). Una posible explicación para esta discrepancia podría ser que el exceso de liberación de glutamato que se produce a corto plazo podría inducir neurotoxicidad llevando a una retracción de espinas a largo plazo (Hasbani y col., 2001). Por otra parte, en estos estudios se utilizaron otras formas de estrés no sociales, las cuales podrían generar una respuesta diferente en el cerebro (Engelmann y col., 2004, Miczek y col., 2008, Venzala y col., 2012b). Además, la mayoría de estos trabajos han estudiado el impacto del estrés crónico, poco después (generalmente un día o una semana después) de la finalización de éste, mientras que nuestro estudio se realizó un mes después de la terminación del procedimiento de CSDS. Por otro lado, como se ha explicado anteriormente, una hipertrofia de la corteza prefrontal podría ejercer un mayor control sobre la amígdala (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009; Maeng y col., 2010) disminuyendo su actividad.

Por último, nuestros datos concuerdan con estudios clínicos que apoyan la importancia de una alteración de estas regiones en una variedad de trastornos neuropsiquiátricos. Por ejemplo, la actividad (Drevets y col., 2008) y la conectividad en (Sheline y col., 2010) la corteza prefrontal media está elevada en la depresión y es normalizada después de un tratamiento eficaz (Holtzheimer y Mayberg, 2011). Por otra parte, se ha descrito también una hipoactividad en la amígdala de niños con depresión (Thomas et al, 2001, Beesdo y col., 2009). Además, estudios con adolescentes ansiosos (Roberson-Nay y col., 2006; McClure et al, 2007; Monk et al, 2008) o en pacientes con riesgo de trastornos de ansiedad (Pérez-Edgar y col., 2007) muestran también alteración de la función de la amígdala.

3.2. Identificación de marcadores de plasticidad sináptica de respuesta alterada a un estímulo social aversivo

Los ratones estresados expuestos en la prueba de la interacción social a un ratón dominante, mostraron un incremento de pCREB/CREB, proBDNF y BDNF maduro en la amígdala en comparación con el resto de grupos. Estos resultados sugieren una respuesta alterada de la amígdala de los ratones derrotados hacia un estímulo aversivo y además apoya el papel de esta región del cerebro en la integración de las emociones (Akirav y Maroun, 2007; Furmark, 2009). Además, estos resultados coinciden con estudios anteriores que muestran el papel del BDNF de la amígdala, actuando sobre el receptor TrkB, en el aprendizaje de miedo condicionado (Rattiner y col., 2004; Chhatwal y col., 2006).

Por otra parte, esta sería la primera evidencia de que reencuentros con estímulos sociales aversivos pueden desencadenar miedo condicionado en ratones socialmente derrotados lo cual, como se sugiere en estudios anteriores (Venzala y col., 2012a), apoyarían la validez del CSDS para modelizar aspectos clínicos del trastorno de estrés postraumático.

BIBLIOGRAFÍA

- Airaksinen E, Larsson M, Lundberg I, Forsell Y (2004) Cognitive functions in depressive disorders: evidence from a population-based study. *Psychol Med.* 34, 83-91
- Akirav I, Maroun M (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast.* 30873:11
- Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (2001) Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. *Br J Psychiatry.* 178, 200-6
- Austin MP, Mitchell P, Wilhelm K, Parker G, Hickie I, Brodaty H, Chan J, Eyers K, Milic M, Hadzi-Pavlovic D (1999) Cognitive function in depression: a distinct pattern of frontal impairment in melancholia? *Psychol Med.* 29, 73-85
- Bearden CE, Glahn DC, Monkul ES, Barrett J, Najt P, Villarreal V, Soares JC (2006). Patterns of memory impairment in bipolar disorder and unipolar major depression. *Psychiatry Res.* 142, 139-50
- Beesdo K, Knappe S, Pine DS (2009) Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *Psychiatr Clin North Am.* 32:483-524
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864-8
- Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pego JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Front Behav Neurosci* 3:1.
- Biggio G, Concas A, Corda MG, Giorgi O, Sanna E, Serra M (1990) GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol Ther.* 48, 121-42
- Bortolato M, Devoto P, Roncada P, Frau R, Flore G, Saba P, Pistritto G, Soggiu A, Pisanu S, Zappala A, Ristaldi MS, Tattoli M, Cuomo V, Marrosu F, Barbaccia ML (2011)

- Isolation rearing-induced reduction of brain 5 α -reductase expression: relevance to dopaminergic impairments. *Neuropharmacology*. 60, 1301-8
- Broersen LM, Heinsbroek RP, de Bruin JP, Laan JB, Joosten RN, Olivier B (1995) Local pharmacological manipulations of prefrontal dopamine affect conflict behaviour in rats. *Behav Pharmacol*. 6, 395-404
- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci*. 21, 9917-29
- Chhatwal JP, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2006) Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nat Neurosci*. 9:870-2
- Covington HE 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty S.J., Nestler EJ (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci*. 29, 11451-60
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*. 213:93-118
- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM, (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment *Psychopharmacology* 199, 1-14
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*. 25:132-49
- Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 399:66-70
- Friedlander AH, Friedlander IK, Marder SR (2004) Posttraumatic stress disorder: psychopathology, medical management, and dental implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:5-11

- Furmark T (2009) Neurobiological aspects of social anxiety disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 46:5-12
- Gabbay V, Mao X, Klein RG, Ely BA, Babb JS, Panzer AM, Alonso CM, Shungu DC (2012) Anterior cingulate cortex γ -aminobutyric acid in depressed adolescents: relationship to anhedonia. *Arch Gen Psychiatry.* 69: 139-49.
- Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Matrov D, Harro J, Wojcik SM, Venzala E, Ramírez MJ, Del Rio J, Tordera RM (2009) Increased vulnerability to depressive-like behavior of mice with decreased expression of VGLUT1. *Biol Psychiatry.* 66, 275-82
- Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR (2012) Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: implications for PTSD and mood disorders. *Neuropharmacology.* 62, 565-75
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* 1: 293-319
- Hasbani MJ, Schlieff ML, Fisher DA, Goldberg MP (2001) Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci.* 21:2393-403
- Heydari B, Le Mellédo JM (2002) Low pregnenolone sulphate plasma concentrations in patients with generalized social phobia. *Psychol Med.* 32, 929-33
- Holtzheimer PE, Mayberg HS (2011) Stuck in a rut: Rethinking depression and its treatment. *Trends Neurosci* 34:1–9 Thomas
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) The assessment of dependence in the study of stressful life events: validation using a twin design. *Psychol Med.* 29,1455-60
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001) Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry.* 15:582-6
- Kessler H, Roth J, von Wietersheim J, Deighton RM, Traue HC (2007) Emotion recognition patterns in patients with panic disorder. *Depress Anxiety.* 24:223-6.

- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol.* 48, 191-214
- Kirby LG, Pan YZ, Freeman-Daniels E, Rani S, Nunan JD, Akanwa A, Beck SG (2007) Cellular effects of swim stress in the dorsal raphe nucleus. *Psychoneuroendocrinology.* 32, 712-23
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131: 391-404
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM (2008) The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci.* 11, 752-3
- Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, Nestler EJ, Krishnan V, Eisch AJ (2010) Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 4436-41
- Leuner B, Shors TJ (2012) Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience.* (Epub ahead of print)
- Levkovitz Y, Caftori R, Avital A, Richter-Levin G (2002) The SSRIs drug Fluoxetine, but not the noradrenergic tricyclic drug Desipramine, improves memory performance during acute major depression. *Brain Res Bull.* 58, 345-50
- Lloyd C (1980a) Life events and depressive disorder reviewed. I. Events as predisposing factors. *Arch Gen Psychiatry* 37: 529-35
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci.* 1148, 86-94

- Maeng LY, Waddell J, Shors TJ (2010) The prefrontal cortex communicates with the amygdala to impair learning after acute stress in females but not in males. *J Neurosci.* 30:16188-96
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science.* 283:1923-7
- Mazure CM, Bruce ML, Maciejewski PK, Jacobs SC (2000) Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response. *Am J Psychiatry.* 157, 896-903
- McClure EB, Parrish JM, Nelson EE, Easter J, Thorne JF, Rilling JK, Ernst M, Pine DS (2007) Responses to conflict and cooperation in adolescents with anxiety and mood disorders. *J Abnorm Child Psychol.* 35:567-77
- McGonagle KA, Kessler RC (1990) Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. *Am J Community Psychol* 18: 681-706
- Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HW (2008) The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 172, 233-64
- Miczek KA, Nikulina EM, Shimamoto A, Covington HE 3rd (2011) Escalated or suppressed cocaine reward, tegmental BDNF, and accumbal dopamine caused by episodic versus continuous social stress in rats. *J Neurosci.* 31, 9848-57
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE 3rd (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.* 120:102-28
- Monk CS, Telzer EH, Mogg K, Bradley BP, Mai X, Louro HM, Chen G, McClure-Tone EB, Ernst M, Pine DS (2008) Amygdala and ventrolateral prefrontal cortex activation to masked angry faces in children and adolescents with generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 65:568-76
- Monroe SM, Torres LD, Guillaumot J, Harkness KL, Roberts JE, Frank E, Kupfer D (2006) Life stress and the long-term treatment course of recurrent depression: III Nonsevere life events predict recurrence for medicated patients over 3 years. *J Consult Clin Psycho.* 74,112-20

- Paykel ES, Cooper Z, Ramana R, Hayhurst H (1996) Life events, social support and marital relationships in the outcome of severe depression. *Psychol Med* 26: 121-33
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 14:285-93
- Pérez-Edgar K, Roberson-Nay R, Hardin MG, Poeth K, Guyer AE, Nelson EE, McClure EB, Henderson HA, Fox NA, Pine DS, Ernst M (2007) Attention alters neural responses to evocative faces in behaviorally inhibited adolescents. *Neuroimage.* 35:1538-46
- Pibiri F, Nelson M, Guidotti A, Costa E, Pinna G (2008) Decreased corticolimbic allopregnanolone expression during social isolation enhances contextual fear: A model relevant for posttraumatic stress disorder. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 5567-72
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 88-109
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266, 730-2
- Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci.* 24:4796-806
- Richard IH, Schiffer RB, Kurlan R (1996) Anxiety and Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 8, 383-92
- Roberson-Nay R, McClure EB, Monk CS, Nelson EE, Guyer AE, Fromm SJ, Charney DS, Leibenluft E, Blair J, Ernst M, Pine DS (2006) Increased amygdala activity during successful memory encoding in adolescent major depressive disorder: An fMRI study. *Biol Psychiatry.* 60:966-73
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry.* 61, 705-13

- Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH (2002) Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiatry*. 159, 663-5
- Schoevers RA, Van HL, Koppelmans V, Kool S, Dekker JJ (2008) 1 Managing the patient with co-morbid depression and an anxiety disorder. *Drugs*. 68:1621-34
- Seligman ME (1975) *Helplessness: On depression, development, and death*. W.H. Freeman: San Francisco
- Shalaby A, Kamal S (2009) Effect of Escitalopram on GABA level and anti-oxidant markers in prefrontal cortex and nucleus accumbens of chronic mild stress-exposed albino rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 1, 154-161
- Sheline YI, Barch DM, Garcia K, Gersing K, Pieper C, Welsh-Bohmer K, Steffens DC, Doraiswamy PM (2006) Cognitive function in late life depression: relationships to depression severity, cerebrovascular risk factors and processing speed. *Biol Psychiatry*. 60, 58-65
- Sheline YI, Price JL, Yan Z, Mintun MA (2010) Resting-state functional MRI in depression unmasks increased connectivity between networks via the dorsal nexus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11020–11025
- Slattery DA, Uschold N, Magoni M, Bär J, Popoli M, Neumann ID, Reber SO (2011) Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: Anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology*. Epub ahead of print
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 97:253-66
- Tata DA, Anderson BJ (2010) The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiol Behav*. 99:186-93
- Thomas KM, Drevets WC, Dahl RE, Ryan ND, Birmaher B, Eccard CH, Axelson D, Whalen PJ, Casey BJ (2001) Amygdala response to fearful faces in anxious and depressed children. *Arch Gen Psychiatry*. 58:1057-63

- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9: 519-25
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Delagrangé P, Tordera RM (2012a) Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology*. (Epub ahead of print)
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Tordera RM (2012b) Social versus environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol*. (Epub ahead of print)
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 22:6810-8.
- Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, Cao JL, Kirk A, Chakravarty S, Kumar A, Krishnan V, Neve RL, Cooper DC, Bolaños CA, Barrot M, McClung CA, Nestler EJ (2009) CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci*. 12, 200-9
- Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL (2009) Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav Neurosci*. 123, 564-76
- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthal W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ (2009) Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci* 29: 7820-32
- Willner P (1991) Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci* 12:131-6
- Willner P. (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110
- Yan HC, Qu HD, Sun LR, Li SJ, Cao X, Fang YY, Jie W, Bean JC, Wu WK, Zhu XH, Gao TM (2010) Fuzi polysaccharide-1 produces antidepressant-like effects in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13, 623-33

CAPÍTULO 7

CAPÍTULO 7

Conclusiones

- 1.** El presente estudio muestra que los modelos de estrés crónico de derrota social (CSDS) y de estrés crónico suave (CMS) inducen un fenotipo conductual claramente distinto. Mientras que el CMS induce una conducta típicamente depresiva como anhedonia, indefensión y déficit cognitivo, el modelo de estrés social induce junto con anhedonia otras alteraciones conductuales como ansiedad, hiperactividad y una clara evitación social.
- 2.** Igualmente, los modelos de CSDS y CMS inducen diferentes alteraciones neuroquímicas que podrían explicar las diferencias conductuales encontradas. Así, el CSDS indujo una clara disminución de la dopamina (DA) en la corteza prefrontal y tronco encefálico lo cual sugiere una alteración de vías dopaminérgicas asociadas al sistema de recompensa y a la conducta ansiosa. Por otro lado, el aumento del cociente excitatorio/inhibitorio encontrado en la corteza prefrontal de ambos modelos podría asociarse a la conducta depresiva, y específicamente a la anhedonia.
- 3.** Se confirma la validez del aislamiento social como modelo de estados ansioso-depresivos, si bien el componente adicional de subordinación social que conlleva el CSDS induce en mayor grado estas conductas.
- 4.** La validez predictiva del CSDS como modelo de depresión queda cuestionada, ya que, ninguno de los tres antidepresivos utilizados fue capaz de revertir por completo el fenotipo conductual inducido por el CSDS. Así, la fluoxetina, inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, fue completamente ineficaz. La venlafaxina, inhibidor de la recaptación de serotonina y norepinefrina, revirtió parcialmente la conducta ansiosa depresiva pero fue ineficaz ante la evitación social. La tianeptina, modulador glutamatérgico, revirtió parcialmente la evitación social y la ansiedad pero no la anhedonia.
- 5.** La diferente acción del antidepresivo noradrenérgico venlafaxina y glutamatérgico tianeptina, sobre las conductas depresivas y de evitación social respectivamente, evidencia que los mecanismos neuroquímicos que sustentan dichos comportamientos no están relacionados entre sí.

- 6.** La disminución del transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) en la amígdala podría ser un factor biológico de vulnerabilidad aumentada a la evitación social tras la exposición a estrés social.

- 7.** El CSDS indujo cambios neuroadaptativos en la plasticidad estructural y sináptica de la corteza prefrontal y la amígdala, que sugieren una hipertrofia y una retracción dendrítica respectivamente en dichas regiones. Estos resultados sugieren que el estrés social induce a largo plazo mecanismos adaptativos, en principio, opuestos a los observados previamente a corto plazo en estudios de estrés crónico.

- 8.** La utilización de dos estímulos sociales distintos en el test de evitación social nos permitió discriminar entre la evitación social inducida por estrés y la conducta de miedo inducida por la reexposición a un estímulo traumático previo. Asimismo, se sugiere que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) serían marcadores moleculares de una conducta de miedo condicionado que presentan los ratones sometidos a CSDS cuando se les presenta un estímulo aversivo. Además estos resultados confirman el papel fundamental de la amígdala en el procesamiento de las emociones.

- 9.** El presente trabajo muestra en primer lugar que el estrés social y el estrés ambiental inducen dos fenotipos conductuales y neuroquímicos claramente diferenciados que podrían abordar distintas situaciones clínicas. Mientras que el estrés ambiental podría ser relevante en la etiopatogenia de la depresión, el estrés social a largo plazo podría jugar un papel en el desarrollo de síntomas comunes a la ansiedad, la depresión o el estrés postraumático. En segundo lugar, el estrés social induce a largo plazo cambios neuroadaptativos en la corteza y en la amígdala que podrían ser la "memoria molecular" del circuito cortico amigdalario subyacente a un procesamiento alterado de las emociones.