

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Origen y consecuencias de la inflamación en depresión

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Martín Hernández

Directores

Javier Rubén Caso Fernández
Juan Carlos Leza Cerro

Madrid 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Departamento de Farmacología



Origen y consecuencias de la inflamación en depresión

David Martín Hernández

Tesis Doctoral

Directores

Dr. Javier Rubén Caso Fernández

Dr. Juan Carlos Leza Cerro

Madrid, 2017

A mi abuelo Tomás

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino "Es extraño ..."

Isaac Asimov

Yo no quería ser doctor. Estando la ciencia en este país condenada al ostracismo y la miseria no parecía la mejor elección, pero, al final, son las personas las que hacen grandes o pequeños los caminos. Y éste ha sido enorme.

A mis directores de tesis, Javi y JC. Javi, nunca pensé que en mi primer trabajo no iba a tener un jefe, sino un amigo. Gracias por tu paciencia, por todo lo que he aprendido de ti, por tu cariño y ánimo en los peores momentos, por las interesantes conversaciones (hasta de política), por apostar y confiar siempre en mí. Es muy difícil resumir tanto, pero, básicamente, (sujeto elíptico) estoy muy orgulloso de haber sido tu doctorando y he puesto todas las ganas del mundo para que este sentimiento fuese recíproco. JC, gracias por tu ayuda y consejos, por tu disponibilidad para todo. Es imposible encontrar un jefe que se preocupe tanto por el bienestar de todo su laboratorio, en lo personal y en lo profesional. Gracias por hacer que el trabajo haya sido también un hogar. Si nos dejan seguir en el negocio, desde luego eres el ejemplo a seguir.

Siguiendo con los jefes, a Borja por su amistad. Por las conversaciones de ciencia, de música, de la vida... por la pasión y alegría que me has transmitido siempre con todo. Por ser mucho más grande como persona que como científico, poca broma esta frase. A Pepe por su ayuda siempre que la he necesitado.

La pecera del laboratorio Leza es la responsable de que a ir en fin de semana, cargar con torres de WB, salir a las mil o incluso cenar allí no se le pueda llamar trabajo. A Aline, mi compañera de aventuras. Porque vivir tan intensamente todas las emociones sólo se explica por querernos un montón. Por la inmensa alegría que me produce recordar cada cosa que hemos hecho juntos, desde lo cotidiano de reírnos con tu diccionario de *portuñol* al viaje de nuestras vidas por California. A Karina porque ha sido un lujo trabajar contigo cada día. Aunque unos pongamos las ganas de marcar las diferencias otros lo hacéis y lo haréis. A Sandra por su genial acogida al aterrizar en el lab. A Álex por nuestras locuras de LPS y sus Doritos a las 19h.

A Álvaro, mi ojito derecho. ¿Cómo se puede ser tan buena persona? Esta tesis habría sido el doble de pesada de no ser por tu trabajo, las frases de los Simpson, nuestras risas y conciertos. A Ara por significar tanto y haber dejado una colección de recuerdos imborrable. A Bea Gil por cómo iluminaba el laboratorio con su sonrisa y su incansable ayuda a cualquier precio. A los TFM's, TFG's, prácticas, estancias, mediopensionistas, espontáneos... todos los que se han asomado por el laboratorio y con los que he podido aprender y pasarlo tan bien. A Bea, Dani, Elena, Guille, Hiram, Laura y Teresa por traspasar la frontera laboral y poder llamarlos amigos.

A las responsables de meterme en este lío. A Laura Orio por "engañarme" transmitiéndome toda su inquietud e ilusión investigadora durante el máster. A María, porque sin darse cuenta me hizo

ver que esto podía ser divertido y merecer la pena. Su alegría, cariño, ética de trabajo y capacidad de sacrificio han sido un ejemplo fundamental para encarar cada día. Esto no habría sido posible sin tu ayuda ni tus abrazos, gracias de corazón.

A los compañeros del departamento de Farmacología por las cenas y los buenos ratos. A Marcos por las horas de Irreale, las visitas al ver luz al fondo del pasillo, nuestras risas autocompasivas y los desayunos tras las complicaciones habituales. A Rober por su cariño y su magnífica gestión del grupo de whatsapp "Hombres de Farma". A Pablo porque no suele fallar en los grandes, pequeños y medianos eventos. A Sara por ir siempre con una sonrisa por los pasillos.

A mi familia y amigos, pilares maestros sin los que no se entiende nada. Visualizar el momento de celebrar esto con vosotros ha sido la máxima motivación en los peores días. A mis padres por honrar a vuestra profesión como maestros a base esfuerzo, trabajo y constancia, enseñándome y ayudándome a pelear por lo que me ha motivado y preocupándoos a base de cariño por hacerme disfrutar de la vida y nunca dejar que me sienta solo. A mis hermanos, Álvaro y Javier, uno por poner el listón inalcanzable y ser objeto de mi admiración y otro por sus recibimientos a base de sonrisas y porque verle crecer feliz representa la mayor de mis ilusiones y alegrías. A mis abuelos, especialmente a Tomás y Luisa, que se marcharon en mitad de este camino y con quienes me hubiera encantado poder compartir este final. A toda la gente que ha hecho Madrid tan grande y acogedor estos años y a la de mi tierra por recibirme siempre con los brazos abiertos y permanecer cerca en la distancia.

A Sara, por ser la hipótesis más bonita que he tenido la oportunidad de constatar.

Al CIBERSAM, las entidades financiadoras y a todos los ciudadanos del Estado Español por hacer posible con sus impuestos esta investigación. A la Fundación Boehringer Ingelheim por la beca para mi estancia de 3 meses en el MD Anderson Cancer Center de Houston con Robert Dantzer y a toda la gente del Symptom Research por tan genial experiencia. A la beca Martín-Hernández por su indispensable ayuda al inicio y en el último año de esta tesis y al Santa Elena por las labores de intendencia durante la misma.

A todos los animales que dieron su vida y a los pacientes que donaron sus muestras por su generosidad y esencial aporte a la ciencia y sin los que esta investigación habría sido imposible.

Al final, convertirse en doctor fue lo de menos. Ojalá esta humilde aportación, hecha con toda la ilusión del mundo, consiga contribuir de alguna forma a mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad. Ése es el único motivo de nuestro trabajo y por el que continuarán valiendo la pena todas y cada una de las derrotas.



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología

Pza. Ramón y Cajal
28040 - Madrid

Tel: 34-91-394 14 78/64
Fax: 34-91-394 1464/65

Los Dres. Javier Rubén Caso Fernández, Contratado postdoctoral Ramón y Cajal y Juan Carlos Leza Cerro, Catedrático de Universidad del Dpto. de Farmacología de la Fac. de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que la Tesis doctoral que tiene por título **Origen y consecuencias de la inflamación en depresión** ha sido realizada por David Martín Hernández bajo su dirección en este Dpto.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid, a 28 de marzo de 2017

Atentamente,

Dr. Javier Caso

Dr. Juan Carlos Leza

I) Resumen / Abstract	1
1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	7
II) Introducción	11
1. La depresión	13
1.1. La enfermedad psiquiátrica del s.XXI.....	13
1.2. Teorías fisiopatológicas de la depresión.....	14
1.3. Diagnóstico de la depresión	23
1.4. Tratamientos disponibles para la depresión	26
2. El estrés y la enfermedad mental.....	34
2.1. El estrés como desencadenante de patologías psiquiátricas	34
2.2. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)	37
2.3. El estrés y la inflamación	39
3. Las rutas neuroinflamatorias en depresión	46
3.1. Los receptores de inmunidad innata: el receptor Toll-like 4 (TLR-4) y las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).....	50
3.2. El factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2).....	63
4. Inflamación periférica: consecuencias gastrointestinales y conexión con el microbioma	67
4.1. El eje microbiota-intestino-cerebro.....	68
4.2. La traslocación bacteriana inducida por estrés y las enfermedades psiquiátricas.....	70
5. La serotonina y la depresión.....	74
5.1. Los receptores de serotonina en la depresión	75
5.2. Implicaciones de la vía de las kinureninas en la depresión: biodisponibilidad de serotonina y excitotoxicidad glutamatérgica.....	79
6. Hipótesis y objetivos	82
6.1. Objetivos generales	82
6.2. Objetivos específicos	83
III) Material y métodos	85
1. Modelos y diseño experimental.....	87
1.1. Chronic mild stress (CMS) en rata	87
1.2. Modelo neuroinflamatorio por inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratón.....	91

1.3. Cerebros humanos post-mortem	94
2. Estudios comportamentales	98
2.1. Estudios comportamentales en rata.....	98
2.2. Estudios comportamentales en ratón	100
3. Recogida y procesamiento de muestras	102
3.1. Recogida de muestras.....	102
3.2. Procesamiento de muestras	104
4. Técnicas bioquímicas.....	107
4.1. Estudios microbiológicos	107
4.2. Determinación de los niveles de corticosterona	107
4.3. Determinación del lipopolisacárido (LPS) plasmático.....	107
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa o Reverse Transcription – quantitative Polimerase Chain Reaction (RT-qPCR)	108
4.5. Western blot.....	110
4.6. Determinación de los niveles de prostaglandinas en corteza prefrontal	113
4.7. Determinación del estrés oxidativo.....	114
4.8. Determinación de otros parámetros bioquímicos.....	115
4.9. Inmunohistoquímica de fluorescencia.....	115
5.1. Estudios con animales	117
5.2. Estudios en humanos.....	117
IV) Resultados.....	123
1. Efectos de los antidepresivos sobre la neuroinflamación inducida por el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)	125
1.1. Efectos del CMS y los antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) en el PFC y el hipocampo	125
1.2. Efectos de los antidepresivos sobre los receptores de serotonina (5-HT) y la posible conexión con la activación inflamatoria de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y los metabolitos de la kinurenina en el PFC	135
2. Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)	142
2.1. Efectos del CMS sobre la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon y las proteínas de las uniones intercelulares estrechas o tight junctions. Impacto del tratamiento con antibióticos.	142
2.2. Efectos del CMS sobre la traslocación bacteriana y acciones del tratamiento con antibióticos	143

2.3. Efectos comportamentales del CMS y su modulación por el tratamiento con antibióticos	144
2.4. Efectos del CMS y el tratamiento con antibióticos sobre la activación de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en el PFC	147
2.5. Expresión de las MAPKs en diferentes tipos celulares del PFC.....	148
2.6. Efectos del CMS sobre la expresión del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2), sus activadores proteína quinasa B (Akt) y fosfoinositol 2-quinasa (PI3K) y su producto glutatión peroxidasa 1 (GPx-1)	149
3. Conexión entre los efectos comportamentales y la inflamación a través del sickness behavior inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones	152
3.1. Implicación del bloqueo de la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) sobre los efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la administración de LPS.	152
3.2. Implicación del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) en los efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la administración de LPS	155
4. Activación neuroinflamatoria en depresión y resistencia al tratamiento: estudios en cerebros humanos post-mortem.....	156
4.1. Efectos del trastorno depresivo mayor (MDD) y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión del receptor Toll-like 4 (TLR-4), sus ligandos endógenos las proteínas de choque térmico 60 (Hsp 60) y 70 (Hsp 70) y el factor nuclear kappa B (NF-κB)	156
4.2. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el regulador de su actividad fosfatasa dual específica 2 (DUSP2/PAC-1)	158
4.3. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2)	160
4.4. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de la proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10) y la proteína extra grande del linfoma de células B (Bcl-xL)	162
V) <i>Discusión</i>	165
1. Efectos de los antidepresivos sobre la neuroinflamación inducida por el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)	167
1.1. Efectos del CMS y los antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) en el PFC y el hipocampo	167
1.2. Efectos de los antidepresivos sobre los receptores de serotonina (5-HT) y la posible conexión con la activación inflamatoria de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y los metabolitos de la kinurenina en el PFC	173

2.	Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)	180
3.	Conexión entre los efectos comportamentales y la inflamación a través del sickness behavior inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones	187
4.	Activación neuroinflamatoria en depresión y resistencia al tratamiento: estudios en cerebros humanos post-mortem.....	192
5.	Discusión global y nuevos horizontes en la investigación en depresión	199
VI)	Conclusiones.....	203
1.	Conclusiones.....	205
VII)	Bibliografía.....	207

Abreviaturas

4-HNE: 4-Hidroxinonenal

5-HT: Serotonina / 5-Hidroxitriptamina

5-HT_x: Receptor de serotonina "x"

15-dPGJ₂: 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂

ACTH: Hormona Adrenocorticotropa / Corticotropina

Akt: Proteína Quinasa B

AP-1: Proteína Activadora 1

ARE: elementos de respuesta antioxidante

ATB: antibiótico

ATC: Antidepresivo Tricíclico

β -actina: *Beta*-actina

BA: Área de Brodmann

Bcl-xL: Proteína Extra Grande del Linfoma de Células B

BDNF: Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro

CBG: Globulina Fijadora de Corticosteroides

CCL28: Quimioquina asociada a la mucosa epitelial 28

CMS: *Chronic Mild Stress*

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CRF: Factor Liberador de Corticotropina (ACTH)

CT: Control

DAMP: Patrón Molecular Asociado a Daño

Desip: Desipramina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Dulox: Duloxetina

DUSP: Fosfatasa Dual Específica

ERK: Quinasa de Regulación de la señal Extracelular

EPM: Laberinto en Cruz Elevada

Escit: Escitalopram

FGF-21: Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21

FST: Test de Natación Forzada de Porsolt

GABA: Ácido *Gamma*-Aminobutírico

GAPDH: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa

GC: Glucocorticoide

GPx: Glutación Peroxidasa

GR: Receptor de Glucocorticoides

GSK-3 β : glucógeno sintasa quinasa 3-*beta*

Haa: 3-Hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa

HHA: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

HO-1: Hemoxigenasa 1

Hsp: Proteína de choque térmico

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IKK: Quinasa de I κ B

IL: Interleuquina

IMAO: Inhibidor de la Monoaminoxidasa

IRAK: Quinasa Asociadas al Receptor de Interleuquina

IRSN: Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Serotonina y Noradrenalina

ISRS: Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Serotonina

I κ B: Inhibidor de NF- κ B

i.p.: Intraperitoneal

JAK: Quinasa Janus

JNK: Quinasa NH₂ terminal de c-jun

KAT: Kinurenina Aminotransferasa

Keap-1: Proteína Asociada a ECH tipo-Kelch 1

KYNA: Ácido Kinurénico

LAT-1: Transportador de Aminoácidos Grandes 1

Leu: Leucina

LPS: Lipopolisacárido

MAO: Monoaminoxidasa

MAPK: Proteína/Quinasa Activada por Mitógenos

MAPKK: Proteína/Quinasa/Quinasa Activada por Mitógenos

MAPKKK: Proteína/Quinasa/Quinasa/Quinasa Activada por Mitógenos

MDA: Malonildialdehído

mFST: Test de Natación Forzada modificado

MK / MAPKAPK: Proteína/Quinasa Activada por MAPK

MKP: Fosfatasa de las MAPKs (DUSP)

MyD88: factor de Diferenciación Mieloide 88

NCAM: Molécula de Adhesión de Células Neurales

NET: Transportador de Noradrenalina

NF- κ B: Factor Nuclear *kappa* B

NLR: Receptor *NOD-like*

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NO₂: Nitritos

NQO-1: NAD(P)H quinona deshidrogenasa-1

Nrf2: Factor Nuclear tipo 2 (Derivado de eritroide 2)

p38: Proteína 38

p62: Nucleoporina p62

PAC-1: Fosfatasa de Células Activadas 1 (DUSP2)

PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógeno

PFC: Córtex Prefrontal

PGE₂: Prostaglandina E₂

PI3K: Fosfoinositol 3-Quinasa

PKC: Proteína Quinasa C

PPAR- γ : Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas *gamma*

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

PVN: Núcleo Paraventricular del Hipotálamo

QUINA: Ácido Quinolínico

S100A10: Proteína S100 de Unión a Calcio A10

SERT: Transportador de Serotonina

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD-1: Superóxido Dismutasa 1

SPT: Test de Preferencia por la Sacarosa

SR: Receptor Depurador/*Scavenger*

ST: "*Splash*" test

STAT: Transductores de la Señal y Activadores de la Transcripción

TAB: Proteína Asociada a TAK-1

TAK: Quinasa Activada por el TGF- β

TDO: Triptófano 2,3-dioxigenasa

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

TIR: Dominio de señalización intracelular *Toll*/IL-1

TIRAP: Proteína Adaptadora que contiene el dominio TIR

TLR: Receptor *Toll-like*

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TRAF: Factor Asociado al Receptor de TNF

TRIF: Factor Inductor de IFN- β con Dominio TIR

TrkB: Receptor Tirosina Quinasa B

UE: Unidad de Endotoxina

UFC: Unidad Formadora de Colonias

ZO-1: Proteína *Zona Occludens 1*

I) Resumen / Abstract

1. Resumen

Introducción: La depresión es una de las patologías psiquiátricas con mayor prevalencia en la actualidad y con un grave impacto en la salud pública. Alrededor de un tercio de los pacientes son resistentes al tratamiento farmacológico disponible actualmente, por lo que existe una urgente necesidad de profundización en el conocimiento de su fisiopatología que permita desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces. Por ello, en los últimos años se han planteado diferentes hipótesis complementarias a la monoaminérgica sobre la que se basan los antidepresivos utilizados en clínica, siendo una de las más relevantes la hipótesis inflamatoria de la depresión.

La inflamación que acompaña no sólo a la depresión, si no a otras patologías psiquiátricas, podría estar desencadenada por el estrés y los principales mecanismos alterados pertenecen al sistema inmune innato. La cronificación de los estímulos estresantes desregulan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, provocando un desequilibrio en la articulación de la resolución inflamatoria que desemboca en situaciones potenciales de daño.

En este sentido, una de las vías más estudiadas es la que acompaña al receptor *Toll-like 4* (TLR-4) pudiendo activarse por señales endógenas (DAMPs) o exógenas (PAMPs) de daño. El ligando exógeno del TLR-4 es el lipopolisacárido (LPS) por lo que la traslocación bacteriana inducida por el estrés también podría jugar un papel en la fisiopatología de la depresión. Numerosos estudios han mostrado la capacidad del microbioma para producir efectos comportamentales, siendo la traslocación bacteriana uno de los principales mecanismos. La cascada de señalización de TLR-4 induce el factor nuclear *kappa B* (NF- κ B), molécula clave en la respuesta inflamatoria, pero a su vez controla la activación de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esta familia de proteínas regula importantes procesos celulares como la supervivencia y diferenciación celular o la apoptosis, siendo también uno de los importantes transductores de la inflamación.

La generación de estrés oxidativo constituye una de las consecuencias de los procesos inflamatorios y su control se antoja vital para la prevención del posible daño celular y tisular. La ruta antioxidante del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) es la principal herramienta de la que disponen las células para enfrentarlo y se ha descrito su participación en enfermedades de componente inflamatorio donde se ubican las psiquiátricas.

Dentro de las posibles alteraciones relacionadas con estos procesos en depresión se encuentra la vía de las kinureninas, con la peculiaridad de constituir un posible nexo de unión entre la inflamación y los sistemas de neurotransmisión. Particularmente, la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) se activan en situaciones inflamatorias y catalizan el paso de triptófano hacia kinurenina, disminuyendo la biodisponibilidad de triptófano para la síntesis del neurotransmisor más vinculado tradicionalmente con los trastornos depresivos, la serotonina. Además, a partir de la kinurenina se generan metabolitos con capacidad de acción sobre los receptores N-metil-aspartato (NMDA) del glutamato, pudiendo conducir a situaciones de excitotoxicidad y daño tisular.

La caracterización de todas estas vías en depresión podría aportar nuevos horizontes en el desarrollo de fármacos que conduzcan hacia una mayor efectividad en los tratamientos. Así mismo, conocer cómo los antidepresivos más utilizados en clínica son capaces de modularlos aportaría datos interesantes sobre su implicación real en la fisiopatología depresiva y sobre posibles causas de las resistencias al tratamiento.

Objetivo: investigar si la inflamación desencadenada por el estrés juega un papel en la fisiopatología de la depresión a través de vías de inmunidad innata que involucran liberación de productos bacterianos de la microbiota intestinal y señalización intra e intercelular en cerebro a través de MAPKs, factores antioxidantes y alteraciones en el metabolismo de la serotonina y la vía de las kinureninas.

Material y métodos: el modelo de depresión en rata Wistar utilizado fue el *chronic mild stress* (CMS), un protocolo de estrés crónico que genera un comportamiento de tipo depresivo en el roedor. Tras la exposición al CMS se caracterizaron bioquímicamente las vías relacionadas con la inflamación descritas previamente (MAPKs, Nrf2 y kinureninas). En un primer experimento, se administraron tres representantes de las familias de antidepresivos más prescritas en clínica (desipramina, escitalopram y duloxetina) para evaluar su modulación de los diferentes parámetros de la ruta antioxidante de Nrf2 en córtex prefrontal e hipocampo y de la vía de las kinureninas y el metabolismo de monoaminas en córtex prefrontal. Con el objeto de analizar la influencia de la traslocación bacteriana en las alteraciones moleculares y comportamentales inducidas por el CMS, se realizó un segundo experimento en el que se añadió un grupo experimental tratado con antibióticos de manera crónica testado previamente para reducir la flora intestinal. Profundizando en la implicación inflamatoria en el comportamiento de tipo depresivo, se realizó un tercer experimento en ratón utilizando el modelo de administración de lipopolisacárido (LPS) inductor del *sickness behavior*. Sobre él se evaluaron los efectos del

bloqueo de laIDO, mediante la administración oral de L-leucina y la utilización de ratones *knockout*, y del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) con un anticuerpo de neutralización inyectado intraperitonealmente. Para evaluar la traslacionalidad de todos estos hallazgos, se realizó el análisis de algunos de los mediadores inflamatorios alterados en muestras del área 9 de Brodmann del córtex prefrontal (PFC) procedentes de pacientes depresivos tras suicidio. Además, se correlacionaron con la presencia o ausencia de tratamiento antidepresivo.

Resultados: La ruta antioxidante de Nrf2 se encontró afectada tras el CMS en el córtex prefrontal pero no en el hipocampo. La exposición al CMS disminuyó la expresión de los activadores PI3K y Akt en ambas estructuras, pero tanto Nrf2 como sus inhibidores, Keap-1 y p-GSK-3 β , y algunas enzimas antioxidantes de fase II producto de su actividad (HO-1, NQO-1, SOD-1, GPx-1, catalasa) únicamente se modificaron en el PFC, reduciendo la expresión de la ruta. Los antidepresivos, particularmente desipramina y duloxetina, consiguieron restaurar la expresión de algunas moléculas de la misma en el PFC, ejerciendo escasas acciones en el hipocampo.

La activación inflamatoria de laIDO y laTDO en el córtex prefrontal tras el CMS incrementó los niveles de los metabolitos de la kinurenina (KYNA y QUINA), en un potencial desvío del triptófano de la síntesis de serotonina hacia la producción del precursor de KYNA y QUINA, la kinurenina. Además, la exposición al CMS modificó elementos del sistema de neurotransmisión monoaminérgico en la dirección de una reducción de su señalización por sus efectos sobre los receptores de serotonina y el incremento en el transportador de recaptación de noradrenalina (NET). Los antidepresivos administrados revirtieron la mayoría de los efectos potencialmente dañinos provocados sobre la vía de las kinureninas y el metabolismo monoaminérgico.

El CMS induce una disfunción intestinal y una traslocación bacteriana desde el colon hacia diferentes órganos (hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos), con presencia de componentes bacterianos (LPS) en el plasma. El tratamiento con antibióticos previno la traslocación bacteriana y restauró el incremento en la MAPK p38 y el descenso en la ruta de Nrf2 que se induce tras el CMS en el córtex prefrontal. La expresión de las formas activadas de las MAPKs se observó en microglía y neuronas, pero no astrogía bajo condiciones de CMS. Además, algunas de las alteraciones comportamentales que el CMS provocó en diferentes test (mFST, SPT, ST, EPM) no se produjeron en el grupo tratado con antibióticos (mFST, ST).

La prevención de la activación de la vía de las kinureninas en el modelo de inyección de LPS en ratón no tuvo efectos relacionados con la anhedonia y la motivación medidos a través del SPT y el VWR. El bloqueo de la señalización por FGF-21 restauró la preferencia por sacarosa a las 24

horas tras LPS, señalándole como posible responsable de la disminución que se produce durante el *sickness behavior*.

Los estudios realizados en cerebros humanos revelaron un incremento del ligando endógeno de TLR-4, Hsp 70, las formas activadas de las MAPKs p38, ERK1/2 y JNK, y el Bcl-xL en el área 9 de Brodmann. Se registró una disminución en la DUSP2 que defosforila a las MAPKs y en la ruta de Nrf2, afectando a su activador PI3K, su inhibidor Keap-1 y la propia expresión nuclear de Nrf2. La distinción entre individuos sin tratamiento antidepresivo y con él mostró la persistencia de las alteraciones en los mediadores descritos a pesar del tratamiento y el incremento con el mismo de S100A10, proteína implicada en la distribución de los receptores de serotonina.

Conclusiones: los resultados aportados por esta investigación refuerzan la idea de la implicación del estrés en la generación de desequilibrios inflamatorios en depresión a través de mecanismos en el PFC que involucran a las MAPKs, la ruta antioxidante de Nrf2, la vía de las kinureninas y el metabolismo monoaminérgico. La traslocación bacteriana contribuye a la neuroinflamación detectada a través de la MAPK p38 y la ruta de Nrf2 y, además, posee implicaciones comportamentales. Respecto al comportamiento, se ha encontrado a FGF-21 como potencial responsable de la disminución del consumo de sacarosa producido durante el *sickness behavior* desarrollado en situación inflamatoria. El bloqueo de la activación de la vía de las kinureninas a este nivel, sin embargo, no pareció mostrar mejora relacionada con la anhedonia y la motivación. Los tratamientos antidepresivos son capaces de ejercer algunas acciones sobre los parámetros bioquímicos modificados, pero en pacientes depresivos tras suicidio no consiguieron revertir las alteraciones detectadas, apuntando hacia una posible causa de resistencia al tratamiento.

Los descubrimientos descritos en esta Tesis Doctoral podrían representar nuevas dianas farmacológicas y la posibilidad de una mejora en los tratamientos disponibles contra la depresión.

2. Abstract

Background: depression is one of the most prevalent psychiatric diseases nowadays with a significant impact in public health. Around one third of the patients are treatment-resistant to available drugs, thus there is a pressing need to achieve a better understanding of the pathophysiology allowing the development of more effective therapeutic strategies. Lately, different hypothesis, complementary to the monoaminergic one in which the antidepressants used in clinics are based, have arisen becoming the inflammatory hypothesis of depression one of the most relevant.

The inflammation - not only accompanying depression but also other psychiatric pathologies - could be triggered by stress and the main dysregulations are related to the innate immune system. Moreover, stressors can become chronic and modify the hypothalamus pituitary adrenal axis (HPA) activity leading to a dysregulation in the inflammatory process, leading to potential harmful situations.

In this sense, the Toll-like receptor 4 (TLR-4) pathways are one of the most studied and can be activated by endogenous (DAMPs) or exogenous (PAMPs) damage signals. The lipopolysaccharide (LPS) is the exogenous ligand of the TLR-4 and, therefore, the bacterial translocation induced by stress could play a role in the pathophysiology of depression. Previous studies have shown the ability of the microbiome to exert behavioral effects and the bacterial translocation represent one of the main mechanisms.

TLR-4 activates the nuclear factor *kappa* B (NF- κ B), a key regulator of the immune response, but also controls the activity of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs). This family of proteins regulates important cellular processes such as cellular survival and differentiation or apoptosis, being one of the main inflammatory triggers.

Oxidative stress is a consequence of the inflammation and its control is vital to prevent from the potential cellular and tissue damage. The nuclear factor (erythroid-derived 2) like 2 (Nrf2) antioxidant pathway represents the main defense to face it and it is involved in illnesses accompanied by inflammation like the psychiatric diseases.

Within the dysregulations related to these processes in depression, the kynurenine pathway could link inflammation and neurotransmission systems. Particularly, the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and the tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) can be activated by inflammation and catalyze the conversion of tryptophan to kynurenine, reducing the bioavailability of

tryptophan to synthesize serotonin. Moreover, some metabolites generated from the kynurenine can act on the N-methyl aspartate (NMDA) receptors of the glutamate, leading to excitotoxicity and tissue damage.

The characterization of these pathways in depression could provide new insights for the drug development of more effective treatments. Understanding how the more prescribed antidepressants can modulate those pathways could unveil interesting aspects about their real implication in the pathophysiology of depression and the possible causes of treatment resistances.

Aims: to elucidate whether the stress-induced inflammation plays a role in the pathophysiology of depression through innate immunity pathways that involve the release of bacterial products from the intestinal microbiota and the intra/intercellular signaling in the brain including MAPKs, antioxidant factors and changes in the serotonin metabolism and the kynurenine pathways.

Material and methods: the depression model used in Wistar rats was the chronic mild stress (CMS), a chronic stress protocol that induces a depressive-like behavior in rodents. After the CMS exposure, we performed a biochemical characterization of the inflammation-related pathways previously described (MAPKs, Nrf2 and kynurenines). In the first experiment, three representative antidepressants of the most prescribed families were injected (desipramine, escitalopram and duloxetine) to evaluate their modulation of different Nrf2 antioxidant pathway mediators in the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus and the kynurenines pathways and monoamines metabolism in the PFC. To analyze the role of the bacterial translocation in the molecular and behavioral changes induced by the CMS, we made a second experiment adding an experimental group chronically treated with antibiotics using a previously tested protocol to reduce the colonic microbiota. We developed a third experiment in mice applying a lipopolysaccharide (LPS) administration as inductor of sickness behavior. We studied the effects of the IDO blockage through the oral administration of L-leucine and *knockout* mice, and we investigated the behavioral effects of the fibroblast growth factor 21 (FGF-21) using a neutralizing antibody injected intraperitoneally. To evaluate the translational implications of these discoveries, we analyze some of the modified inflammatory mediators in human brain samples of the Brodmann area 9 in the PFC from depressive patients who committed suicide. Moreover, we correlate the changes with the presence or absence of antidepressant treatments.

Results: the Nrf2 antioxidant pathway was downregulated in the PFC but not in the hippocampus after CMS. The CMS exposure decreased the expression of the activators PI3K and

Akt in both cerebral areas, but Nrf2, its inhibitors, Keap-1 and p-GSK-3 β , and some of the phase II antioxidant enzymes induced by its activity (HO-1, NQO-1, SOD-1, GPx-1, catalase) were reduced only in the PFC. The antidepressants, particularly desipramine and duloxetine, restored the expression of some of these molecules in the PFC, exerting limited actions in the hippocampus.

The inflammatory activation of the IDO and the TDO in the PFC after the CMS increased the kynurenine metabolites levels (KYNA and QUINA), potentially diverting the tryptophan from the serotonin synthesis to the precursor of the KYNA and QUINA, the kynurenine. Moreover, the CMS exposure modified some elements of the monoaminergic neurotransmission system towards a decrease of the signaling by means of the effects over the serotonin receptors and the upregulation of the noradrenaline reuptake transporter (NET). The antidepressant treatment restored most of the potential damage produced over the kynurenine pathways and the monoaminergic metabolism.

The CMS induced an intestinal dysfunction and a bacterial translocation from the colon to different organs (liver, spleen, mesenteric lymphatic nodes), with the presence of bacterial components (LPS) in the plasma. Antibiotic treatment prevented from the bacterial translocation and restored the increase in the MAPK p38 and the downregulation in the Nrf2 pathway induced by the CMS in the PFC. The expression of the activated forms of the MAPKs was observed in the microglia and neurons but not astroglia under CMS conditions. Moreover, some of the behavioral changes caused by the CMS in different tests (mFST, SPT, ST, EPM) did not happen in the antibiotic treated group (mFST, ST).

Prevention from the activation of the kynurenine pathways in the LPS injection model in mice did not affect the anhedonia and motivation assessed by the SPT and the VWR. The FGF-21 signaling blockage restored the sucrose preference 24 hours after LPS, pointing it out as a possible responsible of the decrease observed during the sickness behavior.

The human brain studies revealed an increase of the TLR-4 endogenous ligand, Hsp 70, the activated forms of the MAPKs p38, ERK1/2 and JNK, and the Bcl-xL in the Brodmann area 9. There was a downregulation in DUSP2 which dephosphorylates the MAPKs and in the Nrf2 pathway, affecting its activator PI3K, its inhibitor Keap-1 and the nuclear expression of the Nrf2. The distinction between patients with and without antidepressant treatment showed the persistence of these changes despite the treatment and the increase of S100A10, a protein involved in the displaying of the serotonin receptors, in the treated group.

Conclusions: the results from this research strengthen the idea about the stress involvement in the inflammatory dysbalance detected in depression through mechanisms in the PFC related to the MAPKs, the antioxidant Nrf2 pathway, the kynurenines pathways and the monoaminergic metabolism. Bacterial translocation contributes to the neuroinflammation modulating the MAPK p38 and the Nrf2 pathway and, in addition, it has behavioral consequences. Regarding the behavior, the FGF-21 has potential to be considered a responsible factor for the reduction in the sucrose intake observed in the sickness behavior developed under inflammatory conditions. However, the blockage in the activation of the kynurenines at this level did not improve the anhedonia and motivation. The antidepressants can exert some actions over the modified biochemical parameters, but in depressive patients who committed suicide did not restore the changes, pointing out to a possible cause of treatment resistances.

The discoveries described along this Thesis could represent new pharmacological targets and the possibility of an improvement in the available treatments against depression.

II) Introducción

1. La depresión

1.1. La enfermedad psiquiátrica del s.XXI

En su etimología, el término depresión proviene del latín *depressio* que significa “opresión, encogimiento, abatimiento”. Aunque son conceptos diferentes, el primero en acuñar un término para referirse al estado de ánimo asociado a la misma como melancolía (del griego antiguo μέλας "negro" y χολή "bilis") fue Hipócrates en el siglo V a. C. (Hippocrates, siglo V a.C.), pero no sería hasta 1725 cuando Richard Blackmore le otorga el nombre con el que conocemos en la actualidad a esta enfermedad (Blackmore, 1725, Jackson, 1986).

Los trastornos depresivos constituyen un amplio espectro de enfermedades psiquiátricas del estado de ánimo de difícil diagnóstico alrededor de unos criterios sindrómicos. Dentro de ellas se encuentra el trastorno depresivo mayor, introducido a mediados de 1970 por un grupo de clínicos estadounidenses con el afán de aunar criterios en el diagnóstico basándose en los síntomas (Spitzer et al., 1975) y que fue incorporado en 1980 dentro del DSM-III. Así, se define como un conglomerado de síntomas sostenidos en el tiempo siendo la intensidad e incidencia de cada uno particular de cada caso: apatía, abulia, tristeza, desesperanza, anhedonia, anergia, trastornos del sueño y del apetito, baja autoestima e incluso ideaciones suicidas.

La etiología de la depresión puede responder a múltiples variables, con factores relacionados como el consumo de tóxicos, el estado civil, el nivel socioeconómico o comorbilidades con otras enfermedades, situándose el estrés como uno de los principales implicados en su génesis. No es de extrañar que así, su impacto en la sociedad de principios del siglo XXI, consternada por un ritmo frenético y múltiples dificultades, esté siendo dramático. En 2015, más de 300 millones de personas la padecían en todo el mundo siendo la tercera causa de morbilidad sólo por detrás de los accidentes cardiovasculares y de tráfico (Marcus et al., 2012, Institute for Health Metrics and Evaluation, 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que su impacto va a dispararse en el futuro próximo y que en 2030 será la primera enfermedad en discapacidad ajustada por años de vida (*disability adjusted life-time years, DALYs*) (Mathers y Loncar, 2006). De hecho, en la Unión Europea, 1 de cada 15 personas padecen depresión. No debemos olvidar, además, el elevado coste sobre la calidad de vida de los pacientes y su entorno social (familia, amigos...) así como la fuerte inversión económica que supone para la sociedad tanto en costes médicos directos (38.000 millones de €) como en pérdidas de los empleadores (54.000 millones de €) (Olesen et al., 2012).

Centrándonos en nuestra geografía, la prevalencia de la depresión en España se sitúa alrededor del 5,21% con aproximadamente 2.400.000 personas afectadas en el año 2015 (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2015). El sexo constituye un factor de riesgo diferencial a la hora de sufrir un episodio depresivo grave, otorgando a las mujeres casi el doble de probabilidades de padecerlo con respecto a los hombres (14,5% vs 6,4%) (Gabilondo et al., 2010, Igualdad, 2013). Los DALYs se sitúan en 424.000 en 2015 (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2015) y el ratio de suicidios, de los cuales al menos dos tercios se derivan de episodios depresivos, fue del 7,5 por 100.000 habitantes en 2012 (OECD, 2015).

La depresión presenta comorbilidad con múltiples enfermedades tanto psiquiátricas como la ansiedad, trastornos de personalidad o abuso de sustancias (Ekselius y von Knorring, 1998, Lenze et al., 2000, Bovasso, 2001), como de base inmunológica tales como cáncer, diabetes, obesidad, SIDA, colon irritable o artritis reumatoide (Marwick y Kaaya, 2010, Linden et al., 2012, Matcham et al., 2013, Oladeji y Gureje, 2013, Zhang et al., 2013, Carey et al., 2014). Es destacable la fuerte conexión que muestra con las patologías cardiovasculares y el estado de salud físico (Kemp et al., 2012, Dhar y Barton, 2016). Este hecho, unido a la dificultad en su diagnóstico, provoca que la depresión sea una enfermedad infradiagnosticada e infratratada en porcentajes de alrededor del 50%, por lo que se han de tomar todas las cifras anteriores con cautela y deducir que el impacto de esta patología en la sociedad es incluso mayor de lo que las estadísticas infieren (European Depression Association, 2016).

1.2. Teorías fisiopatológicas de la depresión

Alrededor de un tercio de los pacientes con trastorno depresivo mayor son resistentes a los tratamientos convencionales disponibles (Rush et al., 2006a, Mrazek et al., 2014). Esta necesidad de buscar nuevas dianas farmacológicas, unido a la ya mencionada dificultad en el diagnóstico, provoca el desarrollo de nuevas teorías acerca de la depresión que tratan de verter luz en el proceso fisiopatológico depresivo, aún desconocido. Sin embargo, lejos de ser excluyentes, estas hipótesis encuentran nexos en común y se convierten en complementarias con la ambición de aunar las diferentes evidencias de los trastornos depresivos y avanzar hacia la consecución de una teoría integradora de todas ellas.

1.2.1 Hipótesis monoaminérgica

La hipótesis monoaminérgica tiene su origen en el descubrimiento de los primeros tratamientos farmacológicos frente la depresión en la década de los 50, fruto de la serendipia. Los compuestos iproniazida (Crane, 1956) e imipramina (Kuhn, 1958), inicialmente propuestos para el

tratamiento de la tuberculosis y la psicosis respectivamente, mostraron efectos sobre el estado de ánimo que condujeron a ensayos clínicos sistemáticos, probando su eficacia como antidepresivos. Posteriores estudios encaminados a discernir el mecanismo molecular por el cual actuaban reconocieron a la iproniazida como un inhibidor de la monoaminoxidasa (IMAO) y a la imipramina como inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina, agrupado posteriormente dentro de los conocidos como antidepresivos tricíclicos (ATC) (Shore y Brodie, 1958, Glowinski y Axelrod, 1964). Además, un fármaco capaz de disminuir las reservas de estos neurotransmisores y tradicionalmente utilizado como antihipertensivo, la reserpina, fue capaz de inducir síntomas depresivos tras su administración (Freis, 1954, Burrell, 1956).

Estos descubrimientos y posteriores observaciones relacionadas con las conexiones entre las monoaminas (serotonina, noradrenalina y dopamina) y los estados de ánimo, la percepción y la cognición llevaron al desarrollo de la neuroquímica del cerebro y de su papel en diversas patologías. De esta manera, se postuló que el déficit de los neurotransmisores monoaminérgicos en la hendidura sináptica era la principal causa de los trastornos depresivos, constituyéndose así la idea central de la hipótesis monoaminérgica (Figura 1).

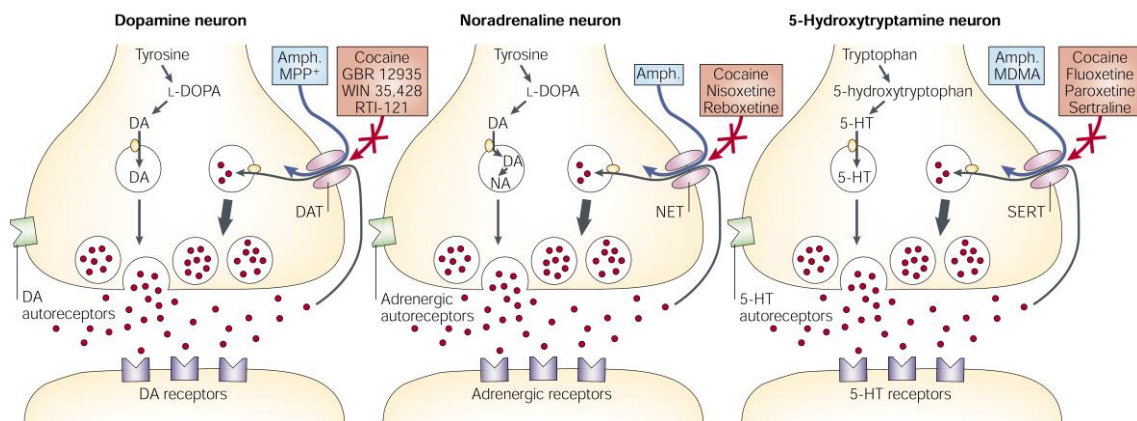


Figura 1. Sistemas de neurotransmisión relacionados con la hipótesis monoaminérgica de la depresión. (Torres et al., 2003). L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina; DA: dopamina; DAT: transportador de dopamina; Amph: anfetamina; MPP; 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; NA: noradrenalina; NET: transportador de noradrenalina; 5-HT: serotonina; SERT: transportador de serotonina; MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina.

A pesar de estas evidencias, numerosos estudios trasladan algo de oscuridad a la exclusiva veracidad de esta hipótesis para explicar el fenómeno de tipo depresivo. El principal problema teórico que tiene que enfrentar es la contradicción entre las varias semanas necesarias para que los antidepresivos muestren un efecto terapéutico y el tiempo de apenas minutos que tardan en incrementar los niveles de monoaminas.

En resumen, a nivel farmacológico y clínico existen evidencias tanto a favor como en contra de esta hipótesis que quedan reflejadas en la Tabla 1.

	Evidencia	Estado de ánimo
A favor	ATCs: ↓ recaptación NA y 5-HT	↑
	IMAOs: ↑ depósitos NA y 5-HT	↑
	Reserpina: ↓ almacenamiento NA y 5-HT	↓
	α-metil-tirosina: ↓ síntesis NA	↓
	Metil DOPA: ↓ síntesis NA	↓
En contra	Anfetaminas y cocaína	-
	Niveles de metabolitos NA y 5-HT: ≈ en pacientes e individuos sanos	-

Tabla 1. Evidencias farmacológicas y clínicas a favor y en contra de la hipótesis monoaminérgica. ATCs: antidepresivos tricíclicos; NA: noradrenalina; 5-HT: serotonina; IMAOs: inhibidores de la monoaminoxidasa; DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina.

Sin embargo, la hipótesis monoaminérgica no se encuentra en absoluto descartada como parte de la patología depresiva y ha servido no sólo para conducir la investigación farmacológica hacia una continua mejora en los tratamientos convencionales, sino para focalizar en dos sistemas de neurotransmisión, el de serotonina y noradrenalina, de cuyo hilo conductor aún se deriva gran parte de la investigación en el campo de la depresión. Es más, continúa representando la base de los tratamientos existentes en la actualidad y ha contribuido a la mejora en la calidad de vida de una gran cantidad de pacientes.

1.2.2 Hipótesis inflamatoria: el *sickness behavior*

Durante las últimas dos décadas se ha coleccionado un gran volumen de datos acerca de la conexión existente entre inflamación y depresión.

Desde la primera evidencia de la activación de linfocitos T en depresión (Maes et al., 1990), numerosos trabajos muestran un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α), las interleuquinas 1 *beta* y 6 (IL-1 β e IL-6) o el interferón *gamma* IFN- γ (Maes et al., 1997, Mikova et al., 2001, Shelton et al., 2011), proteínas de fase aguda (Joyce et al., 1992, Cepeda et al., 2016), quimioquinas y moléculas de adhesión (Rajagopalan et al., 2001, Eyre et al., 2016), ratio proinflamatorio en favor de ácidos grasos ω 6 frente a los ω 3 (Peet et al., 1998) y estrés oxidativo subsecuente a la propia inflamación (Liu et

al., 2015b). Además, la hipótesis inflamatoria encuentra puntos en común con la monoaminérgica ya que estos mediadores inmunes pueden interactuar con los sistemas de neurotransmisión de las monoaminas (Zhu et al., 2006) y estimular la vía de las kinureninas (que abordaremos más adelante) disminuyendo la biodisponibilidad de triptófano para la síntesis de serotonina (O' Connor et al., 2009). Es interesante apuntar que dicha inflamación puede provenir no sólo de un aumento en todas las moléculas señaladas, sino que la disminución en los mecanismos protectores o reguladores de la misma puede jugar un papel importante, aunque represente un campo menos explorado (Sutcgil et al., 2007, Gárate et al., 2013, MacDowell et al., 2016). Los últimos metaanálisis publicados no hacen sino reforzar la hipótesis inflamatoria para las patologías psiquiátricas, encontrando desequilibrios comunes como el incremento descrito en todos ellos para la IL-6, además de alteraciones en otros parámetros inflamatorios (Khandaker et al., 2014, Goldsmith et al., 2016, Kohler et al., 2017)

Toda esta activación inmune es capaz de provocar un comportamiento enfermizo conocido como *sickness behavior* que comparte muchos síntomas con los cuadros depresivos - anhedonia, apatía, anorexia, alteraciones en el sueño y fatiga - e incluso cambios neuroquímicos similares a los ya descritos en ellos (Dantzer et al., 2008) (Figura 2).

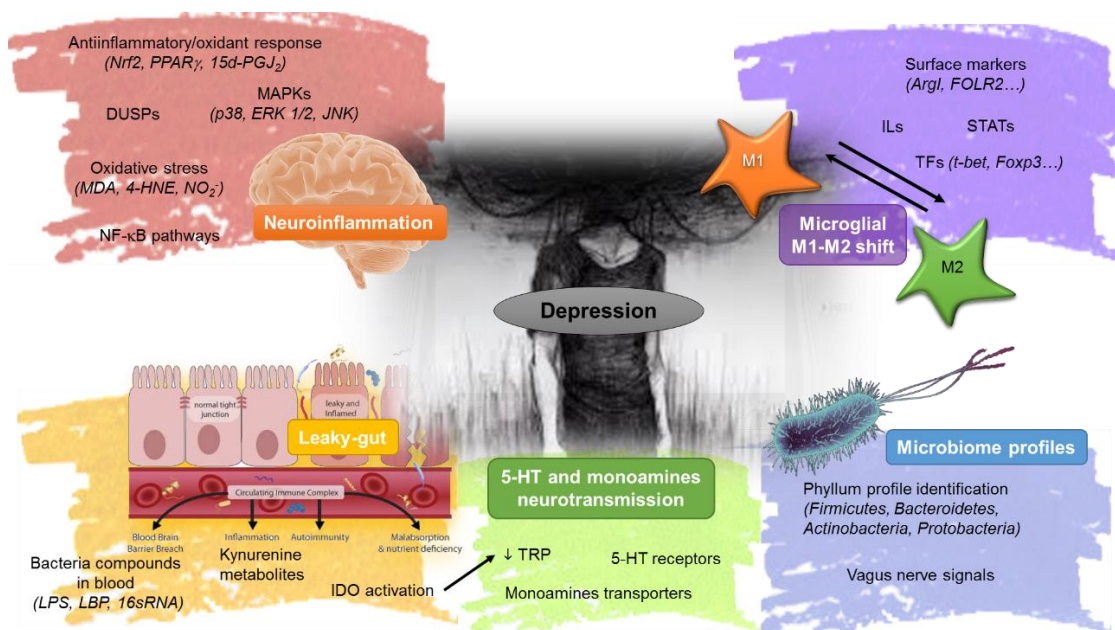


Figura 2. Hipótesis inflamatoria de la depresión. Nrf2: factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2); PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma*; 15-dPGJ $_2$: 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J $_2$; DUSP: fosfatasa dual específica; MAPK: proteína/quinasa activada por mitógenos; p38: proteína 38; ERK1/2: quinasa reguladora de la señal extracelular 1/2; JNK: quinasa NH $_2$ terminal de c-jun; MDA: malonildialdehído; 4-HNE: 4-hidroxinonenal; NO $_2$: nitritos; NF- κ B: factor nuclear *kappa* B; LPS: lipopolisacárido; LBP: proteína de unión al lipopolisacárido; 16SRNA: subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosómico; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; 5-HT: serotonina; TRP: triptófano; M: macrófago; IL: interleuquina; STAT: transductor de la señal y activador de la transcripción; TF: factor de transcripción; t-bet: TF caja T 21; Foxp3: TF caja de horquilla p3; Arg1: arginasa I; FOLR2: receptor de folato 2.

El desequilibrio pro/antiinflamatorio se da tanto a nivel periférico como central y en esta comunicación encontramos la estrecha relación que guarda esta hipótesis con el estrés, uno de los principales implicados en su génesis de la patología depresiva (García-Bueno et al., 2008a). La barrera hematoencefálica se vuelve permeable en determinadas zonas ante eventos estresantes, permitiendo el eventual paso de moléculas que no pasarían de manera natural (Madrigal et al., 2002). Las citoquinas actúan en el eje del estrés estimulando la producción del factor liberador de corticotropina (CRF) y pueden desregular el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) por su acción sobre los receptores de glucocorticoides (GR), provocando la perpetuación en la producción de estímulos inflamatorios (Raison et al., 2006). Pero más allá de ello, el estrés también provoca una disfunción intestinal que abre las uniones intercelulares estrechas del epitelio intestinal permitiendo el eventual paso de moléculas al torrente circulatorio (Ponferrada et al., 2007, Samak et al., 2010). Este fenómeno denominado como intestino permeable o “leaky gut” (Bjarnason et al., 1984) podría contribuir a la patología depresiva ya que bacterias intestinales o componentes de las mismas podrían suscitar una respuesta inmune o contribuir a agravar la ya existente. Reforzando esta teoría, en pacientes con depresión se han detectado niveles de inmunoglobulinas A y M (IgA e IgM) en plasma específicas frente a especies bacterianas de origen intestinal (Maes et al., 2008, Maes et al., 2012b) y la descontaminación intestinal con antibióticos es capaz de restaurar los niveles de parámetros inflamatorios incluso a nivel cerebral tras una situación estresante (Gárate et al., 2013). Incluso se ha postulado que una infección previa pudiera tener un papel fisiopatológico en las patologías psiquiátricas (Benros et al., 2012, Flinkkila et al., 2016).

Otra de las contribuciones principales del estrés al potencial daño cerebral se produciría a través de la liberación de aminoácidos excitadores en distintas áreas cerebrales, con especial intensidad en el córtex prefrontal (Moghaddam, 1993). Dicho fenómeno alcanza concentraciones capaces de inducir fenómenos de excitotoxicidad y cuyos mecanismos se detallan en el punto 2.3.3 de la presente Tesis Doctoral.

La comorbilidad de los trastornos depresivos con multitud de enfermedades de base inmunológica refuerza esta relación periferia-centro (Marwick y Kaaya, 2010, Linden et al., 2012, Matcham et al., 2013, Oladeji y Gureje, 2013, Zhang et al., 2013, Carey et al., 2014). Entre ellas, las enfermedades metabólicas han encontrado en los últimos años en el factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF-21) a un nuevo regulador metabólico (Kharitonov et al., 2005). Recientes investigaciones han revelado su inducción por el ejercicio, fármacos antidiabéticos, estrés o inflamación (Kim y Lee, 2015) y su relación con el estrés oxidativo (Gómez-Sámano et

al., 2016), posicionándolo junto al resto de su familia de FGF como otro de los posibles puntos de conexión con enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Turner et al., 2016), a pesar de haber sido descubierto hace más de una década (Nishimura et al., 2000).

La eterna pregunta que tiene que enfrentar esta hipótesis descansa en el papel que juega la inflamación en los procesos depresivos: ¿causa o consecuencia? Los primeros indicios que pudieran atribuirle causalidad etiológica a la activación inmune llegaron al registrarse casos de síntomas depresivos en pacientes que estaban recibiendo tratamiento con citoquinas para otras patologías como el cáncer o enfermedades infecciosas (Renault et al., 1987, Janssen et al., 1994, Musselman et al., 2001, Capuron et al., 2004, Raison et al., 2009, Krueger et al., 2011). Aunque existen discrepancias al respecto, la gravedad de dichos síntomas ha sido correlacionada también con la presencia de estos mediadores (Thomas et al., 2005) así como determinados polimorfismos se han postulado como indicadores de riesgo a una mala respuesta ante los antidepresivos o la propia enfermedad (Jun et al., 2003, Yu et al., 2003, Bortolasci et al., 2014). Incluso las más recientes especulaciones otorgan un papel evolutivo a la inflamación en el incremento de la prevalencia de los trastornos depresivos (Miller y Raison, 2016). Por otro lado, las monoterapias basadas en antiinflamatorios, arrojan más sombras que luces sobre la responsabilidad etiológica de la inflamación como característica transversal a la depresión (Kohler et al., 2014, Eyre et al., 2015).

Aún con todas estas dificultades, merece la pena seguir investigando en esta dirección ya que la relación entre depresión e inflamación está ampliamente sustentada y con multitud de puntos de encuentro entre las diferentes hipótesis que baraja su teoría fisiopatológica. Por ello, pensar en tratamientos coadyuvantes que traten de controlar los mediadores proinflamatorios o estimular la propia capacidad antiinflamatoria del organismo puede representar en determinados casos la mejora clínica que los antidepresivos convencionales no son capaces de alcanzar.

1.2.3 *Hipótesis de los factores neurotróficos y neurogénesis hipocampal*

La hipótesis inflamatoria esboza un escenario para los trastornos depresivos cuya potencial consecuencia pudieran ser procesos neurodegenerativos derivados del daño celular y tisular. En sintonía con esta idea, la depresión se ha relacionado con una disminución en el volumen, prioritariamente de materia gris, en regiones de la red prefrontal-límbica implicada en el procesamiento emocional tales como la corteza prefrontal, la orbitofrontal, la cingulada anterior, el giro frontal inferior, el estriado, el tálamo y el hipocampo (Arnone et al., 2012, Bora et al., 2012, Du et al., 2012, Lai, 2013). Es esta última estructura la que se ha identificado

tradicionalmente con los procesos depresivos y más atención ha registrado debido a sus propias características funcionales, su conexión con el estrés y la evidencia combinada de los estudios de resonancia magnética y post-mortem (Rajkowska, 2000, Campbell et al., 2004, Stockmeier et al., 2004).

No existe ni mucho menos evidencia para situar a la depresión como una enfermedad neurodegenerativa e incluso encontramos algún estudio que pone en duda la correlación entre el volumen hipocampal, la influencia del estrés y el trastorno depresivo (Muller et al., 2001) aunque se ha explorado la posibilidad de una conexión con fenómenos apoptóticos tanto en pacientes como en modelos animales (Lucassen et al., 2001, Lucassen et al., 2004). Sin embargo, revisando la literatura observamos cambios en la población glial con el estrés, fenómenos de alteración de la plasticidad y la acción de los antidepresivos convencionales en el hipocampo (Tata y Anderson, 2010, Boldrini et al., 2013). Teniendo en cuenta la singularidad de este área cerebral, capaz de registrar procesos de neurogénesis (Sapolsky, 2004), se planteó por qué no voltear la hipótesis y pensar que la disminución en el volumen pueda estar más relacionada con una interferencia en los procesos de génesis del tejido nervioso en lugar de con fenómenos de neurodegeneración. Sobre estas bases descansa la hipótesis de los factores neurotróficos y la neurogénesis hipocampal.

Las neurotrofinas pertenecen a la categoría de los factores de crecimiento y son moléculas encargadas de la supervivencia, desarrollo y función de las neuronas. El descubrimiento de la primera de ellas, el factor de crecimiento nervioso (NFG) en 1951 le valió el Premio Nobel a sus responsables en 1986 (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951). Más adelante, se agregaron a este grupo el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) (Barde et al., 1982) y las neurotrofinas 3 y 4/5 (Maisonpierre et al., 1990, Hallbook et al., 1991). De entre ellas, el BDNF es el representante más destacado en la investigación en patologías psiquiátricas, incluyendo la depresión.

En el cerebro adulto humano, los procesos de neurogénesis se producen en la región subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Eriksson et al., 1998, Curtis et al., 2003). Su influencia sobre la plasticidad cerebral, así como su afectación por eventos estresantes, han sido ampliamente descritas y, en depresión y otras patologías psiquiátricas, numerosos estudios aportan evidencias sobre alteraciones en la actividad del BDNF que lo postulan como el elemento central de la hipótesis neurotrófica. La expresión del BDNF se encuentra disminuida en trastornos depresivos y los tratamientos antidepresivos actúan sobre la señalización entre él y su receptor tirosina quinasa B (TrkB) para recuperarla (Yoshimura et

al., 2007, Matriciano et al., 2009, Jiang et al., 2015a). Polimorfismos en los genes tanto de BDNF (entre ellos, el más estudiado es el val66met) como de TrkB se han asociado con la predisposición a padecer la patología (Schumacher et al., 2005, Duncan et al., 2009, Avdoshina et al., 2013). Se ha propuesto incluso al BDNF en plasma como un marcador de depresión suicida (Kim et al., 2007b) y la ketamina, una de las moléculas de potencial antidepresivo más prometedor actualmente sobre la que profundizaremos en el punto 1.4.1, es capaz de modular los niveles de BDNF (Autry et al., 2011). En contraposición, el incremento de actividad del BDNF en el núcleo *accumbens* puede aumentar la susceptibilidad al estrés en el circuito de recompensa (Russo y Nestler, 2013) (Figura 3).

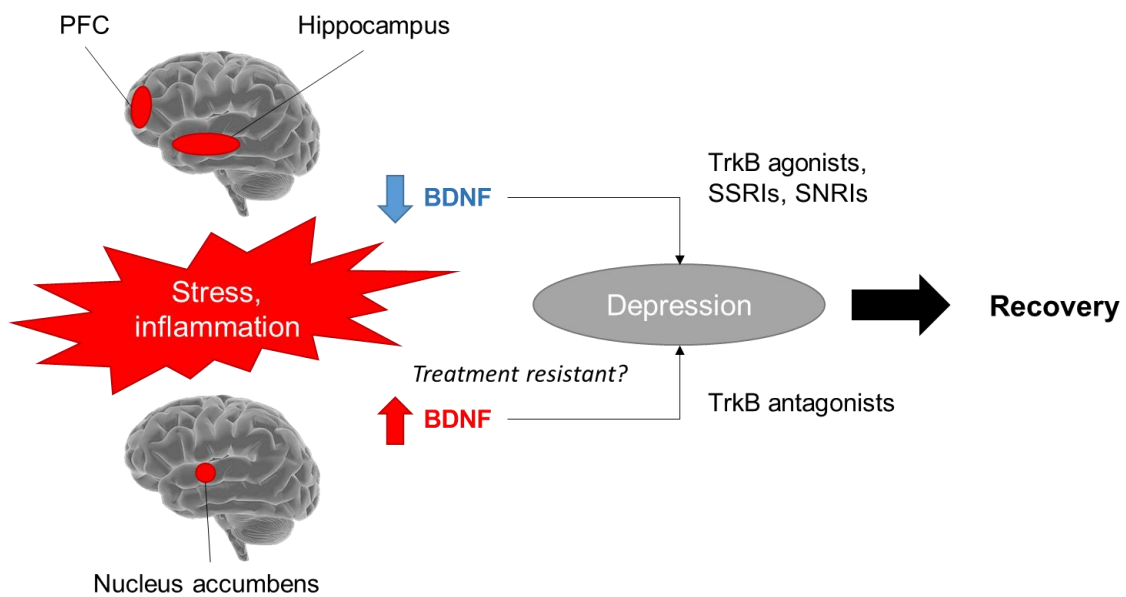


Figura 3. Papel del BDNF en la depresión (adaptado de Zhang et al., 2016). PFC: córtex prefrontal; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; TrkB: quinasa del receptor de tropomiosina B; SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina; SNRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina.

Desde los años 90 y gracias a estudios sobre todo en la corteza visual se comenzaron a descubrir las implicaciones de las neurotrofinas en la plasticidad neuronal (Lo, 1995). El estrés puede ocasionar fallos en el procesamiento de la información de determinadas redes neuronales que podrían estar tras los desórdenes emocionales (Sandi y Bisaz, 2007). Estos problemas, además de la ya desgranada en cuanto al BDNF, pueden guardar también conexión con la expresión de la molécula de adhesión de células neurales (NCAM) implicada en plasticidad, aprendizaje y memoria. El déficit en la expresión de NCAM tiene como consecuencia síntomas ligados a la depresión y su inducción propiedades antidepresivas (Stork et al., 1999, Bukalo et al., 2004, Aonurm-Helm et al., 2008).

El papel del BDNF como factor integrador del resto de hipótesis confiere mayor robustez a la hipótesis neurotrófica y de neurogénesis hipocampal. Las redes moleculares que se extienden desde el BDNF convergen con alteraciones en la transmisión serotoninérgica (Frodl et al., 2008), y las citoquinas proinflamatorias o estímulos inmunes externos como el lipopolisacárido (LPS) inhiben la actividad del BDNF (Wu et al., 2012, Zhang et al., 2015).

1.2.4 Hipótesis mitocondrial: estudios de neuroimagen

Los avances tecnológicos en el campo de la neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la reciente tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) permiten el estudio del metabolismo cerebral y el balance energético *in vivo*. El registro del flujo sanguíneo cerebral y la tasa metabólica de glucosa ha identificado irregularidades en depresión y trastorno bipolar (Strakowski et al., 2000, Moretti et al., 2003, Irwin et al., 2004). La espectroscopia de resonancia magnética con ^{31}P (^{31}P -MRS) había aportado ya datos acerca de una posible disfunción mitocondrial en enfermedades relacionadas con el estado de ánimo en base al análisis de moléculas implicadas en el balance energético. Se han detectado disminuciones en el marcador de disfunción mitocondrial N-acetilaspártato en pacientes bipolares aunque no en depresivos (Stork y Renshaw, 2005) y en metabolitos relacionados con la formación de ATP y el metabolismo fosfolipídico como fosfocreatinina, nucleósidos trifosfato, fosfomonoésteres, fosfodiésteres y fosfato inorgánico en pacientes con depresión (Kato et al., 1992, Volz et al., 1998) (Figura 4).

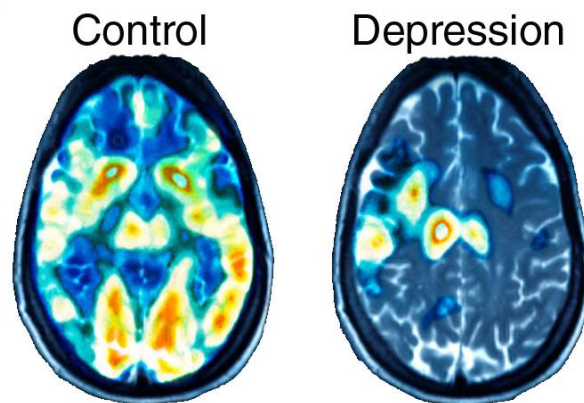


Figura 4. Activación cerebral diferencial en individuos sanos y pacientes depresivos (adaptado de TMS Neuro Solutions, 2016).

A pesar de las limitaciones propias de estas técnicas, sobre todo de la escasa resolución de la ^{31}P -MRS, los indicios indirectos que aportaron y la elevada comorbilidad de los cuadros psiquiátricos con enfermedades mitocondriales (Fattal et al., 2007) favorecieron una profundización en la implicación de estos orgánulos y el balance energético en depresión.

Estudios llevados a cabo en células musculares, plaquetas y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes deprimidos mostraron signos de disfunción mitocondrial (Gardner et al., 2003, Hroudova et al., 2013, Karabatsiakos et al., 2014). Sin embargo, existe algún estudio contradictorio y se infiere una posible contaminación de los resultados por los tratamientos recibidos por la población de estos estudios. En investigaciones con el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS) en roedores, se han recolectado evidencias sobre alteraciones en la función mitocondrial de regiones corticales e hipocampales y una aparente reversión con el tratamiento antidepresivo (Rezin et al., 2008, Gong et al., 2011, Chen et al., 2013). Los últimos estudios trabajando en esta hipótesis apuntan hacia factores de vulnerabilidad relacionados, cambios epigenéticos que operan a través del balance energético y hallazgos sobre el ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial (Beasley et al., 2006, Aguiar et al., 2014, McFarquhar et al., 2014).

La hipótesis mitocondrial es la que menos recorrido temporal lleva y no disponemos de demasiadas evidencias acerca su veracidad, pero ello no es óbice para que no esté sustentada sobre bases coherentes de una posible interacción con el resto de hipótesis. Previamente hemos indicado ya la posible acción de los antidepresivos monoaminérgicos en la restauración de la función mitocondrial tras episodios estresantes (Scaini et al., 2011, Chen et al., 2013). A ello tenemos que añadirle que tanto los procesos pre como post sinápticos tras el tratamiento crónico con antidepresivos llevan asociada una gran carga energética por lo que la actividad de las mitocondrias podría estar ligada a la fisiopatología de la misma. El gasto energético también guarda una estrecha relación con los fenómenos de plasticidad y el BDNF podría estar actuando en la cadena de transporte de electrones favoreciendo la respiración (Markham et al., 2004). De una forma más directa, aunque con escasa evidencia aún, puede conectarse a estos orgánulos con los aspectos inflamatorios de la depresión ya que una de las consecuencias de los mismos es la generación de estrés oxidativo que la mitocondria debe gestionar (Madrigal et al., 2001, Lucca et al., 2009b).

1.3. Diagnóstico de la depresión

La dificultad en el diagnóstico de los trastornos de tipo depresivo radica en su carácter sindrómico alrededor de unos criterios de ardua delimitación e identificación en el paciente. Agregando a este hecho la frecuente presencia de comorbilidades asociadas y la ausencia de biomarcadores característicos, la depresión ni se diagnostica ni se trata en aproximadamente la mitad de la población que la padece (European Depression Association, 2016).

1.3.1 Factores de riesgo

Como casi cualquier enfermedad, la depresión es el complejo resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. Desgranando un poco más este rompecabezas y reconociendo al estrés como el principal desencadenante (Leonard y Song, 1996), las personas que hayan atravesado situaciones vitales difíciles (pérdida de empleo, bajos ingresos, estrés post traumático, conflictos interpersonales, situaciones de duelo, abuso de sustancias...) tienen una probabilidad más alta de sufrir esta patología. Los factores genéticos parecen jugar también un papel importante no sólo desde el punto de vista de polimorfismos de vulnerabilidad sino desde que la propia prevalencia de la depresión es más elevada en mujeres que en hombres (Gabilondo et al., 2010). Este hecho otorga al sexo un valor diferencial como factor de riesgo así como lo tiene la edad de manera directamente proporcional (Mrazek et al., 2014).

La alta comorbilidad de la depresión con otras enfermedades debe tenerse también en cuenta como factor de riesgo para el desarrollo de la misma. Además, la concurrencia simultánea de dos patologías complica el pronóstico de manera recíproca y, al tratarse de una enfermedad crónica, es importante conocer las variables por las que un episodio depresivo agudo puede perpetuarse en el tiempo (Holzel et al., 2011). (Figura 5)

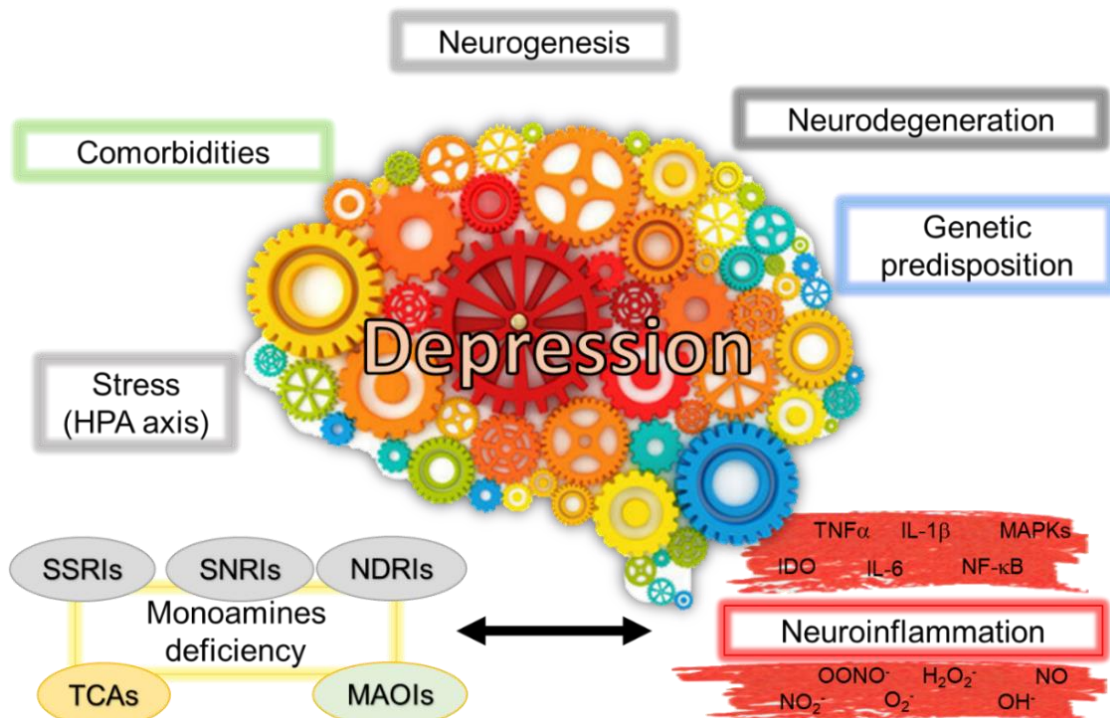


Figura 5. Factores de riesgo en la depresión. HPA: eje hipotálamo-hipófisis adrenal; SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina; SNRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina; NDRI; inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina y dopamina; TCA: antidepressivo tricíclico; MAOI: inhibidor de la monoaminoxidasa.

1.3.2 Criterios diagnósticos del trastorno depresivo mayor

El “Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales”, conocido como DSM, proporciona la clasificación de las enfermedades mentales y los criterios diagnósticos de las mismas. El espectro de trastornos depresivos es amplio y englobados en él podemos encontrar diferentes manifestaciones. En la última edición hasta la fecha del mismo, el DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013), encontramos dentro del apartado trastornos depresivos los criterios de diagnóstico para el trastorno depresivo mayor (MDD) en el que se centra esta tesis doctoral.

Criterios diagnósticos del trastorno depresivo mayor (MDD)

- A.** Cinco (o más) de los siguientes síntomas presentes durante 2 semanas y que representan un cambio respecto al estado de ánimo previo: al menos uno de estos síntomas debe ser (a) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida del interés o placer:

Nota: no incluir síntomas claramente atribuibles a otra condición médica

- a.** Estado de ánimo depresivo la mayoría del día, casi cada día, según lo indique el propio sujeto (por ejemplo, se siente triste, vacío, desesperanzado) o la observación de otras personas (por ejemplo, parece lloroso). *Nota: en niños y adolescentes el estado de ánimo puede ser irritable.*
- b.** Marcado descenso del interés o del placer en todas, o casi todas, las actividades la mayoría del día, casi cada día (indicado por el propio sujeto o por la observación de otros).
- c.** Pérdida de peso significativa sin estar a dieta o ganancia de peso (por ejemplo, cambio de más del 5% del peso corporal en un mes) o disminución o aumento del apetito casi todos los días. *Nota: en niños valorar el fracaso para hacer la ganancia de peso esperada.*
- d.** Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
- e.** Agitación o enlentecimiento psicomotores casi cada día (observable por los demás, no meras sensaciones de inquietud o enlentecimiento).
- f.** Fatiga o pérdida de energía casi cada día.
- g.** Sentimientos de inutilidad o de culpa excesivos o inapropiados (que pueden ser delirantes) casi cada día (no sólo remordimiento o culpa por estar enfermo).
- h.** Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o indecisión, casi cada día (ya sea atribución subjetiva u observación ajena)

- i. Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor a la muerte), ideación suicida recurrente sin un plan específico o una tentativa de suicidio o un plan específico para suicidarse.
- B. Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas sociales, ocupacionales, u otras importantes del funcionamiento.
- C. El episodio no es atribuible a los efectos fisiológicos de una sustancia o a otra enfermedad médica.

Nota: Criterios de A-C representan un episodio depresivo mayor.

Nota: Las respuestas a una pérdida significativa (por ejemplo, pérdida, ruina económica, las pérdidas por un desastre natural, una enfermedad grave o discapacidad) pueden incluir los sentimientos de intensa tristeza, reflexión sobre la pérdida, insomnio, falta de apetito y pérdida de peso señalados en el Criterio A, que puede parecerse a un episodio depresivo. Aunque tales síntomas pueden ser comprensibles o se consideren apropiados para la pérdida, la presencia de un episodio depresivo mayor, además de la respuesta normal a una pérdida significativa debe ser considerada cuidadosamente. Esta decisión requiere inevitablemente el ejercicio del juicio clínico basado en la historia del individuo y las normas culturales para la expresión de angustia en el contexto de la pérdida.

- D. La aparición del episodio depresivo mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, u otro del espectro esquizofrénico especificadas y no especificadas y otros trastornos psicóticos.
- E. Nunca ha habido un episodio maníaco o un episodio de hipomanía. *Nota: Esta exclusión no es aplicable si todos los episodios maníacos o hipomanía son inducidos por sustancias o son atribuibles a los efectos fisiológicos de otra enfermedad médica.*

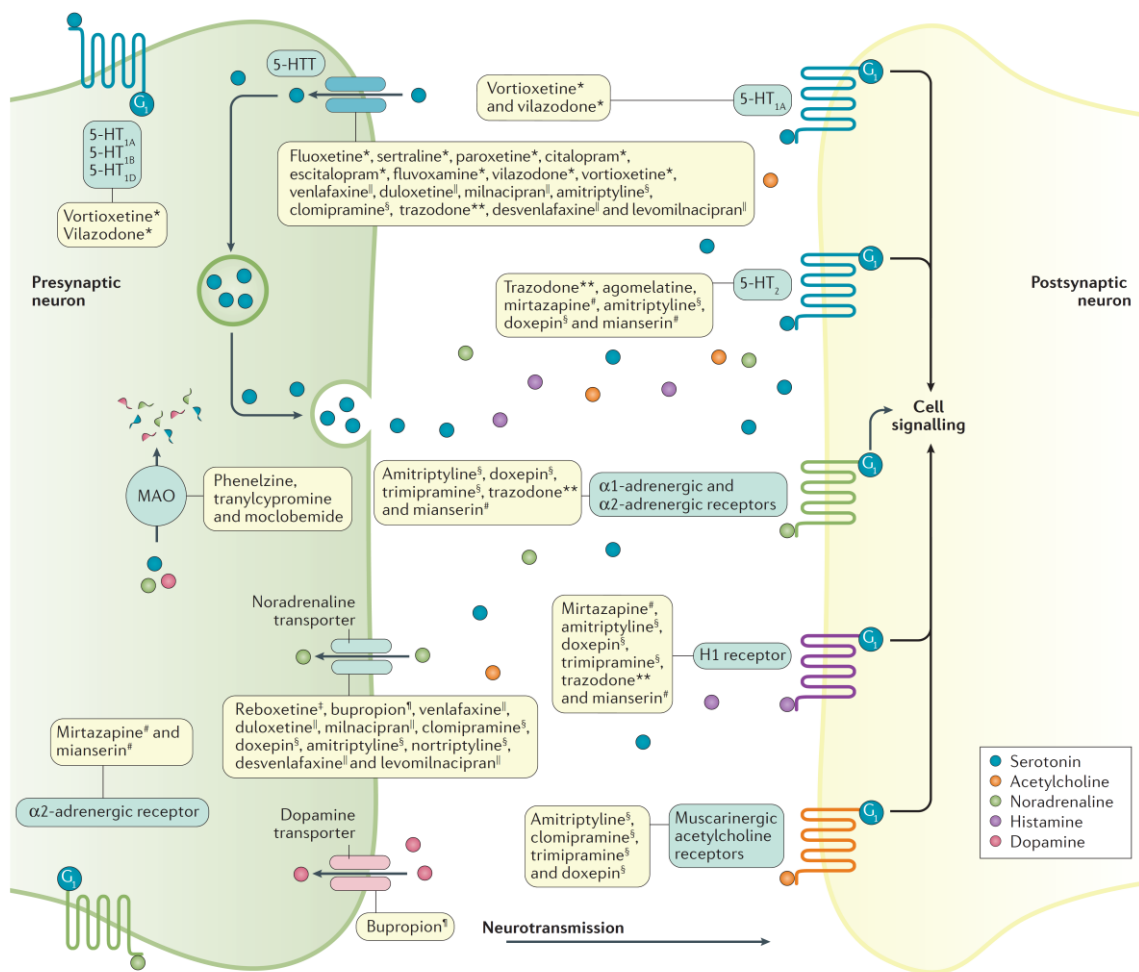
1.4. Tratamientos disponibles para la depresión

A pesar de la existencia de un tercio de pacientes que no parecen responder a los fármacos convencionales (Mrazek et al., 2014), actualmente hay multitud de tratamientos para, tanto en solitario como combinados, combatir y paliar los síntomas de la depresión. Dada la magnitud en salud pública de la enfermedad, el esfuerzo por mejorar los ya disponibles y buscar nuevas alternativas hace que el número de ensayos clínicos y la inversión de la industria farmacéutica sean muy elevados, por lo que no es raro encontrar nuevos compuestos saliendo al mercado para su tratamiento, en ocasiones, de eficacia contrastada únicamente en casos específicos y para los que la fase IV del ensayo clínico determinará su validez para la población general. Por

ello, nos centraremos en describir las terapias más consolidadas para paliar los síntomas de la depresión.

1.4.1 Fármacos antidepresivos

Los fármacos clásicos para el tratamiento de la depresión están basados en la hipótesis monoaminérgica por lo que tratan de reestablecer los niveles de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica a través de distintos mecanismos. Distinguimos dos generaciones, la primera gobernada por los pioneros para el desarrollo de esta teoría, los antidepresivos tricíclicos (ATCs) y los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAOs), y una segunda caracterizada por la inhibición selectiva de los recaptadores de la serotonina (ISRSs) o combinando de forma dual esta inhibición selectiva con la de los recaptadores de noradrenalina (IRSNs). A modo de resumen, podemos ver a los principales representantes de cada grupo y un esquema de la farmacodinamia de los mismos en la Figura 6.



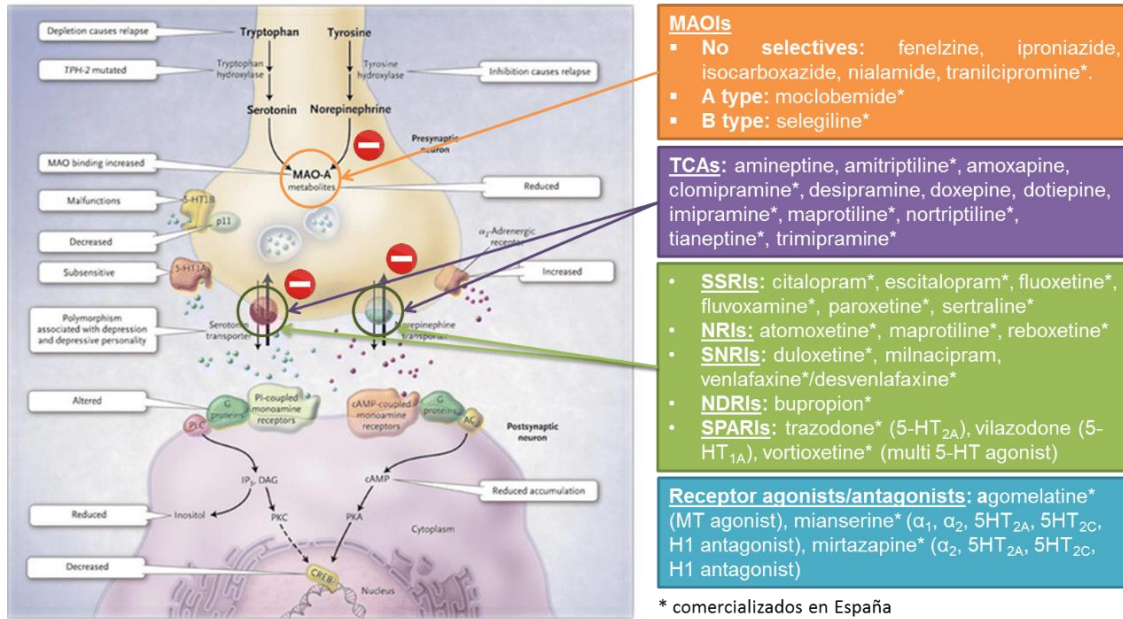


Figura 6. Mecanismos de acción y clasificación de los antidepresivos disponibles actualmente contra la depresión (adaptado de Belmaker y Agam, 2008, Otte et al., 2016). MAO: monoaminooxidasa; MAOI: inhibidor de la monoaminooxidasa; TCA: antidepresivo tricíclico (marcado con [§]); SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina (marcado con *); NRI: inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina (marcado con ‡); SNRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina (marcado con †); NDRI: inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina y dopamina (marcado con †); SPARI: agonista parcial de serotonina e inhibidor de su recaptación (marcado con **); 5-HT: serotonina; 5-HT_x: receptor de serotonina “x”; MT: receptor de melatonina; α: receptor *alfa* adrenérgico (marcado con #), H1: receptor de histamina.

Como muestra el último informe de la Agencia Española de Alimentos y Productos Sanitarios (AEMPS), la prescripción clínica de los fármacos antidepresivos se encuentra monopolizada por los antidepresivos de segunda generación quedando los de primera para los pacientes no respondedores al tratamiento o situaciones especiales de comorbilidad con otras patologías donde puedan también ser eficaces (AEMPS, 2014). (Figura 7)

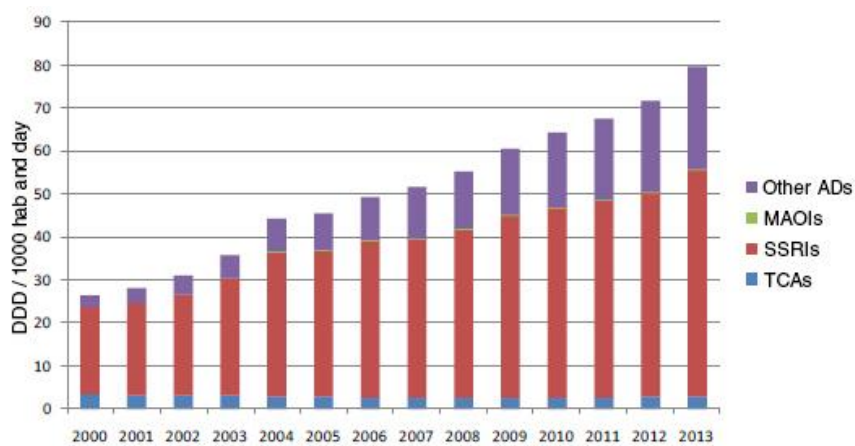


Figura 7. Consumo de antidepresivos en España (adaptado de AEMPS, 2014). AD: antidepresivo; MAOI: inhibidor de la monoaminooxidasa; SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina; TCA: antidepresivo tricíclico.

a Antidepresivos de primera generación: ATCs e IMAOs

Los antidepresivos tricíclicos (ATCs) y los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAOs) fueron los primeros fármacos para el tratamiento de la depresión cuyo descubrimiento fortuito se dio en los años 1950s (Crane, 1956, Kuhn, 1958). A pesar de resultar coetáneos, presentan un mecanismo de acción diferente.

Se desconocen completamente todos los mecanismos sobre los que actúan los ATCs, pero su acción antidepresiva se cree fundamentalmente mediada por su potente inhibición de los recaptadores de noradrenalina y serotonina (Tatsumi et al., 1997). Sin embargo, la escasa selectividad de esta familia de compuestos hace que ejerzan acciones sobre otros tipos de receptores poseyendo también una probada función anticolinérgica y antihistamínica (Cusack et al., 1994). Como consecuencia, el perfil de efectos adversos que poseen es extenso y complejo por lo que se reserva su prescripción únicamente para los pacientes no respondedores de depresión y a dosis reducida (Furukawa et al., 2002).

Los IMAOs actúan bloqueando la enzima de degradación de las monoaminas, la monoaminoxidasa (MAO), para incrementar su concentración y efectos post sinápticos. Dos propiedades fundamentales clasifican a estos fármacos: la selectividad y la reversibilidad. Por su selectividad, encontramos dos tipos de IMAOs capaces de inhibir las isoformas A o B humanas que poseen especificidad por determinados sustratos y diferencias en su localización. La MAO-A desamina la serotonina, melatonina, noradrenalina y adrenalina mientras que la MAO-B se encarga de la feniletilamina y la benzilamina. Ambas MAOs degradan la dopamina, la tiramina y la triptamina y su distribución tisular es diferente, encargándose la MAO-A, con presencia también en el SNC, principalmente de los órganos periféricos hígado, tracto gastrointestinal y placenta y dominando la MAO-B las acciones en el cerebro aunque encontrándose también en sangre y plaquetas (Shulman et al., 2013). La reversibilidad es otro aspecto a tener en cuenta en los IMAOs. Los primeros en aparecer se unían al sustrato de manera covalente y, por lo tanto, irreversible, provocando un efecto sostenido en el tiempo hasta la renovación de la enzima cada dos semanas. Otros más modernos son capaces de hacerlo reversiblemente en un equilibrio de concentraciones entre fármaco y enzima (Fowler et al., 2010) relación que parece gobernar también la selectividad (Finberg y Gillman, 2011). Como consecuencia de todas estas características, las complicaciones que pueden derivarse del uso de los IMAOs pueden ser muy peligrosas y quedan reservados para los casos más graves. Su uso es incluso menor al de los ATCs debido a los efectos adversos como crisis hipertensivas y a las múltiples interacciones con otros fármacos o con la dieta, aunque en los últimos años se están acometiendo esfuerzos en

investigación por diseñar nuevas formulaciones farmacéuticas que constituyan una alternativa más segura para pacientes con problemas de adherencia al tratamiento o con ausencia de respuesta al mismo (Cohen y Sclar, 2012).

b Antidepresivos de segunda generación: ISRSs, IRSNs

La segunda generación de antidepresivos surgió como evolución de la primera para tratar de reducir sus efectos adversos. En un principio se creía que venían provocados por la acción de los ATCs sobre los recaptadores de noradrenalina. Tras casi una década de investigación, Berntsson et al. (1972) patentaron la zimelidina, el primer ISRS comercializado en 1982 y prematuramente retirado del mercado un año más tarde por la aparición de casos del síndrome de Guillain-Barré asociados a su consumo (Fagius et al., 1985). Fue el pistoletazo de salida al desarrollo y comercialización de los ISRSs tales como fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram y escitalopram entre 1987 y 2003 y, un poco después, los IRSNs duloxetina, venlafaxina y desvenlafaxina entre 1995-2008. La creación de este último grupo responde a la hipótesis de que los pacientes no respondedores a los ISRSs podrían hacerlo a los IRSNs, situación que no ha sido probada en su totalidad (Rush et al., 2006b, Lam et al., 2010, Signorovitch et al., 2011). A pesar de ello, los ISRSs e IRSNs ostentan casi desde su origen la primera línea en el tratamiento de la depresión por ser los fármacos más seguros y eficaces disponibles (AEMPS, 2014).

c Últimos avances en farmacoterapia

La urgente necesidad de encontrar tratamientos más efectivos frente al trastorno depresivo hace que una enorme cantidad de nuevas moléculas se encuentren en desarrollo como fármaco en sus distintas fases, alcanzando algunas su comercialización. No sólo de la creación *de novo* se está sirviendo la industria, si no del reciclaje de medicamentos destinados al tratamiento de otras patologías y ante los que los nuevos avances en el conocimiento de la fisiopatología vierten esperanzas sobre posibles efectos antidepresivos.

Para el grupo conocido como antidepresivos atípicos, la hipótesis monoaminérgica continúa siendo su diana farmacológica bien a través de acciones en transportadores, receptores o combinaciones de las mismas. Entre ellos destaca el bupropion cuyo mecanismo de acción parece estar relacionado con una inhibición débil de la receptación de noradrenalina y dopamina y que parece reportar menos efectos secundarios sobre la función sexual (Sayuk et al., 2011). La mirtazapina es un inhibidor débil de la receptación de adrenalina, bloquea los receptores α_2 adrenérgicos y algunos subtipos de receptores de serotonina, y ha demostrado también su eficacia normalizando parámetros relacionados con la hipótesis inflamatoria (Gupta et al., 2016). Los principales efectos adversos descritos son la ganancia de peso y la sedación (Fava et

al., 2001). Trazodona y nefazodona antagonizan el receptor de serotonina 5-HT₂ e inhiben débilmente los recaptadores de serotonina y noradrenalina y son eficaces, aunque provocan dolor de cabeza y somnolencia (Baldwin et al., 2001). Un inhibidor selectivo pero de la recaptación de noradrenalina, la reboxetina, se ha utilizado como antidepresivo desde hace casi 20 años y existen investigaciones que refrendan su eficacia (Papakostas et al., 2008), aunque recientes estudios lo señalan como ineficaz y peligroso por sus efectos secundarios (Eyding et al., 2010). Por último, cabe destacar la vortioxetina y la vilazodona por su novedad y un sofisticado perfil de acción. El primero, además de inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, es antagonista 5-HT_{1D}, 5-HT_{3A} y 5-HT₇ y agonista parcial 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} (Boulenger et al., 2014). La vilazodona por su parte, es un agonista parcial de serotonina e inhibidor de su recaptación (SPARI), que fue aprobado para el tratamiento de la depresión por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2011 (Laughren et al., 2011). Un caso curioso es la agomelatina que entronca parte de la hipótesis monoaminérgica (es antagonista 5-HT_{2C}) con la relación existente entre la depresión y alteraciones en los ritmos circadianos y del sueño (agonista de los receptores de melatonina MT1 y MT2). Su prescripción es aún muy discutida ya que provoca un incremento transitorio muy elevado en enzimas hepáticas, motivo por el que se encuentra prohibido en Estados Unidos (Howland, 2011).

Uno de los retos que ha de afrontar la farmacoterapia es la rebaja en los tiempos de espera para que los antidepresivos empiecen a ser efectivos (estimada en alrededor de 2 semanas) y que es motivo del abandono de los mismos o, más grave aún, de la ausencia de control sobre las depresiones con ideaciones suicidas. En este contexto, surge la investigación sobre los denominados antidepresivos de acción rápida basados en la neurotransmisión glutamatérgica como elemento central de todas las hipótesis fisiopatológicas a partir del estrés (Mathews et al., 2012), como se explica en el punto 2.4 de la presente Tesis Doctoral. El máximo representante es la ketamina, que antagoniza los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Su eficacia frente a la depresión registra un rápido rango de acción iniciándose en las primeras 48 horas (incluso en apenas horas) y manteniéndose los efectos al menos una semana (Zarate et al., 2006). A pesar de ello, su conocido perfil como droga de abuso hace que sea insostenible su aplicación sistemática como antidepresivo (Morgan y Curran, 2012). Un reciente estudio puede resultar revolucionario para el desarrollo de los fármacos de acción rápida ya que ha identificado a un metabolito de la ketamina, la (2R,6R)-hidroxinorketamina, como responsable de los efectos antidepresivos de esta droga sin presentar efectos adversos. Actuaría independientemente de la inhibición de los receptores NMDA y ejercería sus acciones mediante la activación sostenida

de los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Zanos et al., 2016).

Los recientes avances y evidencias que sustentan las diferentes hipótesis de la depresión y que la relacionan con procesos fisiológicos para los que ya existen fármacos seguros han abierto la puerta a su reciclaje para la terapia antidepresiva, la mayoría de las veces propuestos como terapias coadyuvantes en una administración concomitante junto a los antidepresivos convencionales. Así, encontramos moduladores del eje HHA como la mifepristona (Flores et al., 2006), suplementos de ácidos grasos ω -3 (Ginty y Conklin, 2015), celecoxib y etanercept como compuestos antiinflamatorios (Tyring et al., 2006, Abbasi et al., 2012) y antipsicóticos como olanzapina y quetiapina (Komossa et al., 2010).

Toda esta ingente cantidad de potenciales sustancias antidepresivas obedece al desconocimiento de la fisiopatología depresiva en su totalidad y a un factor capital en su desarrollo: la vulnerabilidad interindividual tanto a la enfermedad como a la respuesta al tipo de fármaco. Por ello, la farmacogenómica puede ser la piedra angular sobre la que se construya el futuro del tratamiento de la depresión.

1.4.2 *Métodos físicos*

Los métodos de base física se reservan para los casos de depresión más graves y en pacientes que no responden al tratamiento farmacológico, encontrándose aún muchas de ellas debido a su novedad en fases de desarrollo y evaluación.

La terapia electroconvulsiva se ha revelado como quizá la técnica más efectiva para combatir la depresión hasta el punto en el que es el tratamiento de primera línea para los subtipos suicida y psicótica gracias a su rapidez de acción y la prevención de recaídas (Kellner et al., 2006). La disfunción de memoria y el estigma asociado son sus grandes defectos. Existen evidencias prometedoras en otras técnicas, pero se encuentran aún todas ellas en fase de evaluación. Aunque inicialmente diseñado para hacer frente a la epilepsia, la estimulación del nervio vago parece mostrar también efectos antidepresivos (Martin y Martin-Sanchez, 2012). Situaciones similares se dan con la estimulación magnética transcraneal (Berlim et al., 2013) y su variante de radiación *theta* con implicaciones en plasticidad (Li et al., 2014a), la incipiente terapia magnética (Fitzgerald et al., 2013) o la estimulación cerebral profunda (Schlaepfer et al., 2013).

1.4.3 *Psicoterapias*

Las psicoterapias conforman una parte esencial en el tratamiento de la depresión en la vida adulta. Numerosos estudios en las últimas dos décadas muestran la eficacia real de diferentes

variedades de ellas como la terapia cognitivo-comportamental, la interpersonal, la de activación del comportamiento, la de resolución de problemas, la de consejo indirecto o la psicodinámica (Gloaguen et al., 1998, Cuijpers et al., 2007, Driessen et al., 2010, Cuijpers et al., 2011, Cuijpers et al., 2012, Cuijpers et al., 2013, Ekers et al., 2014). Incluso algún estudio correlaciona la psicoterapia con la disminución de parámetros fisiológicos inflamatorios (Moreira et al., 2015). Una de las principales críticas hacia las psicoterapias es su inefectividad en el corto plazo aunque existen investigaciones que lo ponen en duda y la equiparan a la de la farmacoterapia (Barth et al., 2013).

Aunque se alejan de los objetivos de esta Tesis Doctoral, se ha creído más que conveniente mencionarlas ya que existe evidencia suficiente para valorar su aplicabilidad y resultados en el tratamiento de la depresión. Probablemente la respuesta definitiva a su curación esté mucho más cerca de un esfuerzo de cooperación multidisciplinar y de una terapia combinada entre las diferentes disciplinas que convergen en esta patología (Cuijpers et al., 2014).

2. El estrés y la enfermedad mental

2.1. El estrés como desencadenante de patologías psiquiátricas

El término estrés proviene del vocablo anglosajón “*stress*” que significa tensión. La transición desde el campo de la física, donde lo introdujo Robert Hooke en el siglo XVII, al de la medicina la llevo a cabo Hans Selye en 1936 al definir el Síndrome General de Adaptación (Selye, 1936). En él, Selye describía una respuesta del organismo en tres fases ante un estímulo potencialmente nocivo.

En la primera, a la que llamó fase de alarma, el organismo percibe el peligro y pone en marcha los mecanismos necesarios para la resolución de la situación mediante la secreción de adrenalina y glucocorticoides (GCs), ambas moléculas de acción rápida. Tras este primer contacto vendría la fase de resistencia donde el organismo, gracias a los cambios desencadenados en la fase de alarma, ya se encuentra focalizado para hacer frente al peligro, desatendiendo incluso otras funciones fisiológicas. Finalmente, si el estímulo no ha sido neutralizado y persiste, se sobrepasa el umbral de la fase de resistencia alcanzándose la fase de agotamiento. En este punto el organismo ha sido incapaz de sobreponerse a la situación estresante y ha agotado sus reservas energéticas, tratando de poner de nuevo en marcha la fase de alarma y con consecuencias fatales que propician el desarrollo de patologías debido a una mala adaptación e incluso pueden llevar a la muerte (Figura 8).

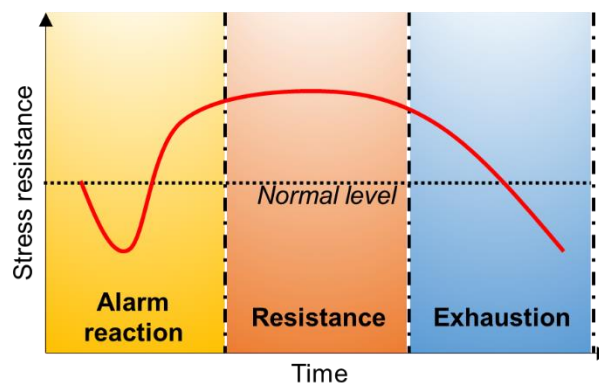


Figura 8. Fases del Síndrome General de Adaptación: alarma, resistencia y agotamiento.

El estrés representa pues una respuesta de lucha o huida (*fight or flight*, según el creador del término, Walter Cannon (1929a)) para el individuo que no es más que una adaptación necesaria para superar la amenaza presente o poder huir de ella. Todos los cambios fisiológicos que se derivan de la puesta en marcha de la fase de alarma preparan al organismo para facilitar la detección del peligro y dirigir el balance energético hacia su afrontamiento. Estamos pues, ante

una reacción totalmente necesaria para la supervivencia pero que, de sostenerse en el tiempo puede acarrear graves consecuencias.

Así, distinguimos dos tipos de estrés según su resolución que provocaron la actualización de su definición (Selye, 1975). El estrés positivo o *eustrés* sería aquel cuyo proceso resolutivo es bien completado por el organismo y lleva a un nuevo equilibrio homeostático que puede incluso reportar beneficios. En el lado contrario se sitúa el *distrés*, representando una adaptación deficiente al estímulo estresante que puede representar el origen de enfermedades.

La actualización en la definición no terminó de plasmar la realidad ya que posteriores descubrimientos evidenciaron que la respuesta general de adaptación no siempre se desarrolla de manera estereotípica sino que las respuestas fisiológicas dependen del tipo e intensidad del estímulo estresante, de la vulnerabilidad del individuo frente a los mismos y de la etapa del desarrollo en la que se produzcan ya que modifican la plasticidad neuronal (McEwen y Morrison, 2013). Incluso se ha asociado al sexo masculino la respuesta *fight or flight* y al femenino otra más del tipo “proteger-empatizar” (*tend-befriend*) (Taylor et al., 2000).

Estas investigaciones provocaron que la definición de estrés se volcase más en el fenómeno de adaptación del organismo al desafío estresante. Así, el estrés, que puede ser físico, psicológico o mixto, desencadena dos mecanismos: la homeostasis y la alostasis. La homeostasis es el equilibrio dinámico de autorregulación corporal que permite el mantenimiento de los parámetros biológicos dentro de unos límites donde desempeñar sus funciones con normalidad (Cannon, 1929b) y la alostasis sería el proceso activo por el que el cuerpo responde a estímulos diarios y mantiene dicha homeostasis (Sterling y Eyer, 1988). La diferencia entre ambos la ejemplifica Robert Sapolsky en su popular libro “¿Por qué las cebras no tienen úlcera?” (Sapolsky, 1998):

“La homeostasis es la regulación del cuerpo hacia un equilibrio, mediante ajuste a un único punto como el nivel de oxígeno, la glucosa o el pH sanguíneos. Por ejemplo, si una persona caminando por el desierto tiene calor, el cuerpo comenzará a sudar y rápidamente se deshidratará. La alostasis es la adaptación con el objetivo de un balance mucho más dinámico. En la deshidratación, la sudoración sólo ocurre como una pequeña parte del proceso con otros muchos sistemas adaptando también su funcionamiento tanto para reducir el uso de agua como para apoyar la variabilidad de otros sistemas que están cambiando para ayudarle. En este caso, los riñones reducen la producción de orina, las membranas mucosas de boca, nariz y ojos se secan, el flujo de orina y sudor disminuye, la liberación de hormona antidiurética incrementará y las

venas y arterias se contraerán para mantener la presión sanguínea con un pequeño volumen de sangre.”

Si la situación estresante se cronifica y no se puede gestionar bien por exceso o por defecto de la capacidad de respuesta del organismo se convierte en carga o sobrecarga alostática y es el origen de multitud de enfermedades (McEwen, 1998). Esto en el ser humano adquiere una importancia capital ya que nuestra propia naturaleza ha desafiado a nuestro diseño biológico y hace que seamos capaces de generarnos estrés de tipo psicológico antes de que se produzca el propio estímulo y que, además, seamos capaces de revivirlo cuantas veces sea necesario *a posteriori*. La propia naturaleza humana contribuye pues de manera capital a la comprensión de la cronicidad del fenómeno del estrés y convertirlo en foco de una alostasis deficiente.

Dentro de las enfermedades provocadas por el estrés, las mentales adquieren gran relevancia hasta el punto de que la mayoría de ellas pueden relacionarse causalmente con eventos estresantes (Leonard y Song, 1996). Esto se explica, ni más ni menos, por nuestra propia biología y la existencia de un eje HHA encargado de regular la respuesta al estrés y cuyos mediadores son moléculas neuroendocrinas con capacidad de señalar en el sistema nervioso central (SNC) especialmente en zonas directamente relacionadas con el procesamiento emocional y la cognición como el hipocampo y la corteza prefrontal (Sapolsky, 1996). La modulación del sistema inmune, de los sistemas de neurotransmisión y de la plasticidad sináptica provocada por el estrés contextualizan los elementos comunes subyacentes a las patologías psiquiátricas (McEwen y Morrison, 2013). Como ha sido señalado previamente, la cronicidad del estrés será la carga alostática, sostenida en la especie humana en multitud de ocasiones por el estrés psicológico y responsable en última instancia de la prevalencia de las enfermedades mentales en la sociedad moderna. De hecho, en la clínica se utilizan escalas para medir el estrés, como la escala de estrés percibido (PSS) (Cohen et al., 1983) (Tabla 2), en las que puntuar alto se relaciona con la aparición del trastorno depresivo mayor al mes o a los dos meses (Kendler et al., 1999).

	Nunca	Casi nunca	De vez en cuando	A menudo	Muy a menudo
1. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado afectado por algo que ha ocurrido inesperadamente?	0	1	2	3	4
2. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido incapaz de controlar las cosas importantes en su vida?	0	1	2	3	4

3. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido nervioso o estresado?	0	1	2	3	4
4. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha manejado con éxito los pequeños problemas irritantes de la vida?	0	1	2	3	4
5. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que ha afrontado efectivamente los cambios importantes que han estado ocurriendo en su vida?	0	1	2	3	4
6. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado seguro sobre su capacidad para manejar sus problemas personales?	0	1	2	3	4
7. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las cosas le van bien?	0	1	2	3	4
8. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que no podía afrontar todas las cosas que tenía que hacer?	0	1	2	3	4
9. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar las dificultades de su vida?	0	1	2	3	4
10. En el último mes, ¿con que frecuencia se ha sentido que tenía todo bajo control?	0	1	2	3	4
11. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado enfadado porque las cosas que le han ocurrido estaban fuera de su control?	0	1	2	3	4
12. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha pensado sobre las cosas que le quedan por hacer?	0	1	2	3	4
13. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar la forma de pasar el tiempo?	0	1	2	3	4
14. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las dificultades se acumulan tanto que no puede superarlas?	0	1	2	3	4

Tabla 2. *Escala de estrés percibido PSS (versión española).* Las preguntas en esta escala hacen referencia a sus sentimientos y pensamientos durante el último mes. En cada caso, por favor indique con una "X" cómo usted se ha sentido o ha pensado en cada situación. Puntuación total de la PSS:

- invertir las puntuaciones de los ítems 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 13 (0=4, 1=3, 2=2, 3=1 y 4=0)
- sumar los 14 ítems.

A mayor puntuación, mayor nivel de estrés percibido.

2.2. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)

Estructuras tanto centrales como periféricas conforman el eje del estrés o eje HHA. Aunque las principales se encuentran en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), el lóbulo anterior de la glándula pituitaria y la glándula suprarrenal, hemos de señalar a otras fundamentales en su regulación como el sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático) o las neuronas noradrenérgicas de la médula espinal (Smith y Vale, 2006).

La respuesta al estrés puede ser desencadenada por diferentes estructuras de las que el hipotálamo recibe aferencias: la médula espinal, la lámina terminal, núcleos hipotalámicos y el sistema límbico. Las tres primeras tienen una relación directa con la detección de desviaciones homeostáticas, es decir, estresores de tipo físico. Será el sistema límbico (corteza prefrontal, amígdala e hipocampo) el que gestione los de tipo psicológico mediante la detección por los sistemas sensoriales o su evocación por recuerdos que produce una activación neuronal cortical que se propaga al sistema límbico, donde se liberan noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y acetilcolina (ACh). Sea cual fuere la inervación aferente estimulada, la acción de estos neurotransmisores sobre el área dorsomedial parvocelular del PVN induce la producción de la CRF, la molécula central en la coordinación de la respuesta al estrés (Guillemin y Rosenberg, 1955). El CRF viaja desde la eminencia media hipotalámica hasta la hipófisis anterior por el sistema venoso portahipofisario (Ohtani et al., 1987). Las células corticotropas presentes en esta estructura reaccionan produciendo proopiomelanocortina (POMC) que, tras su procesamiento, genera la hormona adrenocorticotropa (ACTH), β -endorfina y la hormona estimulante de melanocitos alfa (MSH- α) (Cawley et al., 2016). De las células parvocelulares también se libera vasopresina que actúa sinérgicamente con el CRF sobre la liberación de la ACTH (Mouri et al., 1993). La ACTH se libera a circulación sistémica y alcanza las zonas fasciculada y reticular de la corteza adrenal para estimular la liberación de GCs. Las células cromafines de la medula adrenal, a su vez, se encuentran sintetizando catecolaminas debido a la activación simpática provocada por el estrés por conexiones con el núcleo del tracto solitario (Schwaber et al., 1982). Los GCs y las catecolaminas son conocidas como las “*hormonas del estrés*” y se encargan de ejercer las acciones fisiológicas necesarias para redirigir el flujo energético hacia la disposición del cuerpo para afrontar la situación estresante. Los responsables de reestablecer la situación inicial mediante un mecanismo de *feedback* negativo son los GCs a través de sus receptores sobre todo en la hipófisis, el hipocampo y la corteza prefrontal (Axelrod y Reisine, 1984) (Figura 9).

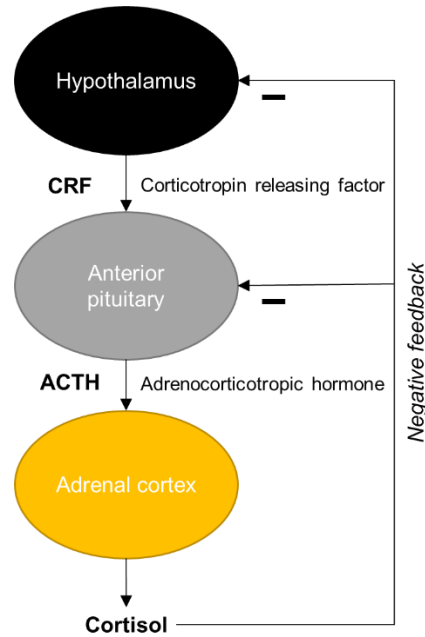


Figura 9. Esquema eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)

Si la respuesta es adaptativa, la resolución de la situación estresante será correcta y el organismo habrá superado el desafío de forma satisfactoria. Los mecanismos y acciones de las hormonas del estrés son tan potentes y críticas encaminadas a sobrevivir ante el estresor que no es de extrañar que cualquier desregulación o activación crónica del mismo tenga consecuencias nefastas para el individuo y pueda suponer el desarrollo de patologías.

2.3. El estrés y la inflamación

El nexo entre estrés e inflamación queda patente al comprender al primero como mecanismo de adaptación siendo su principal función redirigir el balance energético hacia los sistemas necesarios para superar el desafío, dejando momentáneamente desatendidas otras funciones innecesarias en el momento como la inmune. No en vano, los GCs, una de las principales moléculas involucradas en el estrés, han sido considerados desde su descubrimiento como las moléculas antiinflamatorias más potentes (Hench et al., 1950). Aunque esta situación podría continuar teniendo validez a nivel periférico, los últimos 20 años de investigaciones en el SNC han tirado por tierra la percepción del cerebro como órgano inmunoprivilegiado y apuntan hacia una realidad tan diferente como opuesta. La influencia de la cronicidad y el tipo de estrés psicológico parecen encontrarse tras las reacciones inflamatorias que se registran en el SNC, englobadas bajo el concepto de neuroinflamación, donde incluso los GCs podrían presentar propiedades proinflamatorias, en lo que se denominó “paradoja glucocorticoidea del estrés” (García-Bueno et al., 2008a, Sorrells et al., 2009). Además, la permeabilidad transitoria de la barrera hematoencefálica tras la exposición a estrés permite el paso de mediadores

inflamatorios a su través estableciendo una conexión entre periferia y SNC (Madrigal et al., 2002). Por otro lado, la comunicación bidireccional intestino-cerebro explica a nivel periférico la conexión atribuida a las enfermedades gastrointestinales con el estrés y la inflamación (Hart y Kamm, 2002) y será analizada en profundidad en la sección 4.2.

2.3.1 *Los glucocorticoides (GCs) y la inflamación: una realidad dual*

Los glucocorticoides (GCs) reciben su nombre debido a sus acciones sobre el metabolismo glucídico para permitir al organismo disponer de energía en la respuesta al estrés, aunque también poseen funciones cardiovasculares, inmunes y comportamentales además de las metabólicas ya mencionadas. En circunstancias fisiológicas normales, los GCs se encuentran en plasma unidos en un 90% a la globulina fijadora de corticosteroide (CBG) (aunque una pequeña parte puede hacerlo a la albúmina) que los mantiene inactivos e incluso parece poder tener implicaciones en su liberación en el sitio de acción adecuado (Klieber et al., 2007). Junto a los mineralocorticoides, los GCs conforman el grupo de los corticosteroides, hormonas esteroideas producidas en la corteza adrenal que por sus propias características bioquímicas pueden difundir libremente a través de la membrana plasmática hasta unirse a sus receptores citoplasmáticos y translocar al núcleo para ejercer su acción transcripcional sobre el genoma. Este constituye el mecanismo de acción genómico o lento y depende de la acción de los GCs sobre dos tipos de receptores: los de mineralocorticoides (MR) y los de glucocorticoides (GR). Tras la unión con su ligando, homodimerizan y se desprenden de las proteínas de choque térmico (Hsp) permitiéndose su entrada en el núcleo (Cadepond et al., 1991). Allí, los MR y los GR reconocen secuencias específicas del genoma y desarrollan distintos efectos transcripcionales.

La respuesta ante GCs responde a un patrón en forma de U invertida donde en condiciones basales se registra una respuesta fisiológica beneficiosa y tanto niveles inferiores como superiores pueden provocar efectos opuestos adversos. Esto se explica en su mayoría como consecuencia de la afinidad de los GCs por cada uno de los dos tipos de receptores, siendo 10 veces más alta por los MR que por los GR. Por ello, en condiciones basales existe una mayor ocupación de los MR y, a medida que se incrementa la concentración de GCs, se activarán los GR. En el lado opuesto, niveles deficientes de los mismos resultan en una actividad insuficiente de los MR. Este patrón de respuesta U invertida podría explicar la diferencias interindividuales de vulnerabilidad frente a los estímulos estresantes (Sapolsky, 2015). La comprensión de este fenómeno resulta fundamental para entender las implicaciones de los GCs en el sistema inmune ya que diferentes tejidos y poblaciones celulares responden de manera distinta a ellos al expresar heterogéneamente los MR y GR (Spencer et al., 1991, Butts et al., 2011) (Figura 10).

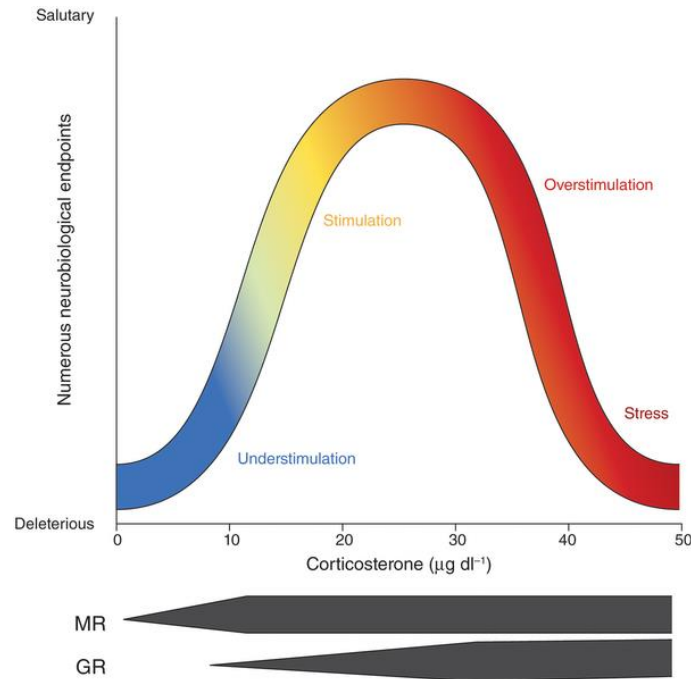


Figura 10. Activación de los receptores de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR) y consecuencias fisiológicas (Sapolsky, 2015).

Independientemente de este mecanismo de acción genómico lento, los GCs pueden interactuar en la membrana con otros receptores o canales y provocar efectos rápidos importantes en el control de la actividad motora, la memoria y el *feedback* del eje HHA (Dallman, 2005, Tasker y Herman, 2011, Moisan et al., 2014).

Como ya hemos indicado, los GCs son considerados históricamente como las moléculas antiinflamatorias por excelencia en la periferia (Hench et al., 1950) incluso en situaciones fisiológicas en el SNC (Li et al., 2007). Las acciones antiinflamatorias pueden estar mediadas por la activación transcripcional del inhibidor del factor nuclear *kappa* B ($\text{I}\kappa\text{B}$) o por interacciones proteína-proteína por parte de los GR con el factor nuclear *kappa* B (NF- κB) o la proteína activadora 1 (AP-1), protagonistas en la cascada inflamatoria (De Bosscher et al., 2003).

Dadas las múltiples capacidades de interacción de estas moléculas, el contexto en el que se desenvuelven resulta crucial para los efectos que terminen ocasionando. La duración de la exposición al estrés, los niveles de GCs dentro de esa respuesta en U invertida, el momento de acción de los GCs dentro de la respuesta inmune, el tipo de GCs que estamos utilizando (los sintéticos poseen distinta afinidad, capacidad de unión a CBG y dificultades en el transporte en la barrera hematoencefálica (BHE)) y otros factores relacionados como la vulnerabilidad interindividual al estrés han de tomarse en consideración a la hora de analizar la modulación del sistema inmune por parte de los GCs, que pueden agravar la neuroinflamación (Sorrells et al., 2009).

A nivel periférico, teniendo en cuenta que la propia supresión del sistema inmune supone a su vez un desafío estresante, se ha planteado que las concentraciones basales de GCs puedan actuar como activadores inmunológicos para prevenir frente a dicha supresión y parece que lo hacen a través de la liberación de catecolaminas (Johnson et al., 2005). Aunque el estrés agudo induce concentraciones de GCs suficientes para provocar una disminución en el número de leucocitos en sangre, se ha hipotetizado que podrían estar únicamente movilizándose a los tejidos para estar listos para actuar y sería al aumentar las concentraciones cuando observamos el efecto inmunosupresivo (Dhabhar y McEwen, 1997). Además, los GCs pueden tener un efecto cebador que exacerba una reacción inmune posterior (Johnson et al., 2002). Sin descartar estas hipótesis, actualmente aún se desconocen cuáles podrían ser las bases de esta dualidad.

En el SNC sano, el estrés tanto agudo como crónico provoca la activación de cascadas proinflamatorias, sobre todo en zonas con una distribución elevada de receptores de corticoides como la corteza prefrontal y el hipocampo (Tagliari et al., 2011, Gárate et al., 2013). Particularmente, en el hipocampo presentan efectos en rutas señaladoras relativas a la neurogénesis y plasticidad (Anacker et al., 2013). Estas inducciones de mediadores inflamatorios con el estrés parecen ser más complicadas de observar en otras estructuras cerebrales como el hipotálamo (Munhoz et al., 2006), aunque sí se produce el efecto cebador previamente descrito, lo que nos lleva a pensar en diferentes rutas intracelulares susceptibles de modulación por GCs con consecuencias variables para el tejido. Algunas de ellas son el objeto central de investigación en esta tesis doctoral y se analizan en profundidad en el apartado 3 “Las rutas neuroinflamatorias en la depresión”.

2.3.2 *Las catecolaminas como moduladoras de la respuesta inmune*

La activación simpática inducida por el estrés provoca la liberación de catecolaminas que poseen efectos sobre el sistema inmune contribuyendo a la comunicación bidireccional con el SNC. Las células inmunes son capaces de sintetizar catecolaminas y expresan receptores adrenérgicos por lo que son a su vez susceptibles a la acción de estas moléculas, principalmente como mecanismo de regulación paracrina o autocrina (Josefsson et al., 1996, Qiu et al., 2004). Las propias catecolaminas podrían ser capaces de autorregular su producción y actividad ejerciendo control sobre la tirosina hidroxilasa y la distribución de sus receptores (Stanojevic et al., 2013). Ya que las catecolaminas ejercerán sus funciones sobre las células inmunes a través de estos receptores, es importante señalar que las células de línea mieloide expresan tanto receptores α como β adrenérgicos mientras que la línea linfoide principalmente dispone de los β . No obstante, sus diferentes niveles de expresión varían entre las distintas subpoblaciones y son

regulados por múltiples factores. El momento de expresión de cada receptor puede tener importantes implicaciones en la neuroregulación de las células inmunes (Padro y Sanders, 2014).

La estimulación de los receptores β adrenérgicos parece tener funciones inmunosupresoras y de polarización hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio (Brown et al., 2003, Huang et al., 2013). En la otra orilla, la acción α adrenérgica ha mostrado efectos proinflamatorios (Spengler et al., 1994, Grisanti et al., 2011).

La mayoría de estas investigaciones se han realizado en el ámbito periférico que permiten además estudios *in vitro*, pero el panorama en el SNC se plantea difícil de descifrar. A la complejidad de factores de los que depende la inmunomodulación, tenemos que añadir las restricciones técnicas que supone la investigación en el SNC, el desconocimiento en la caracterización total de la propia población microglial y las múltiples interacciones que pueden darse con las sinapsis noradrenérgicas y otras que modifiquen la actividad de éstas. A pesar de ello, la mayoría de los estudios refrendan la capacidad de las catecolaminas para modificar la respuesta inmune en dirección proinflamatoria a nivel central (Johnson et al., 2005, García-Bueno et al., 2008b, Sorrells et al., 2009) aunque existen evidencias acerca de un posible papel antiinflamatorio de la noradrenalina en relación con la actividad microglial en enfermedades neurodegenerativas que podría estar mediado por receptores β_2 de manera similar a lo que ocurre en la periferia (Madrigal et al., 2010, Gyoneva y Traynelis, 2013). Estas evidencias casarían, debido a su acción más rápida que la de los GCs, con la hipótesis de que las primeras respuestas al estrés pudieran ser proinflamatorias, lo que dibuja un panorama intrigante y apasionante por descifrar de cara al futuro.

2.3.3 *La excitotoxicidad inducida por el estrés*

El estrés puede desencadenar fenómenos de excitotoxicidad al provocar la liberación de aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato en el SNC (Moghaddam, 1993). Los GCs pueden afectar a la neurotransmisión glutamatérgica en condiciones basales gobernadas por los ritmos circadianos pero es bajo situaciones estresantes cuando ejercen una importante influencia al multiplicarse su concentración (Popoli et al., 2011). De esta forma, potencian la liberación de glutamato en diferentes áreas límbicas y corticales a través de efectos genómicos (directos e indirectos) y no genómicos, siendo capaces también de modular la transmisión endocannabinoide para frenar la señalización. El exceso de glutamato en la hendidura sináptica provoca la entrada de calcio en las neuronas (Manev et al., 1989), acción reforzada por la capacidad de los glucocorticoides para interferir en la actividad de los transportadores de calcio

(Kerr et al., 1992) y que puede desembocar en muerte neuronal. Los procesos moleculares implicados se encuentran resumidos en la Figura 11.

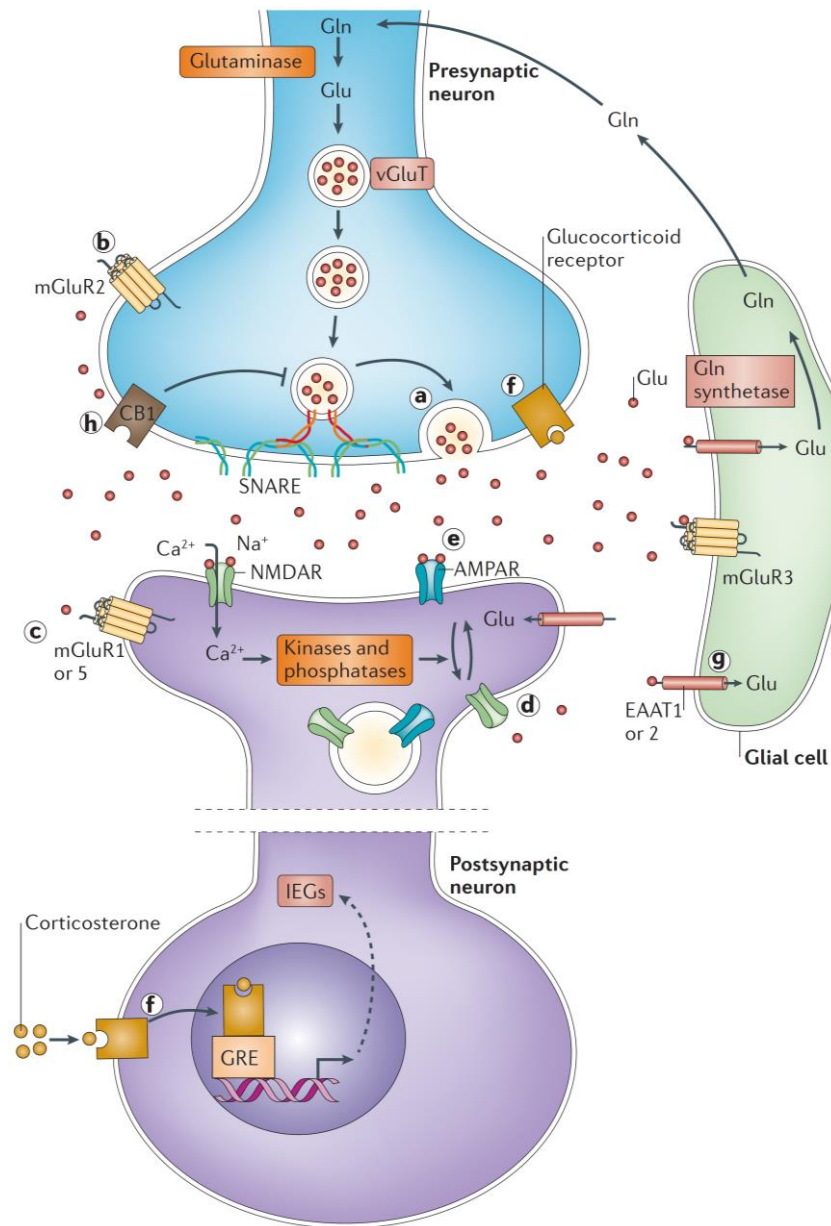


Figura 11. El impacto del estrés crónico y los glucocorticoides sobre la transmisión glutamatergica y la excitotoxicidad asociada (Popoli et al., 2011). Gln: glutamina; Glu: glutamato; vGluT: vesícula transportadora de glutamato; mGluR: receptor metabotrópico de glutamato; CB1: receptor cannabinoide 1; SNARE: receptor de proteína de fijación soluble de NSF; NMDAR: receptor de NMDA; AMPAR: receptor de AMPA; EAAT: transportador de aminoácidos excitadores; GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides; IEG: elemento de respuesta temprana a glucocorticoides.

Tras un estrés agudo, se registra un incremento en la expresión de los receptores de proteína de fijación soluble de NSF (SNARE) de las vesículas de la neurona presináptica que, además, es restaurado con la administración de antidepresivos. Dicha situación sugiere la correspondencia, aunque se desconoce aún la cascada de señalización a partir de los GRs, con un aumento en el

número de vesículas de glutamato disponibles, ya que la expresión de las proteínas SNARE se mantiene aproximadamente constante por cada una de ellas (Musazzi et al., 2010).

La potenciación de la transmisión glutamatérgica puede producirla el estrés agudo también mediante la sobreexpresión postsináptica de sus receptores del NMDA y AMPA (Yuen et al., 2011). En este proceso parecen intervenir las quinasas inducibles por el suero y glucocorticoides (SGKs), genes de respuesta temprana responsables del reciclaje de los receptores del glutamato desde los endosomas tempranos hacia la membrana plasmática a través de la proteína RAB4 (Yuen et al., 2011). El papel modulador agudo de los glucocorticoides sobre la neurotransmisión glutamatérgica puede resultar beneficioso al tener relevancia en la mejora de la memoria de trabajo. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos que subyacen al estrés crónico a este respecto es menos conocido, aunque destaca su vinculación con estructuras como el córtex prefrontal y el hipocampo, así como con los fenómenos de plasticidad asociados (Cerqueira et al., 2007)

Más allá de su acción sobre las neuronas pre y postsinápticas, los efectos del estrés sobre las células gliales repercuten en la recaptación del glutamato libre en la sinapsis. Además, teniendo en cuenta que cada astrocito da soporte a miles de sinapsis, el fallo de uno sólo de ellos tendría consecuencias importantes en la transmisión glutamatérgica global (Zheng et al., 2008), encajando como diana ante los posibles efectos del estrés crónico. Se han registrado niveles más bajos en el córtex prefrontal de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), marcador de astrocitos, en casos de depresión y tras la administración aguda o crónica de glucocorticoides (Nichols et al., 1990, Fatemi et al., 2004). Por otro lado, existen estudios que describen un aumento de los mismos en otras estructuras como el hipocampo (Bridges et al., 2008), sugiriendo efectos diferenciales según el área cerebral y la concentración alcanzada de glucocorticoides.

El estrés también es capaz de inhibir la recaptación de glutamato en sinaptosomas (Leza et al., 1998) y de disminuir la expresión de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs) encargados del proceso (Madrigal et al., 2003, Zink et al., 2010). En dichos mecanismos pueden estar involucrados tanto los glucocorticoides (Zschocke et al., 2005) como moléculas relacionadas con la inflamación como el TNF- α (Tolosa et al., 2011). No sólo los transportadores, sino también una disminución glial en la expresión de la glutamina sintetasa, que transforma el glutamato en glutamina, se ha descrito en relación al estrés crónico (Banar et al., 2010).

3. Las rutas neuroinflamatorias en depresión

Recurriendo a la morfología del lenguaje, neuroinflamación presenta dos lexemas, “neuron” e “inflam”, representando los conceptos neurona e inflamación. Así, se denomina neuroinflamación al conjunto de las respuestas inflamatorias en el SNC que están mediadas por la producción de citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno y segundos mensajeros. El principal tipo celular implicado es el tejido glial, microglía y astrogía, en un claro paralelismo con la situación inmune a nivel periférico orquestada por los macrófagos y linfocitos, aunque otras células como las neuronas o endoteliales participan a su vez en el desarrollo de la situación inflamatoria. No sólo la población celular residente en el SNC está involucrada en la neuroinflamación, sino que las células inmunes periféricas pueden infiltrarse en el SNC ya sea de manera activa a través de la barrera hematoencefálica (BHE) o por la disrupción de la misma ante situaciones estresantes, por lo que debemos entender la inflamación como un fenómeno sistémico con una comunicación activa entre la periferia y el SNC (Chavarria y Alcocer-Varela, 2004).

La microglía es la pieza indispensable cuando hablamos de neuroinflamación y representa desde el 5 al 12 % de las células totales según la zona del SNC que se analice (Lawson et al., 1990). Las células microgliales encarnan el sistema de defensa del SNC y se las equipara por su función a los macrófagos periféricos, de quienes derivan ontogénicamente (Ginhoux et al., 2010). De hecho, su renovación transcurre a partir de células progenitoras en el propio SNC y lo hace de manera lenta, reforzando este hecho su susceptibilidad ante factores como la edad o el estrés (Elmore et al., 2014). Ante una potencial amenaza, la microglía es capaz de pasar a su estado activado y secretar citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que garanticen la supervivencia de su microentorno incluso detectando situaciones de daño en la BHE que comprometen la integridad del sistema (Nimmerjahn et al., 2005). Además, son capaces de propagar la señalización inflamatoria desde la periferia y de reclutar linfocitos al cerebro (Zhou et al., 2006, Dantzer et al., 2008).

Indispensable para la respuesta inmune central resulta a su vez la astrogía, tipo celular íntimamente ligado a la reacción ante heridas o enfermedades en el tejido nervioso mediante la conocida como astrogliosis reactiva que culmina en los casos más graves con una cicatriz glial. Las modificaciones sobre el astrocito en reposo van desde hipertrofia hasta proliferación y alteración de su expresión génica y dependen de la intensidad y naturaleza del evento que lo

desencadena. Están regulados por mediadores presentes en su microentorno y, a su vez, ellos pueden ejercer funciones sobre él beneficiosas o perjudiciales según las circunstancias (Sofroniew, 2009). El proceso de astrogliosis reactiva se encuentra conectado con la inflamación en ambas direcciones: las citoquinas y otros mediadores inmunes o el estrés oxidativo asociado a sus actividades pueden estimularlo (Woiciechowsky et al., 2004, Zagami et al., 2009, Liu et al., 2015a) y, a su vez, los astrocitos son capaces de producir mediadores tanto proinflamatorios como antiinflamatorios (Panenka et al., 2001, Shih et al., 2003, Qin et al., 2008, Brambilla et al., 2009). Otro de los aspectos por los que la astrogliosis es indispensable para las labores de defensa del SNC es su contribución al establecimiento y mantenimiento de la BHE y el control de la migración de monocitos y linfocitos a su través (McAllister et al., 2001, Lee et al., 2003b, Daneman et al., 2010, Vogel et al., 2015).

Siendo la inflamación un mecanismo de defensa del organismo y, por tanto, beneficioso *per se*, cuesta pensar que pueda acarrear consecuencias deletéreas. Podemos señalar tres parámetros asociados al estímulo que la induce de cuya magnitud van a depender sus efectos: naturaleza, tiempo y localización (DiSabato et al., 2016) (Figura 12). La intensidad y tipo del estímulo determina las rutas, células, tejidos y áreas cerebrales que responden y la rapidez de su propagación (Song et al., 2006). La inflamación es un proceso resolutivo que pretende erradicar la amenaza existente por lo que si esta persiste y se cronifica, la acumulación de mediadores y consecuente desregulación de la función inmune lo vuelven un problema sistémico con consecuencias nefastas para el organismo que está detrás de diversas patologías fruto de una mala adaptación (Weiss, 2008).

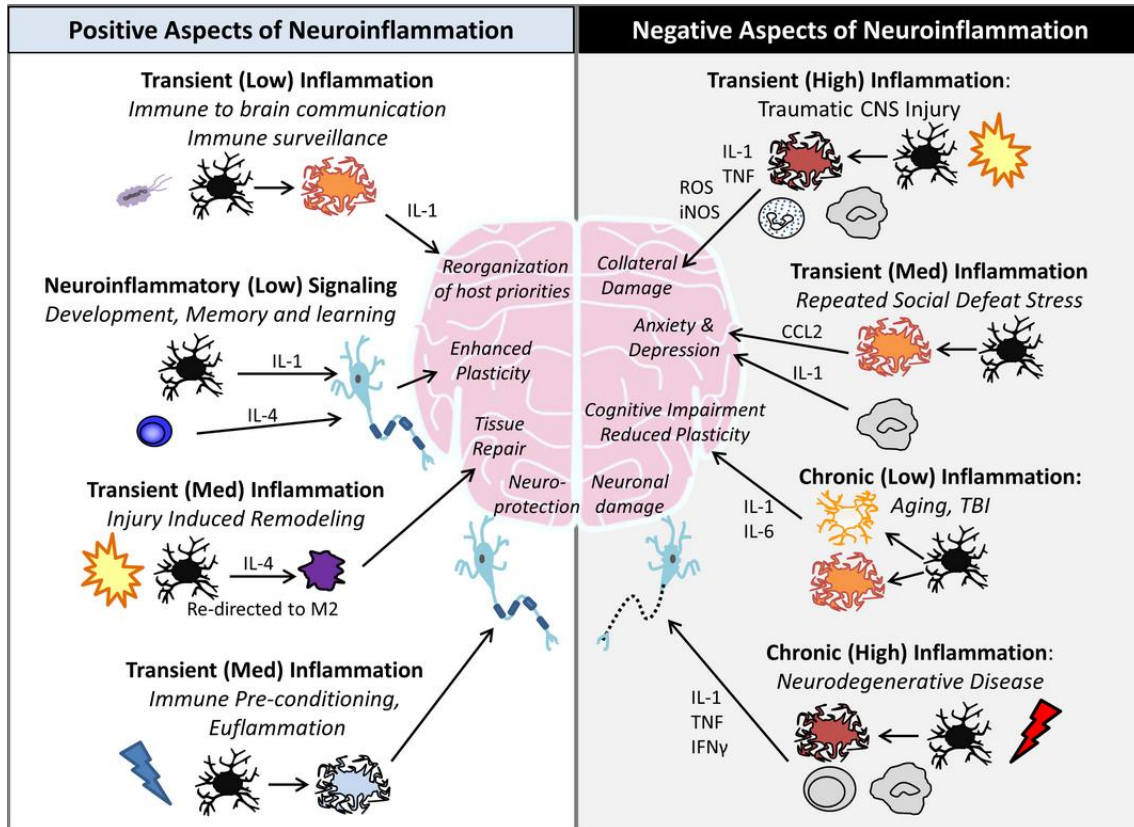


Figura 12. Factores positivos y negativos de la neuroinflamación y sus consecuencias (DiSabato et al., 2016). IL: interleuquina; M: macrófago; TNF: factor de necrosis tumoral; CNS: sistema nervioso central; ROS: especies reactivas de oxígeno; iNOS: isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa; CCL: quimioquina (C-C motivo) ligando; TBI: traumatismo cerebral; IFN: interferón.

Las enfermedades relacionadas con el SNC presentan un escenario neuroinflamatorio, ya sean neurodegenerativas, psiquiátricas, autoinmunes o de origen vascular. Se han descrito alteraciones inmunes en la enfermedad de Alzheimer (Heneka et al., 2013), Parkinson (Lastres-Becker et al., 2012), esclerosis múltiple (Draheim et al., 2016), depresión (Goshen et al., 2008), esquizofrenia (García-Bueno et al., 2016), trastorno bipolar (Kim et al., 2011), autismo (Vargas et al., 2005) e incluso en procesos naturales como el envejecimiento, donde los desequilibrios de estos mediadores pueden estar relacionados con las deficiencias cognitivas que se registran (Cribbs et al., 2012). Las evidencias son más que suficientes para constatar la relación entre el funcionamiento deficiente del SNC y un fallo en su comunicación con el sistema inmune, pero en este contexto surge la eterna cuestión aún sin resolver: ¿es la neuroinflamación causa o consecuencia de las patologías nerviosas? Esta dicotomía genera múltiples teorías donde se está concentrando el esfuerzo investigador ya que de la clarificación de la interacción con las patologías es de donde pueden derivarse implicaciones en su propia comprensión fisiopatológica y, mucho más importante y ligada a ésta, en la clínica de los pacientes, fin último y significativo de la investigación biomédica.

Específicamente en depresión, el escenario neuroinflamatorio podemos representarlo, a partir de las investigaciones en pacientes y modelos animales, en un esquema que englobe las interacciones entre la función inmune, el eje HHA, los neurotransmisores y el sistema nervioso autónomo (Figura 13). El desequilibrio entre el incremento de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 o IFN- γ (Kagaya et al., 2001, O' Connor et al., 2009, Dowlati et al., 2010), y la disminución en las antiinflamatorias, como IL-4, IL-10 o el factor de crecimiento transformante *beta* (TGF- β) (Sutcgil et al., 2007, Dhabhar et al., 2009), participa en depresión tanto a nivel periférico como central e induce la liberación de GCs por parte del eje HHA. A nivel periférico, los GCs ejercen su capacidad antiinflamatoria, entre otros mecanismos, mediante la modulación de la respuesta inmune celular T *helper* 1 (Th1) hacia la humoral Th2 que continúa activando el eje HHA.

Los neurotransmisores liberados por la respuesta simpática a nivel periférico también son capaces de modular el eje positivamente en el caso de noradrenalina, dopamina y acetilcolina, y negativamente en el de la serotonina. La hiperactividad sostenida de la respuesta al estrés puede provocar la desensibilización de los receptores GR hipotalámicos y la consecuente desregulación del *feedback* negativo y perpetuación de la situación inflamatoria. La habilidad de las citoquinas y células para atravesar la BHE, especialmente ante situaciones estresantes, y la conexión parasimpática a través del nervio vago permiten la comunicación periferia-cerebro y los efectos neuroinflamatorios cerebrales. La neuroinflamación crónica ejerce efectos deletéreos sobre las funciones del SNC al contribuir a la generación de fenómenos de estrés oxidativo/nitrosativo y excitotoxicidad, interferir con la plasticidad y procesos de neurogénesis o modificar la liberación o actividad de neurotransmisores. Del inmenso campo que abarcan los procesos neuroinflamatorios, esta Tesis Doctoral se ha centrado en intentar clarificar el rol de algunos de los factores de la inflamación y del daño oxidativo/nitrosativo menos estudiados y más novedosos: las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), el factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en la depresión. Por ello, sus vías serán explicadas con mayor profundidad en los siguientes capítulos de esta Tesis.

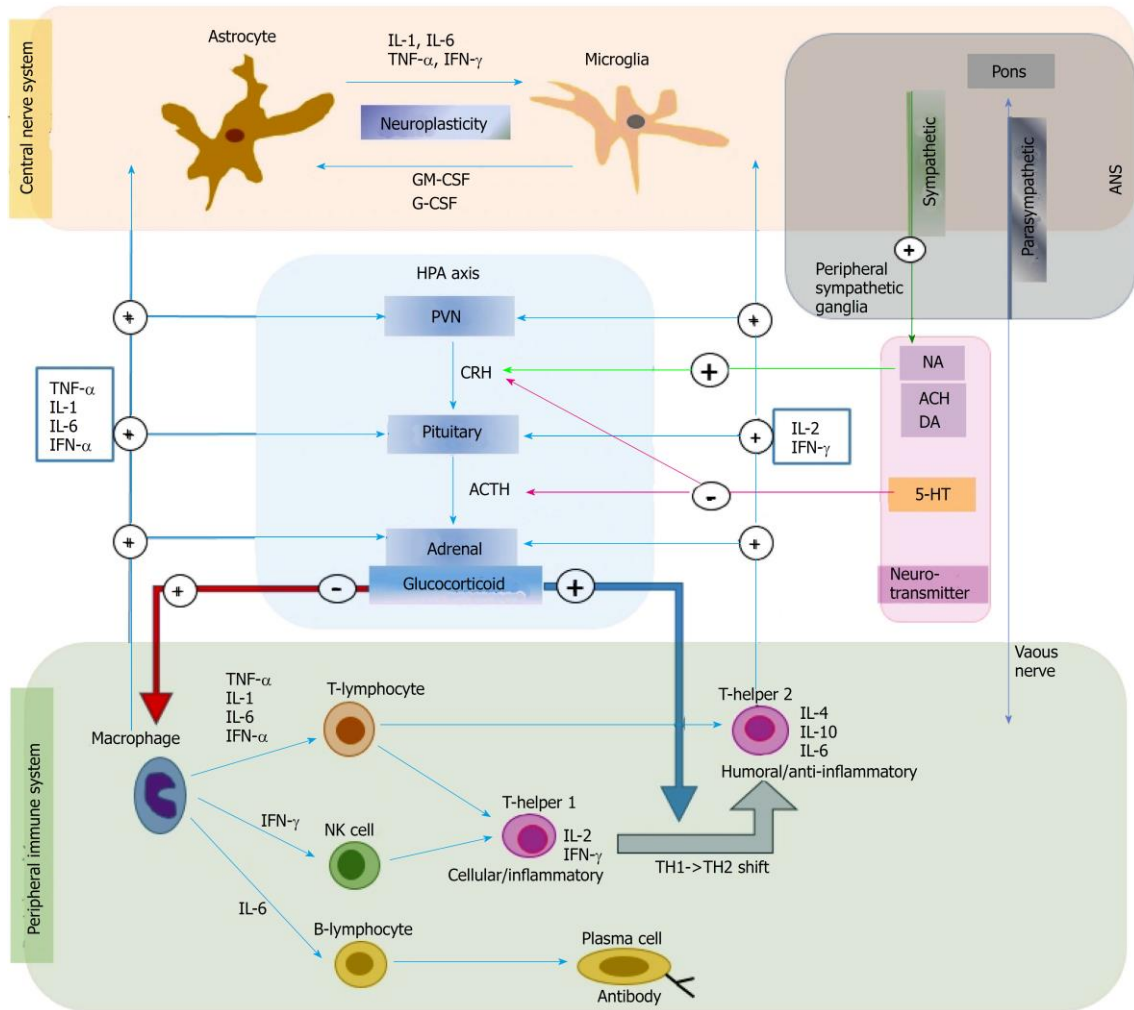


Figura 13. Escenario inflamatorio en la depresión (Jeon y Kim, 2016). IL: interleuquina; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN: interferón; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; HPA: hipotálamo-hipófisis-adrenal; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; CRH: factor liberador de corticotropina, ACTH: hormona adrenocorticotropa; NK: asesina natural; TH: T-helper; 5-HT: serotonina; DA: dopamina; ACH: acetilcolina; NA: noradrenalina; ANS: sistema nervioso autónomo.

3.1. Los receptores de inmunidad innata: el receptor Toll-like 4 (TLR-4) y las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo frente a situaciones potenciales de daño como heridas o invasiones patógenas. Desempeña esta función junto a barreras físicas epiteliales en la piel, el intestino o los pulmones que aíslan el medio interno del externo y además secretan enzimas y péptidos antimicrobianos como la lisozima, defensinas, mucinas y lectinas. Dentro de este sistema inmune innato destacan los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) destinados a identificar elementos sospechosos para el organismo de manera bastante inespecífica basándose en características comunes a un conjunto de elementos. Evolutivamente hablando aparecieron mucho antes que la compleja y

sofisticada inmunidad adaptativa y están destinados al reconocimiento rápido del peligro y el desencadenamiento de una potente respuesta de amplio espectro para terminar con él y reestablecer la homeostasis. Su transducción de la señal implica inflamación e inmunomodulación a través de dichos receptores, macrófagos, sistema del complemento, citoquinas y quimioquinas (Shastri et al., 2013). Los patrones moleculares susceptibles de la activación de los PRRs están o bien asociados a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs), aunque también puede desencadenarse su señalización por determinadas estructuras moleculares o ser modulada por citoquinas como el IFN (Durand et al., 2004, Martinon et al., 2006).

Existen tres grandes familias de PRRs: los receptores tipo *Toll/Toll-like* (TLRs), los de tipo *NOD/NOD-like* (NLRs) y los depuradores/*scavenger* (SRs). Los TLRs pueden tener localización extracelular o intracelular asociados a membranas, los NLRs son intracelulares, los SRs son receptores transmembrana especializados en la eliminación de residuos mediante procesos de endocitosis (Peiser et al., 2002). Aunque el ámbito de la neuroinflamación en patologías psiquiátricas comienza a interesarse por la influencia de los NLRs (Pan et al., 2014), tradicionalmente se ha centrado en los TLR (Lehnardt, 2010) y, concretamente, en la señalización del TLR-4 en los procesos inflamatorios relacionados con el estrés (Caso et al., 2008, Pérez-Nievas et al., 2010, Gárate et al., 2013, Gárate et al., 2014, MacDowell et al., 2014, Tse et al., 2014, Masson et al., 2015, García-Bueno et al., 2016) y, específicamente, en los trastornos de tipo depresivo (Gárate et al., 2011a, Gárate et al., 2014, Sayd et al., 2014, Strelakova et al., 2015, Cheng et al., 2016).

Desde el descubrimiento de la homología de secuencia entre los dominios citoplasmáticos de los receptores *Toll* de *Drosophila* y de la IL-1 humana (Gay y Keith, 1991), se han identificado en humanos proteínas estructuralmente relacionadas entre sí a los que se denominó como receptores *Toll-like* o TLRs (Rock et al., 1998).

Los TLRs son glicoproteínas transmembrana de tipo I estructuralmente definidas en conjunto por la presencia de un dominio extracelular de reconocimiento y por un dominio de señalización intracelular *Toll/IL-1* (TIR) (Figura 14a). El dominio extracelular amino-terminal contiene un número variable de entre 16 y 28 motivos repetitivos de leucina (LRRs) (Matsushima et al., 2007) y es el responsable del reconocimiento específico de los respectivos PAMPs y DAMPs definiendo los primeros la clasificación de los TLRs en 11 subtipos en humanos. Se trata de una estructura con regiones muy variables que contribuyen a la detección de los ligandos a pesar de posibles

diferencias polimórficas existentes entre las distintas especies (Hajjar et al., 2002). Para la transducción de la señal es necesaria una homo o heterodimerización de los receptores (Takada et al., 2007).

El dominio intracelular consta de unos 200 aminoácidos con tres regiones de alta homología incluso presentes en plantas confiriéndoles resistencia frente a enfermedades (O'Neill y Dinarello, 2000). Es el encargado de la activación de una respuesta inflamatoria estereotipada conservada en todos los subtipos (aunque con diferencias individuales), a pesar de producirse tras el reconocimiento de una amplia gama de ligandos (Barton y Medzhitov, 2003). Dicha respuesta se desarrolla con la participación de una serie de moléculas adaptadoras (factor de diferenciación mieloides 88 (MyD88), quinasas asociadas al receptor de interleuquina 1 (IRAKs), factor asociado al receptor de TNF (TRAF6), quinasa activada por el TGF- β 1 (TAK1) y proteínas asociadas a TAK1 (TABs) que culminan con la activación del NF- κ B al liberarlo de su inhibidor I κ B y permitir su traslocación al núcleo donde induce la expresión de sus genes diana (Figura 14b). Recientes hallazgos plantean que el TLR-3

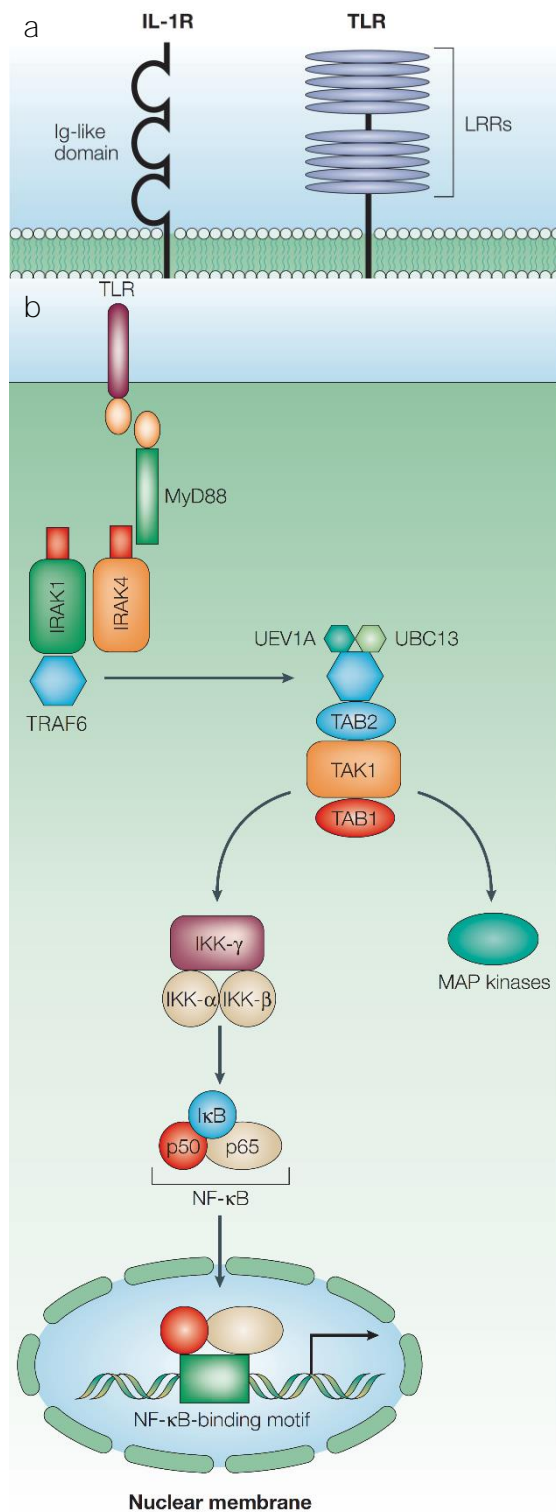


Figura 14. Señalización en los receptores Toll-like (TLRs) (Akira y Takeda, 2004). IL-1R: receptor de interleuquina-1; Ig: inmunoglobulina; LRR: motivo repetitivo de leucina; MyD88: factor de diferenciación mieloides-88; IRAK: quinasa asociada al receptor de interleuquina; TRAF: factor asociado al receptor de TNF; UEV1A: variante 1A de la enzima conjugadora de ubiquitina; UBC13: proteína conjugadora de ubiquitina; TAK1: quinasa asociada a TGF- β ; TAB: proteína asociada a TAK1; MAP: proteína activada por mitógenos; IKK: Quinasa de I κ B; I κ B: inhibidor de NF- κ B; p:proteína; NF- κ B: factor de transcripción kappa B.

podría ser el único de los TLRs que no utilizase esta ruta MyD88 dependiente y que incluso restringiría su señalización (Siednienko et al., 2011).

Cada uno de los tipos de TLRs se encuentra especializado en el reconocimiento de PAMPs específicos. De los 11 identificados en humanos, el primero fue el TLR-4, receptor por antonomasia para el LPS bacteriano (Poltorak et al., 1998). El TLR-2 reconoce una amplia gama de compuestos gracias a la cooperación funcional que establece con otros receptores. De la interacción con los receptores TLR-1 y TLR-6 surge el reconocimiento diferencial de los lipopéptidos triacilados y diacilados, respectivamente (Takeuchi et al., 2001, Takeuchi et al., 2002) y la participación combinada de TLR-2 y TLR-1 es necesaria también para el reconocimiento de la lipoproteína externa de *Borrelia burgdorferi* (Alexopoulou et al., 2002). Además, TLR-2 puede activarse por componentes derivados de hongos mediante la asociación a receptores como la dectina-1 (Gantner et al., 2003) e incluso por el LPS de algunas bacterias independientemente de TLR-4 (Werts et al., 2001, Smith et al., 2003). La flagelina es el ligando del TLR-5 (Hayashi et al., 2001) y de las bacterias uropatógenicas se encarga el TLR-11 (Zhang et al., 2004) con la profilina como protagonista (Yarovinsky et al., 2005).

La localización subcelular de los distintos TLRs se correlaciona hasta cierto punto con el patrón molecular de sus ligandos, ya que los que reconocen componentes externos a los patógenos se localizan en la membrana plasmática y son reclutados a fagosomas tras su activación. Por otro lado, aquellos cuya activación depende de las diferentes moléculas de ácidos nucleicos se expresan en los endosomas donde pueden encontrarse tras el lisado bacteriano. Es el caso del TLR-3 para el RNA de doble cadena (Alexopoulou et al., 2001), TLR-7 y TLR-8 para el RNA monocatenario (Heil et al., 2004), TLR-9 (con quien coopera TLR-12 en ratón) para las islas CpG bacterianas, distinguidas del DNA genómico debido a su mayoritaria metilación en mamíferos por silenciamiento génico (Hemmi et al., 2000) y TLR-13 (únicamente descrito en ratón) para el RNA ribosómico (Oldenburg et al., 2012). Tanto los ligandos como la localización subcelular de cada TLR se encuentra resumida en la Figura 15.

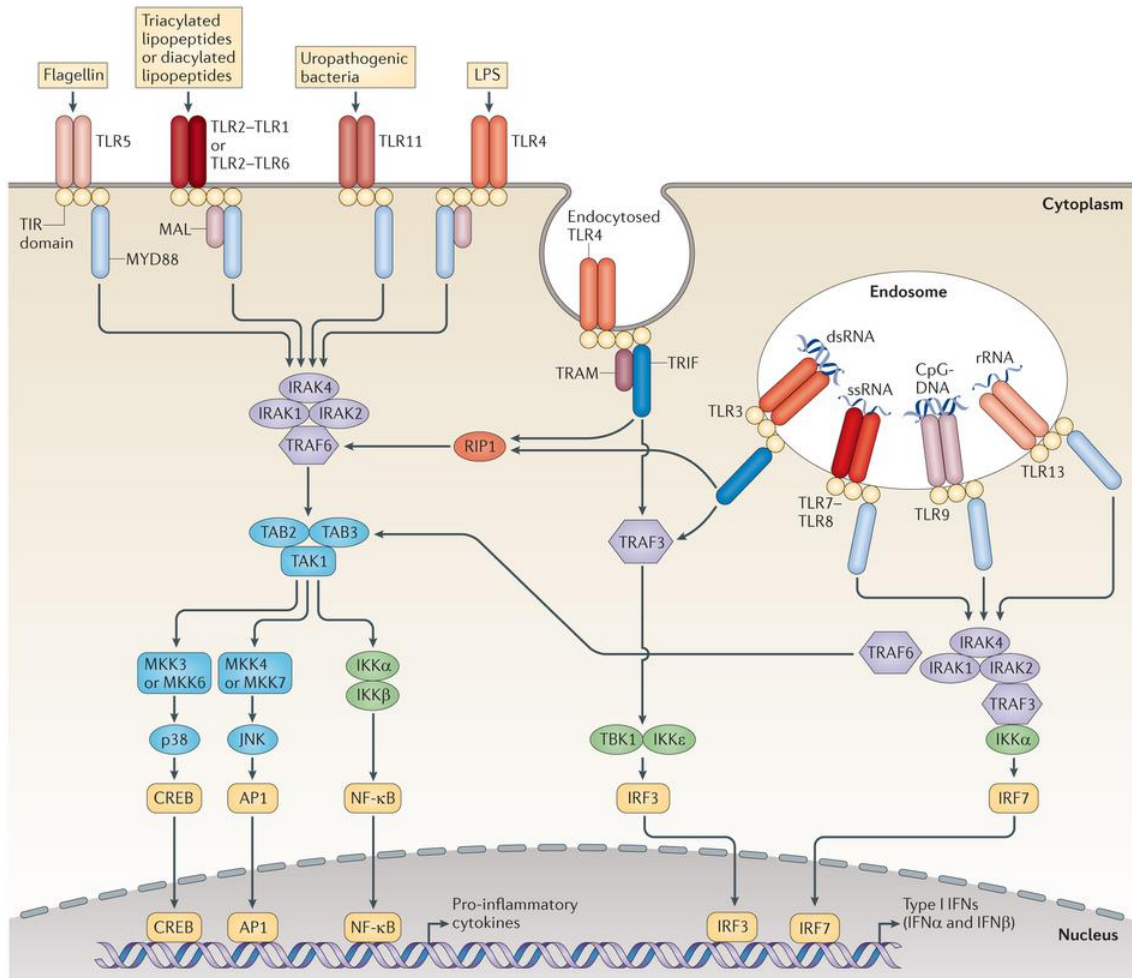


Figura 15. Rutas de señalización de los receptores Toll-like (TLRs) en mamíferos (O'Neill et al., 2013). LPS: lipopolisacárido; TIR: receptor intracelular Toll/IL-1; MyD88: factor de diferenciación mieloide 88; MAL: adaptador tipo MyD88; IRAK: quinasa asociada al receptor de interleuquina; TRAF: factor asociado al receptor de TNF; TAK: quinasa asociada a TGF-β; TAB: proteína asociada a TAK1; MKK: proteína/quinasa/quinasa activada por mitógenos; p38: proteína 38; JNK: quinasa NH₂ terminal de c-jun; CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP; AP: proteína activadora; IKK: Quinasa de IκB; NF-κB: factor de transcripción *kappa* B; RIP: proteína de interacción con el receptor; TRIF: factor inductor de IFN-β con dominio TIR ; TRAM: molécula adaptadora asociada al receptor TRIF; TBK: quinasa de unión a TANK; IRF: factor liberador de interferón; IFN: interferón; RNA: ácido ribonucleico; dsRNA: RNA de doble cadena; ssRNA: RNA monocatenario; rRNA: RNA ribosómico; CpG-DNA: isla de citosina y guanina del ácido desoxirribonucleico.

3.1.1 El receptor Toll-like 4 (TLR-4)

El TLR-4 constituye uno de los puntos centrales de la presente Tesis Doctoral. Descubierta como el primer homólogo en humanos del receptor *Toll* de *Drosophila* (Medzhitov et al., 1997), se destaca como una de las moléculas imprescindibles para entender la inmunidad innata y aglutina los esfuerzos investigadores por encima del resto de su familia de receptores en base a su ubicuidad y distribución, sus agonistas y las características y consecuencias de su cascada de señalización.

Los niveles más elevados de TLR-4 se encuentran en el bazo y las células mononucleares de sangre periférica, niveles intermedios en colon, ovarios, pulmones, intestino delgado y placenta y niveles inferiores en cerebro, corazón, riñones, hígado, próstata, páncreas, testículos, músculo o timo (Zarembek y Godowski, 2002, Nishimura y Naito, 2005). Esta casi total distribución del TLR-4 por el organismo no es más que un indicador de lo vital de las funciones que desempeña en el sistema inmune y su comunicación con los diferentes tejidos. Centrándonos en el SNC y sus tipos celulares, la microglía expresa intensamente el TLR-4 (Lehnardt et al., 2003) pero también lo hacen, aunque de manera más discreta, las neuronas (Tang et al., 2008), astrogliá (Jou et al., 2006), oligodendroglía (Kigerl et al., 2007) y el endotelio cerebrovascular (Nagyoszi et al., 2010). Las variaciones en los niveles de expresión del TLR-4 en el SNC no son exclusivas del tipo celular, sino que se extienden a las diferentes áreas cerebrales siendo su disposición más acusada donde la BHE presenta una estructura mucho más laxa como los órganos circunventriculares, el plexo coroideo y las leptomeninges (Lacroix et al., 1998). Ambas características no hacen sino reforzar la idea de la permanente comunicación bidireccional entre la periferia y el SNC descrita previamente, otorgándole un notorio papel al TLR-4 en la orquestación de la respuesta inmune.

El principal ligando del TLR-4 es el lipopolisacárido (LPS), uno de los PAMPs más representativos ya que forma parte de la pared bacteriana de las bacterias Gram negativas (Poltorak et al., 1998). Es precisamente esta inespecificidad otra de las razones por las que ha acaparado tanta atención científica al proporcionarle la capacidad de responder frente a un amplísimo grupo de microorganismos que interacciona con el ser humano tanto de manera patogénica como simbiote o, simplemente, inocua. Sin embargo, el LPS no es el único ligando del TLR-4 sino que también reconoce DAMPs como las Hsp 60 y 70 (Vabulas et al., 2001, Asea et al., 2002), el fibrinógeno (Smiley et al., 2001) y la proteína de alta movilidad de caja 1 (HMGB-1) (Park et al., 2006). Por ello, el TLR-4 se ha postulado como un receptor clave en la activación inmune ante situaciones no infecciosas, en la denominada “inflamación estéril” provocada por los DAMPs, así como en otro tipo de posibles eventualidades con el microbioma que se describirán con mayor detalle en el punto 4 de esta introducción.

La naturaleza anfipática de las moléculas de LPS le lleva a formar agregados en entornos acuosos que requieren de la intervención de la proteína de unión a LPS (LBP) y del CD14 para su reconocimiento por los TLR-4. El LBP se une ávidamente a los agregados de LPS y lo transporta hacia el CD14, presente en la membrana de las células inmunes o en plasma de manera soluble (Wright et al., 1990, Tobias et al., 1995). No será la parte glucídica del LPS sino el lípido A el

principal responsable de la actividad inmunológica de esta macromolécula (Poltorak et al., 1998) y su presentación es posible gracias a la participación de CD14. Este adaptador posee una región hidrofóbica cerca del extremo N-terminal capaz de albergar al LPS en su forma monomérica y además ser lo suficientemente flexible para superar sus variaciones entre especies y reconocer otras moléculas microbianas o celulares (Kim et al., 2005). Su papel no finaliza aquí, sino que se encarga del reclutamiento de los TLR-4 y múltiples moléculas de señalización hacia balsas lipídicas en la membrana formando microdominios que permiten la amplificación de la señal (Triantafilou et al., 2002).

El receptor TLR-4 por sí mismo no es capaz de reconocer el LPS presentado por CD14 y LBP sino que necesita reclutar a un co-receptor, el factor de diferenciación mieloide-2 (MD-2) (Shimazu et al., 1999) el cual, además, es imprescindible para la distribución del TLR-4 en la membrana plasmática (Nagai et al., 2002). La unión del LPS induce la formación de un complejo en forma de “m” entre TLR-4, MD-2 y LPS en relación 2:2:2 ahora ya sí plenamente funcional para la transducción de la señal (Park et al., 2009) (Figura 16) y que será endocitado tras su estimulación con implicaciones en la señalización de la vía MyD88 independiente y la conexión con la inmunidad adaptativa (Husebye et al., 2006, Kagan et al., 2008). Las complejas interacciones moleculares involucradas descritas son vitales para la transmisión de la señal y así se explican polimorfismos de respuesta deficiente a LPS (Ohto et al., 2012) y la capacidad de ciertas moléculas derivadas del lípido A, como eritoran y el lípido IVA, de actuar como antagonistas al presentar determinadas modificaciones estructurales (Ohto et al., 2007, Shirey et al., 2013). Incluso se han descrito en algunas especies LPS pentaacilados en lugar de hexaacilados que actúan como antagonistas en lugar de estimular la señalización como consecuencia de la incorrecta formación del complejo macromolecular de reconocimiento (Erridge et al., 2004, Triantafilou et al., 2004, Popa et al., 2007).

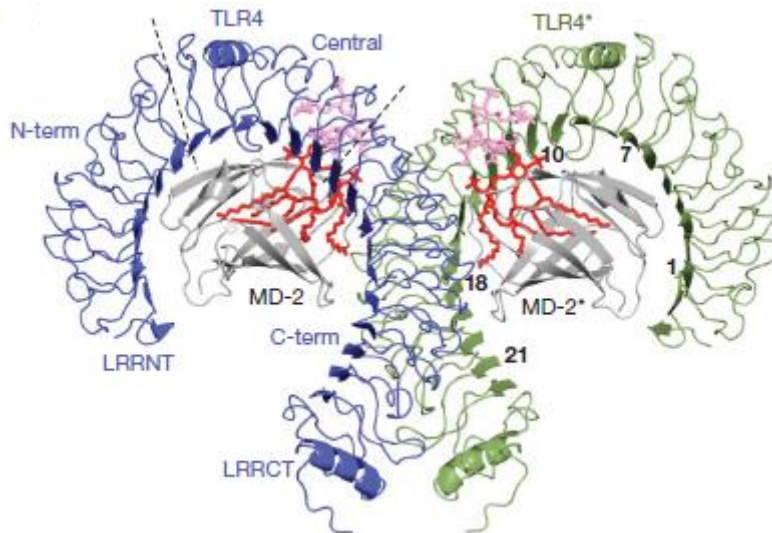


Figura 16. Ensamblaje molecular del complejo del receptor Toll-like 4/factor de diferenciación mieloide-2/lipopolisacárido (TLR-4/MD-2/LPS) (adaptado de Park et al., 2009). LRR: repeticiones ricas en leucina.

El correcto ensamblaje del complejo de reconocimiento del TLR-4 permite la transducción de la señal a partir del dominio intracelular TIR bifurcándose en dos posibles vías: una dependiente del MyD88 y otra independiente. MyD88 funciona como una molécula adaptadora capaz de interactuar con TLR-4 a través de su dominio TIR C-terminal y de reclutar por su extremo N-terminal a IRAKs mediante interacciones entre sus respectivos dominios de muerte celular (Wesche et al., 1997). Esta complementariedad de MyD88 con la señalización del receptor se ratifica por su existencia previa como dímero en el citoplasma celular (Dunne et al., 2003). Sin embargo, la señalización en TLR-4 por la vía MyD88 dependiente requiere de la presencia de la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP) (Fitzgerald et al., 2001, Yamamoto et al., 2002) que puede formar heterodímeros con MyD88 u homodímeros que interactúan con los descritos para MyD88, sugiriendo la posibilidad de complejos heterotetraméricos (Dunne et al., 2003). TIRAP/MyD88 activado recluta a IRAK4 (Suzuki et al., 2002), que fosforila a IRAK1 (Li et al., 2002) y ambas podrían estar implicadas en el mecanismo de *feedback* negativo de la vía al promover la degradación de TIRAP (Dunne et al., 2010). IRAK1 posee tres motivos formados por una secuencia consenso que permiten la unión del TRAF6, común a la familia de superreceptores de TNF y TIR/IL1, escindiéndose del receptor (Ye et al., 2002). La enzima ubiquitina conjugada E3 (UBC13) se asocia a TRAF6 y activa a TAK1 tras el ensamblaje de una cadena de poliubiquitina unida al residuo Lys63 (Deng et al., 2000).

TAK1 pertenece a la familia de las proteínas quinasa/quinasa/quinasa activadas por mitógenos (MAPKKKs) (Yamaguchi et al., 1995) y, mediante la unión de sus diferentes proteínas adaptadoras TAB1, 2 y 3, desencadenará la activación de las dos rutas claves en la respuesta inmunitaria del TLR-4: la vía del NF- κ B y la de las MAPKs. TAB1 incrementa la actividad quinasa

de TAK1 (Shibuya et al., 1996) mientras que TAB2/3 funcionan como adaptadores entre ambas moléculas (Takaesu et al., 2000, Ishitani et al., 2003). TAK1 actúa sobre el complejo multiproteico quinasa de I κ B (IKK), formado por dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y otra reguladora (IKK γ /NEMO), responsable de la degradación del inhibidor de NF- κ B (I κ B) al fosforilarlo en sus residuos Ser32 y Ser36 marcándolo para su degradación por el proteasoma (Wang et al., 2001). Los homo o heterodímeros de la familia NF- κ B se encuentran habitualmente secuestrados en el citosol por I κ B (Novak et al., 1991), encargado además de su reexportación desde el núcleo (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Dicha translocación al núcleo de NF- κ B (sobre todo sus subunidades p65 y p50) tras su liberación de I κ B provocan el reconocimiento de secuencias específicas en el genoma y la transcripción de una amplia gama de genes inflamatorios como IL-6, TNF- α o la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Collart et al., 1990, Libermann y Baltimore, 1990, Ueda et al., 1994). La activación de la vía de las MAPKs y sus implicaciones se tratará en profundidad en el punto 3.1.2 por constituir uno de los aspectos centrales de la presente Tesis Doctoral.

La vía MyD88 independiente es clásicamente la responsable de la activación de la señalización de genes relacionados con el IFN, aunque también participa junto a la MyD88 dependiente que acabamos de describir en la producción de citoquinas proinflamatorias (Hoebe et al., 2003). La identificación de otro factor inductor de IFN- β con dominio TIR (TRIF) lo posicionó como uno de los principales orquestadores de la respuesta MyD88-independiente (Yamamoto et al., 2003). Además, en un claro paralelismo con el TIRAP de la vía dependiente, se describió otro adaptador con dominio TIR, TRAM, que permite la interacción de TRIF con TLR-4 (Fitzgerald et al., 2003b). La señalización prosigue con dos proteínas relacionadas con IKK, IKK ϵ y la quinasa asociada a TANK-1 (TBK-1), que fosforilan a los factores reguladores de los interferones (IRF) 3 y 7 que dimerizan y translocan al núcleo para estimular la secreción de IFN de tipo I (Fitzgerald et al., 2003a). TRIF también reconoce a la proteína de interacción con el receptor (RIP) que activa la vía de supervivencia celular fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) en un mecanismo NF- κ B dependiente (Vivarelli et al., 2004), además de participar con otras moléculas en procesos directamente relacionados con la degradación de I κ B (Tojima et al., 2000, Youn et al., 2005).

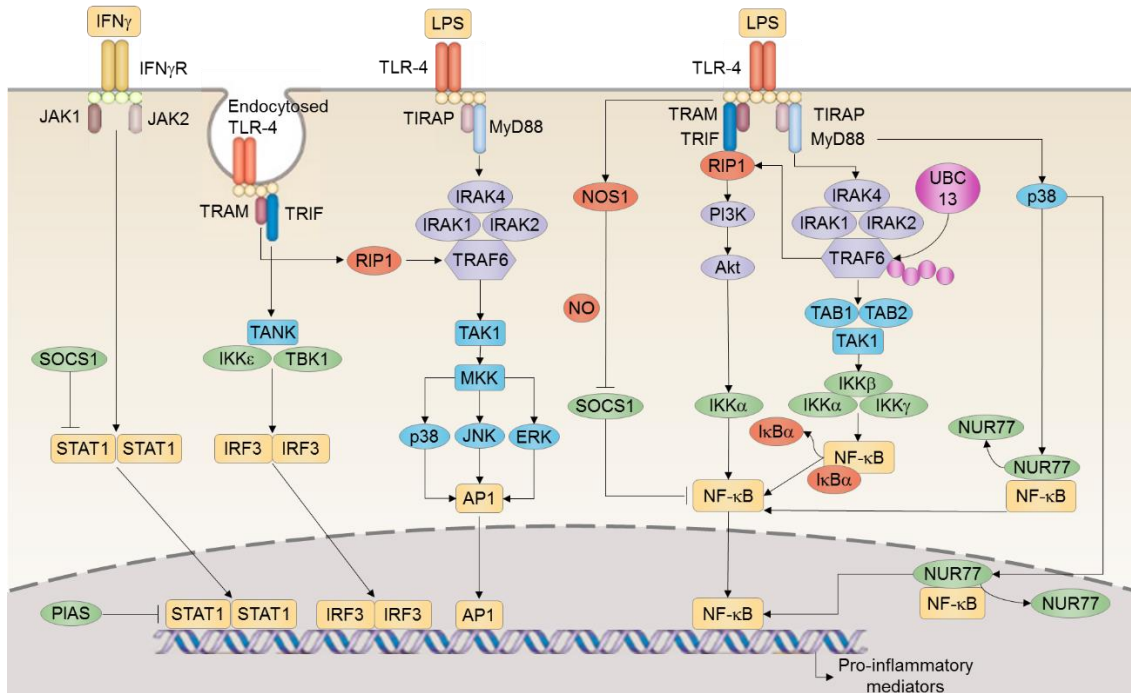


Figura 17. Señalización del receptor Toll-like (TLR-4) en inflamación. IFN γ : interferón *gamma*; IFN γ R: receptor de interferón *gamma*; JAK: quinasa Janus; SOCS: ; STAT: transductor y activador de la señal; PIAS: ; TRIF: factor inductor de IFN- β con dominio TIR ; TRAM: molécula adaptadora asociada al receptor TRIF; RIP: proteína de interacción con el receptor; TANK: activador de NF- κ B asociado a miembros de la familia TRAF; IKK: quinasa de κ B; TBK: quinasa de unión a TANK; IRF: factor liberador de interferón; LPS: lipopolisacárido ; TIRAP: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR; MyD88: factor de diferenciación mieloides 88; IRAK: quinasa asociada al receptor de interleuquina; TRAF: factor asociado al receptor de TNF; TAK: quinasa asociada a TGF- β ; MKK: proteína/quinasa/quinasa activada por mitógenos; p38: proteína 38; JNK: quinasa NH $_2$ terminal de c-jun; ERK: quinasa de regulación de la señal extracelular; AP: proteína activadora; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; Akt: proteína quinasa B; NF- κ B: factor de transcripción *kappa* B; TAB: proteína asociada a TAK1; I κ B: inhibidor de NF- κ B; UBC13: enzima conjugadora de ubiquitina 13; NUR77: miembro 1 del grupo A de la subfamilia 4 de receptores nucleares (NR4A1).

A la luz de esta breve descripción podemos imaginar que la respuesta inmune desarrollada tras la activación de TLR-4 representa un complejo entramado molecular con múltiples interacciones reguladoras que aún desconocemos en su totalidad (Figura 17). Es el caso, por ejemplo, del último de los adaptadores con dominio TIR descrito, SARM, navegando entre la controversia de ejercer como inhibidor de TRIF (Carty et al., 2006) y de mediar procesos de toxicidad neuronal inducidos por estrés involucrando a las mitocondrias (Kim et al., 2007a). Agregando dificultad, no podemos obviar la participación de otras importantes rutas de señalización celular como la de la quinasa Janus/Transductores de la Señal y Activadores de la Transcripción (JAK/STAT) (Greenhill et al., 2011) o la de supervivencia celular PI3K/Akt (Ojaniemi et al., 2003). Destacando por su papel en la comunicación celular, las MAPKs se erigen como elemento integrador de las diferentes vías.

3.1.2 *Las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)*

Desde el descubrimiento en la década de 1950 de la fosforilación reversible como mecanismo regulatorio de la actividad proteica, más de 500 proteína/quinasas han sido descritas en humanos siendo las responsables de la mayoría de la mediación en la transducción de la señal de células eucariotas (Manning et al., 2002). Dentro de ellas, uno de los grupos más relevantes son las MAPKs cuyo nombre se les asigna al descubrir la implicación de las dos primeras descritas en la señalización de factores de crecimiento (Boulton et al., 1990). Investigaciones posteriores demostraron que la elección del nombre no resulta demasiado representativa ya que están realmente involucradas en la respuesta frente a estímulos estresantes potencialmente nocivos articulando procesos de proliferación, diferenciación, expresión génica, supervivencia celular y apoptosis. La conexión de su actividad con la regulación inmune se hace así inevitable. Filogenéticamente evolucionadas desde 3 precursores (Li et al., 2011a), en mamíferos se han descrito 14 MAPKs que conforman 7 rutas de transducción diferentes siendo las más caracterizadas las de las familias p38 (p38 α / β / γ / δ), las de regulación de la señal extracelular ERK (ERK1/2) y las NH₂-terminales de c-jun JNK (JNK1/2/3) (Johnson y Lapadat, 2002). Junto a ERK5 son conocidas como MAPKs convencionales por su capacidad de activarse y desactivarse por miembros de la familia MAP quinasa/quinasa (MAPKK/MEK) a diferencia de las atípicas ERK3/4, NLK y ERK7 (Coulombe y Meloche, 2007). Serán las convencionales las implicadas en la actividad del TLR-4 y sobre las que centraremos la discusión.

La estimulación del TLR-4 conduce a la fosforilación/activación de las MAPK y la subsecuente inducción de AP-1, formada por homo o heterodímeros de c-jun y c-fos, que coordina la producción de genes inflamatorios (Guha y Mackman, 2001). TAK1 fosforila directamente a MAPKK responsables de la activación y eventual translocación nuclear de JNK1/2 y de p38 α en el citosol y a IKK como habíamos señalado que, además de su acción ya descrita sobre NF- κ B, libera a la MAPKKK TPL2 provocando la cascada responsable de activar ERK1/2. p38 α será el principal responsable en la producción de citoquinas proinflamatorias, JNK tendrá un importante rol en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 proinflamatorio y ERK posee efectos más ambiguos induciendo, por ejemplo, inflamación a través de TNF- α e IL-1 β y contrarrestándola disminuyendo IL-12, IFN- β y la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) y aumentando IL-10 (Arthur y Ley, 2013). Además de la activación de AP-1, las MAPKs ejercen acciones sobre otras moléculas importantes para la respuesta inmune. Las proteína/quinasas activadas por MAPK (MKs o MAPKAPKs) 2 y 3 incrementan la producción del TNF- α y la estabilización de p38, responsable de su activación (Ronkina et al., 2007). Ambas MK2

y MK3 cooperan a su vez con ERK en la estimulación de las quinasas de la proteína ribosomal S6 (RSKs) relacionadas con la endocitosis del TLR-4 (Zaru et al., 2007) y en la fosforilación de las quinasas activadas por estrés y mitógenos (MSKs) 1 y 2 que limitan la respuesta inflamatoria activando la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP 1 (CREB-1), el factor activador de la transcripción 1 (ATF-1) y la histona H3 para transcribir las citoquinas antiinflamatorias IL-10, la proteína receptora del antagonista de IL-1 (IL-1RA) y la fosfatasa dual específica 1 (DUSP1) (Ananieva et al., 2008). (Figura 18)

Precisamente, DUSP1 fue la primera fosfatasa descubierta de la familia de las DUSPs o MKPs (Sun et al., 1993) que constituyen el principal mecanismo para controlar la intensidad y la duración de la actividad de las MAPKs. Las DUSPs defosforilan los residuos de treonina y tirosina (Thr/Tyr) de las MAPKs, desactivándolas. Se han descrito hasta la fecha 10 DUSPs catalíticamente funcionales en mamíferos, posicionándose dicho dominio en el extremo C-terminal y depositándose en el N-terminal aspectos reguladores de los que dependen el reconocimiento específico de las MAPK y la localización subcelular. En base a estas características podemos clasificarlas en tres grupos: las nucleares inducibles, las citoplasmáticas específicas para ERK y las específicas para JNK/p38 que podemos encontrarlas en ambos compartimentos celulares (Caunt y Keyse, 2013) (Figura 18).

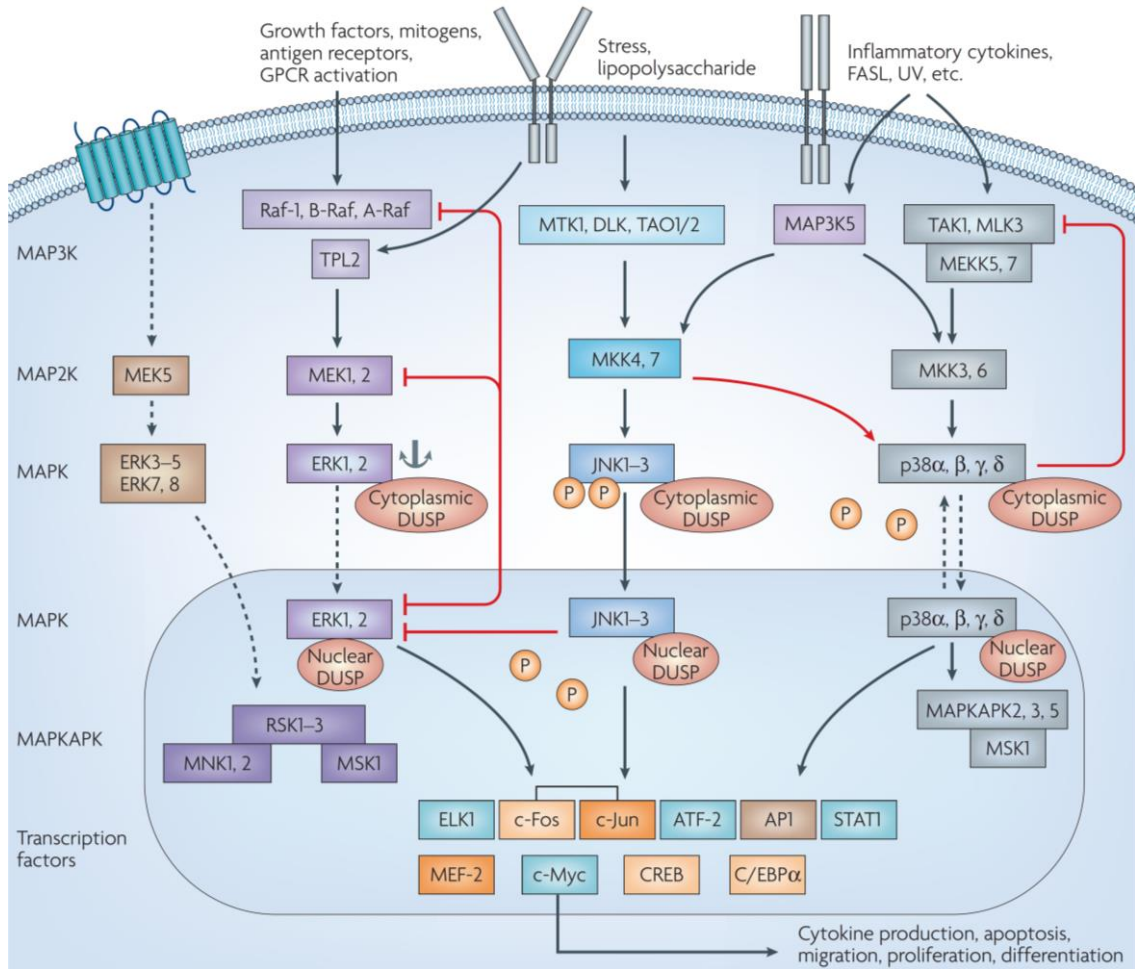


Figura 18. Las rutas de las MAPKs y su regulación por las fosfatasaes duales específicas (DUSPs) (Jeffrey et al., 2007). MAP3K: proteína/quinasa/quinasa/quinasa activada por mitógenos; MAP2K: proteína/quinasa/quinasa activada por mitógenos; MAPK: proteína/quinasa activada por mitógenos; MAPKAPK: proteína/quinasa activada por MAPK; MEK: quinasa/quinasa reguladora de la señal extracelular; ERK: quinasa de regulación de la señal extracelular; RSK: quinasa ribosomal S6; MNK: quinasa interactiva con las MAPKs; MSK: quinasa activada por mitógenos y estrés; GPCR: receptor acoplado a proteína G; Raf: proto-oncogen Raf; TPL: lugar de progresión del tumor; MTK: quinasa de metiliorribosa; DLK: proteína tipo *delta*; TAO: quinasa 1001 aminoácidos; MKK: quinasa/quinasa activada por mitógenos; JNK: quinasa NH₂ terminal de c-jun; FASL: ligando de FAS; UV: ultravioleta; TAK: quinasa asociada a tat; MLK: quinasa de linaje mixto; MEKK: quinasa/quinasa reguladora de ERK; p38: proteína 38; ELK: proteína que contiene el dominio ETS; ATF: factor de transcripción activador; AP: proteína activadora; STAT: activador de la transcripción y transductor de la señal; MEF: factor potenciador de miocitos; CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP; C/EBPα: proteína potenciadora de la unión a CCAAT.

La implicación de las DUSPs en las diferentes patologías parece agregar incluso aún más especificidad a sus propias características intrínsecas por lo que se postulan para tratar de modular de una manera más selectiva la gran cantidad de procesos en los que participan las MAPKs, abriendo un horizonte prometedor en su aplicabilidad en multitud de enfermedades (Rios et al., 2014). Relacionadas con el SNC, tenemos a DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1 y DUSP6/MKP-3 (Kodama et al., 2005, Duric et al., 2010, Morente et al., 2014).

Las MAPKs conectan también con otras importantes vías de señalización como la JAK/STAT y la PI3K/Akt. Tanto p38, ERK, como la isoforma *delta* de la proteína quinasa C (PKC- δ) inducen la fosforilación del residuo Ser727 de STAT1 promoviendo su homodimerización y translocación al núcleo (Kovarik et al., 1999, Uddin et al., 2002, Li et al., 2010) y dicho mecanismo se produce más temprano que la fosforilación en Tyr701 vía IFN de tipo I que produce heterodímeros STAT1/2, ambas sucediéndose tras la activación de TLR-4 (Rhee et al., 2003). Por otro lado, el receptor del IFN- γ con la participación de las JAKs 1 y 2 estimulan la vía PI3K/Akt y ejercen efectos similares sobre STAT1 (Shuai et al., 1992). La comunicación entre las MAPKs y PI3K/Akt requiere de una exquisita regulación con múltiples relaciones entre ellas en función de señales externas al representar, de manera general, consecuencias vitales para el ciclo celular (Aksamitiene et al., 2012).

Más de 2200 interacciones proteicas han sido identificadas entre las MAPKs y el resto de la maquinaria celular, otorgándoles un papel crucial en la biología celular llegándose a establecer el concepto de “interactoma de las MAPKs” (Bandyopadhyay et al., 2010). Tan vital es su señalización en el sistema inmune que incluso microorganismos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* o *Bacillus anthracis* han tratado evolutivamente de modular su actividad para intentar evadirlo (Jones et al., 2008, Ali et al., 2011, Kim et al., 2012). No es de extrañar, por lo tanto, que su potencial antiinflamatorio derivado de esta evasión de la activación de las MAPKs haya suscitado el interés desde un punto de vista farmacéutico a pesar de la dificultad a la hora de no afectar a otros sistemas celulares (Cohen, 2009).

3.2. El factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2)

Una de las consecuencias de la inflamación crónica es la acumulación de radicales libres y la generación de estrés oxidativo/nitrosativo que supone un factor de riesgo para el correcto funcionamiento del tejido, produciendo deficiencias graves que pueden conducir al daño y a la muerte celular. La neuroinflamación no es ajena a esta situación y, particularmente en depresión, datos tanto clínicos como experimentales indican la atenuación a nivel periférico de la capacidad antioxidante global en sangre debido a los bajos niveles plasmáticos de antioxidantes como el glutatión, la vitamina E o la coenzima Q10 y de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx) (Anderson y Maes, 2014). Teniendo esto en cuenta, se está explorando la posible acción farmacológica de moléculas con propiedades antioxidantes como la melatonina o la curcumina (Lopresti et al., 2015, Oglodek et al., 2016) así como la afectación

de los mecanismos inherentes de los que disponen las células para enfrentar un desafío mediado por radicales libres donde Nrf2 resulta fundamental.

Descubierto a mediados de los 90 (Moi et al., 1994), este factor de transcripción de la familia “Cap’n’collar” con estructura de cremallera de leucina pronto se descarta como fundamental en la eritropoyesis (Chan et al., 1996) y se observa su habilidad para reconocer los elementos de respuesta electrófila (EpRE) y los de respuesta antioxidante (ARE) (Wasserman y Fahl, 1997) del genoma presentes en los promotores de las enzimas detoxificantes de fase II como la hemoxigenasa 1 (HO-1), la NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO-1), la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), la GPx-1 y la catalasa (Venugopal y Jaiswal, 1996, Itoh et al., 1997, Venugopal y Jaiswal, 1998, Lee et al., 2003a). Tradicionalmente ha copado las investigaciones en cáncer (Ramos-Gomez et al., 2001, DeNicola et al., 2011) aunque las evidencias sobre los procesos inflamatorios inducidos por estrés en el SNC de la última década le han situado como una de las dianas prometedoras en el estudio de las patologías del mismo que cursan con un componente inflamatorio y de estrés oxidativo/nitrosativo (Djordjevic et al., 2015, Mendez-David et al., 2015).

La regulación del sistema Nrf2 va encaminada al mantenimiento inactivo de niveles de expresión basales bajos en el citoplasma preparados para una inducción rápida de su actividad ante la presencia de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. De ello se encarga su principal inhibidor, la proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1 (Keap-1) que forma homodímeros capaces de conectar su dominio Kelch C-terminal al Neh2 N-terminal de Nrf2 (Itoh et al., 1999). Por el extremo N-terminal, Keap-1 es capaz de unirse al complejo ubiquitina ligasa 3 a través del adaptador culina-3 que marca a Nrf2 para su degradación por el proteasoma 26S (Kobayashi et al., 2004). Existen diversas teorías acerca del mecanismo bioquímico por el que se produce la disociación entre Nrf2 y Keap-1 para permitir la acción de Nrf2 en el núcleo (Dinkova-Kostova et al., 2002, Levonen et al., 2004, Zhang et al., 2005, Kobayashi et al., 2006, Niture et al., 2009). La autorregulación del sistema Keap-1/Nrf2 parece estar controlada por retroalimentación negativa en la expresión de sus componentes (Kaspar y Jaiswal, 2010), la habilidad de Keap-1 para translocar al núcleo y degradar a Nrf2 (Niture et al., 2009) y la inducción de genes del proteasoma (Kwak et al., 2003).

Keap-1 es el principal inhibidor directo de Nrf2, pero no es el único capaz de modular su actividad. La translocación nuclear de Nrf2 para el ejercicio de su función antioxidante guarda una estrecha relación con procesos de fosforilación catalizados por quinasas como PKC (Huang et al., 2000), las de la vía PI3K/Akt (Lee et al., 2001, Kang et al., 2002), ERK y JNK (Xu et al., 2006). Sin embargo, la actividad de otras quinasas se encuentra inversamente relacionada con la

capacidad antioxidante de Nrf2, caso de p38 estabilizando el complejo Keap1-Nrf2 (Keum et al., 2006) o la glucógeno sintasa quinasa 3 *beta* (GSK-3 β) estimulando la degradación proteasomal de Nrf2 independiente de Keap1 (Rada et al., 2012) o provocando su expulsión nuclear a través de las quinasas Src (Niture et al., 2011). Este último ejemplo sirve para recalcar que las acciones de las quinasas sobre Nrf2 no necesariamente suceden por interacción directa con el complejo Keap-1/Nrf2 si no mediante señalización indirecta (Sun et al., 2009b) (Figura 19).

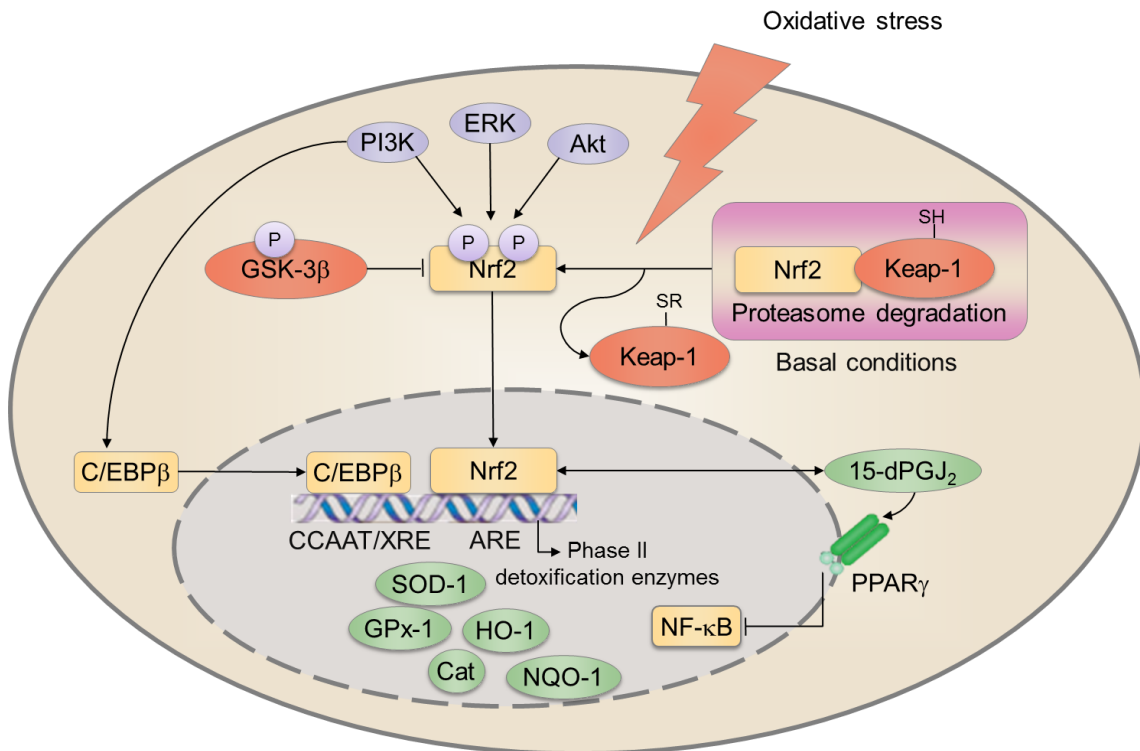


Figura 19. El sistema antioxidante factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2). PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa; ERK: quinasa reguladora de la señal extracelular; Akt: proteína quinasa B; GSK-3 β : glucógeno sintasa quinasa 3-*beta*; Keap-1: proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1; C/EBP β : proteína potenciadora de la unión a CCAAT; XRE: elementos de respuesta electrófila; ARE: elementos de respuesta antioxidante; SOD-1: superóxido dismutasa-1; HO-1: hemoxigenasa 1; NQO-1: NAD(P)H quinona deshidrogenasa-1; GPx-1: glutatión peroxidasa-1; Cat: catalasa; NF- κ B: factor nuclear *kappa* B; PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma*; 15-dPGJ₂: 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂.

Los procesos autofágicos influyen también en la actividad de Nrf2. La nucleoporina p62 (p62), sustrato autofágico selectivo y de transporte de proteínas con defectos en el plegamiento, funciona como un sensor ante el mal funcionamiento del sistema ya que defectos en la autofagia provocan estrés oxidativo y acumulación de p62, capaz de inducir el sistema antioxidante Nrf2 al secuestrar a Keap-1 en agregados (Komatsu et al., 2007, Komatsu et al., 2010). El gen de p62 contiene secuencias ARE en su región promotora, por lo que es a su vez susceptible de activación por Nrf2 provocando un *feedback* positivo (Jain et al., 2010). Por último, el campo de la epigenética también se abre paso en la regulación promotora de Nrf2 con la implicación de la acetilación de histonas o las islas CpG de silenciamiento génico (Sun et al., 2009a, Su et al., 2013).

La configuración de la respuesta Nrf2 como mecanismo de protección celular frente a amenazas articuladas por radicales libres que comprometen la integridad celular se sitúa en las antípodas de la neuroinflamación crónica descrita en las patologías del SNC. No es de extrañar que se haya descrito una comunicación bidireccional entre ambos sistemas antagónicos tomando al NF- κ B como referencia de factor proinflamatorio en este tipo de procesos y discurrendo la mayoría de las alternativas propuestas alrededor de los mecanismos indirectos que ya han sido señalados (Liu et al., 2008, Nair et al., 2008, Yu et al., 2011). En este balance, del lado “neuroprotector” junto a Nrf2 se sitúa también el receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma* (PPAR- γ) capaz de inhibir la respuesta inflamatoria y su toxicidad asociada (Ricote et al., 1998). Reforzando más esta idea de equilibrio homeostático, la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15-dPGJ₂) es un agonista endógeno de los receptores antiinflamatorios PPAR- γ (Forman et al., 1995) y es producida por deshidratación no enzimática a partir de la prostaglandina D₂, producto a su vez de la acción de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1, COX-2) siendo la COX-2 inducida por el factor proinflamatorio NF- κ B. Además, la 15-dPGJ₂ parece ejercer parte de sus acciones a través de Nrf2 (Kansanen et al., 2009, Bancos et al., 2010, Haskew-Layton et al., 2013).

4. Inflamación periférica: consecuencias gastrointestinales y conexión con el microbioma

Ya ha sido explicado en el punto 1.2.2 de la presente Tesis Doctoral que la depresión cursa con inflamación tanto a nivel central como periférico. La cronicidad de dicha inflamación periférica inducida por el estrés provoca una disfunción intestinal desorganizando las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions* en el colon (Ponferrada et al., 2007), lo cual es coherente con el hecho de que los pacientes psiquiátricos habitualmente presentan síntomas gastrointestinales así como los pacientes con patologías gastrointestinales sufren a menudo la comorbilidad de una enfermedad psiquiátrica (Sobanski et al., 2015, Bekhuis et al., 2016). Por lo tanto, intestino y cerebro parecen estar relacionados, afirmación poco novedosa ya que sabemos de la existencia de estructuras nerviosas en el intestino desde hace más de 150 años, culminando con los estudios de Robertson y Langley a principios de siglo acuñando este último el término “sistema nervioso entérico” (Langley, 1921). Es más, el desarrollo embrionario las conecta por su migración desde la cresta neural hasta el punto de formar dos plexos en el aparato digestivo, el mientérico y el submucoso (Nagy y Goldstein, 2017). Señalando más evidencias, aproximadamente el 95% de la serotonina, uno de los principales neurotransmisores de nuestro organismo, se expresa en el intestino (Gershon y Tack, 2007).

Sin embargo, no ha sido hasta las últimas dos décadas cuando se ha profundizado y obtenido avances sobre los engranajes que gobiernan esta comunicación y sus implicaciones en fisiología y patología. El intestino es el órgano que más microorganismos alberga en el ámbito del cuerpo humano y su papel va mucho más allá de la pura relación simbiote conocida en la digestión ya que participarán y dirigirán de manera crucial una gran cantidad de procesos a lo largo de la vida del individuo. Este concepto ha resultado revolucionario y en 2008 dio comienzo el ambicioso Proyecto Microbioma Humano para tratar de caracterizar las poblaciones microbianas presentes en el organismo en situaciones de salud y enfermedad, cuyas actualizaciones están teniendo un gran impacto en la comunidad científica (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Nos encontramos, probablemente, ante una nueva visión de la fisiología humana que la hace depender no sólo de sus propias estructuras y características, sino de la interacción con los organismos vivos que conforman el conocido como microbioma y que adquiere una dimensión de especial importancia en el SNC.

4.1. El eje microbiota-intestino-cerebro

Revisada recientemente la proporción que situaba al 90% de las células de nuestro cuerpo como microbianas y ubicada más cercana a un 56%, aún resulta sorprendente que haya en él más células de organismos microbiológicos que propiamente humanas (Sender et al., 2016). Las cifras son todavía más espectaculares si cabe al mirarlas desde el punto de vista genómico ya que el conjunto de genes aportado por la microbiota asciende a casi 10 millones, 500 veces el genoma humano (Li et al., 2014b). Se erige así el concepto de “superorganismo” para la especie humana representando al colectivo formado por células microbianas y humanas fruto de una coevolución en búsqueda del beneficio común (Sleator, 2010).

La gran mayoría de los organismos microbiológicos colonizan el intestino, con concentraciones que oscilan desde 10^1 - 10^3 células por gramo en el duodeno hasta 10^{11} - 10^{12} en la parte distal del colon (Qin et al., 2010). Atendiendo a la clasificación filogenética, los *phyla* más representados son *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, aunque también están presentes *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Cyanobacterias* y la distribución de los mismos no es uniforme, sino que existen importantes diferencias entre el lumen intestinal y la capa mucosa. La composición y función de la microbiota intestinal es extraordinariamente variable entre individuos, con grandes fluctuaciones en el tiempo durante las fases iniciales del desarrollo y en situaciones patológicas, aunque también afectada por otra serie de aspectos como la genética, la dieta o el ambiente, donde adquiere protagonismo el estrés. Sin embargo, a pesar de esta tremenda variabilidad, compartimos como especie un núcleo del microbioma que asigna al mismo una funcionalidad específica en cada situación vital y de cuya modificación puede provenir el advenimiento de patologías (Lozupone et al., 2012) (Figura 20).

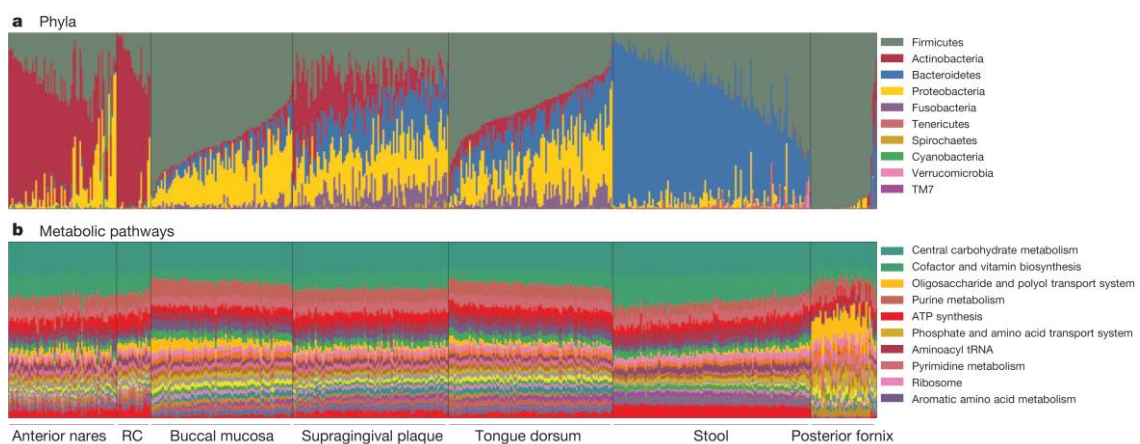


Figura 20. Variación interindividual del microbioma (a) y estabilidad de las rutas metabólicas en la población sana (b) (Human Microbiome Project Consortium, 2012). RC: pliegue retroauricular.

Se han propuesto diversos mecanismos por los que la microbiota intestinal podría modular las funciones del SNC (Figura 21). La administración exógena de bacterias, ya sean probióticas o patógenas, puede cambiar la flora bacteriana al competir por nutrientes, afectar el crecimiento de otras especies por su propio metabolismo, colonizar determinados lugares de la barrera intestinal o afectar a las funciones digestiva e inmune y tener incluso consecuencias a nivel del comportamiento (Kelly et al., 2016). Los cambios en la función inmune inducidos por las propias bacterias intestinales pueden estar relacionados con la patología depresiva (Gárate et al., 2011a). Otra de las vías de comunicación es puramente neuronal y se basa en la participación del nervio vago, principal en la transmisión parasimpática, y a través del cual las bacterias inducen respuestas comportamentales (Pérez-Burgos et al., 2013). A nivel endocrino, las bacterias son capaces de intervenir en los péptidos secretados por las células enteroendocrinas con implicaciones centrales como la regulación metabólica del apetito (Schele et al., 2013). Los metabolitos generados por determinadas poblaciones bacterianas ejercen acciones sobre el cerebro (Kimura et al., 2013) y las propias bacterias interfieren con el metabolismo de la serotonina al desviar el triptófano necesario para su síntesis hacia la vía de las kinureninas como consecuencia de la respuesta inflamatoria (Raison et al., 2009), con importantes implicaciones para el SNC y el comportamiento que será desgornado en el punto 5.2 de la presente Tesis Doctoral.

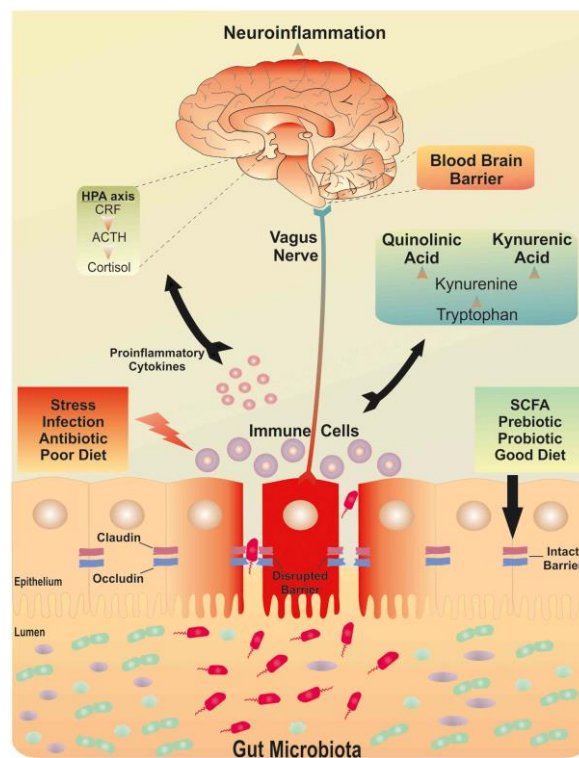


Figura 21. El eje microbiota-intestino-cerebro (Kelly et al., 2015). HPA: hipotálamo-hipófisis-adrenal; CRF: factor liberador de corticotropina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; SCFA: ácido graso de cadena corta.

Debido a sus características y a las evidencias disponibles, tres moléculas se han postulado como claves en la comprensión de la comunicación intestino-cerebro por las acciones que desempeñan en lugares claves del sistema. La molécula de señalización crítica en el eje parece ser la serotonina. En el tracto gastrointestinal, su síntesis la llevan a cabo las células enterocromafines, principal reserva corporal de dicha sustancia, y cumple un rol crucial en los procesos de secreción, señalización y permeabilidad intestinal (Keszthelyi et al., 2014) pudiendo el propio microbioma modular la producción de serotonina en dichas células (Yano et al., 2015). Se han descubierto unas unidades neurovasculares denominadas “*neuropods*” que podrían servir de estructura puente entre las bacterias y el SNC a través de las células enterocromafines (Bohorquez et al., 2015). En el SNC, la serotonina es uno de los principales neurotransmisores por lo que la función que desempeña en ambos sistemas es lo suficientemente importante como para articular una eventual interacción entre ambos. Por otro lado, tenemos a los TLRs, cuyas funciones inmunes en el reconocimiento de microorganismos han sido detalladas, así como su presencia en el SNC. Además, su expresión en el intestino mantiene la función de la barrera epitelial al promover la proliferación de sus células, la secreción de IgA al lumen y la expresión de péptidos antimicrobianos (Moyano-Porcile et al., 2015). La desregulación de los mismos y la inflamación crónica asociada interfieren en el correcto funcionamiento del eje a todos los niveles. Por último, dentro de los metabolitos bacterianos merece especial atención el grupo de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) que constituyen auténticas señales neurohormonales. Pueden acceder al SNC a través de los transportadores de monocarboxilato de la BHE (Steele, 1986) y modificar funciones hipotalámicas como el apetito (Frost et al., 2014) mientras que en el epitelio intestinal colaboran en su mantenimiento, relacionándose su déficit con enfermedades intestinales como el colon irritable (Pozuelo et al., 2015).

4.2. La traslocación bacteriana inducida por estrés y las enfermedades psiquiátricas

El SNC y la microbiota intestinal presentan un cierto paralelismo en sus respectivos desarrollos lo que nos lleva a pensar en la posible interacción de ambos sistemas a lo largo de la vida de un individuo, ya sea en el desarrollo o en la edad adulta (Figura 22). La microbiota intestinal, por tanto, lleva a cabo una función vital para el cuerpo humano pero su propia actividad o naturaleza, aunque no sean patógenos, les hace susceptibles de ejercer efectos perjudiciales y contribuir al desarrollo de patologías al encontrarse fuera de su hábitat simbiote. En el campo de la psiquiatría, numerosos estudios han mostrado que la modificación de la microbiota intestinal es capaz de modular el comportamiento y la actividad cerebral y viceversa (Schmidt,

2015), situación no exclusiva a la especie humana, sino que se da en muchos géneros animales (Ezenwa et al., 2012)

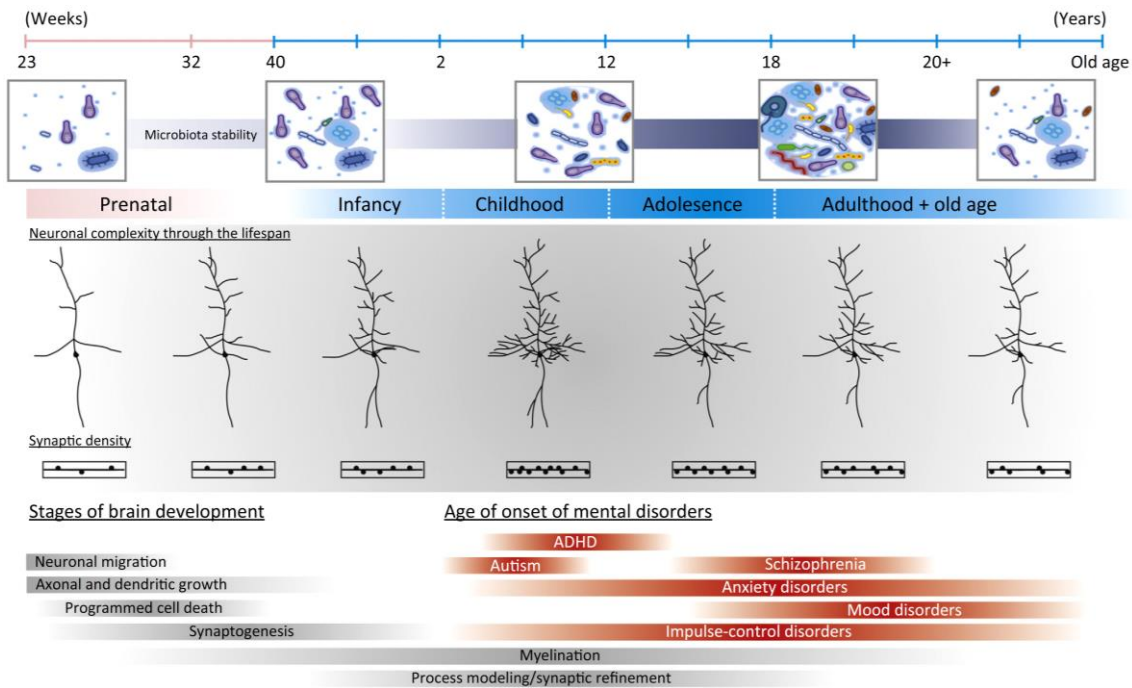


Figura 22. Perfil temporal de las etapas del neurodesarrollo en relación a la edad de inicio de las enfermedades mentales y al grado de estabilidad y diversidad de la microbiota a lo largo de la vida del individuo (Borre et al., 2014). ADHD: trastorno por déficit de atención e hiperactividad.

El principal mecanismo que puede estar implicado en la relación entre las bacterias intestinales y las enfermedades psiquiátricas es la traslocación bacteriana. Consiste en el paso de bacterias, convirtiéndose en “patobiontes”, o sus componentes a su través de la barrera intestinal y el estrés juega un papel fundamental en el proceso, destacándose como otro punto más en común entre las patologías psiquiátricas y gastrointestinales. De ahí la importancia de las barreras físicas y, pensando en una hipotética interacción con el cerebro, la primera que se encuentran las bacterias es el epitelio intestinal.

La principal función de la barrera epitelial en el intestino es la regulación del intercambio de sustancias a su través y tal es su papel en la defensa del organismo que sobre la correcta ejecución de este proceso descansa la dualidad entre tolerancia e inmunidad frente a antígenos propios y ajenos con su consiguiente repercusión en las enfermedades autoinmunes (Christen y von Herrath, 2004). Su estructura consiste en una monocapa de células epiteliales selladas entre sí por las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions* compuestas por proteínas como claudina, ocludina, triculina y *zona occludens-1* (ZO-1) (Farquhar y Palade, 1963, Stevenson et al., 1986) y una capa mucosa de grosor no uniforme a lo largo del intestino formada fundamentalmente por mucinas. Esta última contiene IgA y péptidos antimicrobianos y amplía

su tamaño en el colon con una densa segunda capa formada a partir de la interna que se renueva cada hora (Johansson et al., 2011). La barrera se constituye al final del primer trimestre del embarazo y su desarrollo funcional prosigue en el periodo post-natal por lo que coincide temporalmente con el desarrollo de la microbiota. En estos primeros meses de vida, el microbioma se ve influenciado por situaciones de estrés, enfermedad o la propia microbiota materna durante el embarazo, aspectos genéticos, la existencia o no de amamantamiento, el nacimiento por parto natural o cesárea y la hospitalización durante el mismo, el uso de antibióticos y el entorno, como por ejemplo el contacto con otros individuos o mascotas (Borre et al., 2014). La composición microbiana del individuo se comienza a parecer a la de un adulto a los tres años de vida, no obstante, estas fluctuaciones no se limitan a los momentos del desarrollo y, como ha sido señalado previamente, dependen también de otros factores en la edad adulta. Recíprocamente, la microbiota participa e influye en la constitución de la barrera y recientes investigaciones asignan un posible papel a los microRNAs en dicho proceso (Cichon et al., 2014).

La última estructura con la que deberían tener relación los microorganismos para acceder a modificar la función cerebral es la BHE. Encontramos en ella un paralelismo con el intestino ya que estructuralmente es una compleja unidad neurovascular constituida por astrocitos, pericitos y células endoteliales unidas por *tight junctions* sellando todas ellas el lumen vascular y su desarrollo se corresponde también con el periodo embrionario (Bauer et al., 2014). Investigaciones llevadas a cabo gracias a la tecnología de los ratones libres de microorganismos o *germ-free* apuntan a que la BHE es vulnerable frente a cambios en la microbiota intestinal (Braniste et al., 2014). El uso de esta tecnología también ha demostrado que la microbiota normal residente en el intestino modula el desarrollo cerebral y el comportamiento (Diaz Heijtz et al., 2011).

Las consecuencias o contribución que podría acarrear el fenómeno de la translocación bacteriana para el organismo y sus diferentes patologías hacen que se esté explorando el epitelio intestinal como una de las principales dianas farmacológicas para evitar las acciones deletéreas microbianas (Figura 23). Entre las posibles intervenciones propuestas destacan las modificaciones dietéticas, probióticos y prebióticos, terapia con antibióticos y trasplante de heces (Fond et al., 2015). La dieta es un aspecto crítico en la composición del microbioma por lo que favorecer dietas de bajo contenido en grasa y alto en fibra (Wu et al., 2011), el consumo de antioxidantes y ácidos grasos $\omega 3$ (Patil et al., 2011, Shi et al., 2016) y evitar deficiencias en nutrientes necesarios para la actividad de la alcalina fosfatasa intestinal como el zinc o el

magnesio (Malo et al., 2010) podrían presentar potencial terapéutico. Especial atención merece el auge en los últimos años de los probióticos, definidos como los organismos vivos, habitualmente bacterias o levaduras, que ayudan a la función digestiva y resultan beneficiosos para la salud. Debido a la habilidad de algunos de ellos en el mantenimiento y restauración de la barrera intestinal, se les está considerando para el tratamiento de enfermedades inducidas por el estrés como las psiquiátricas (Huang et al., 2016, McKean et al., 2016, Pirbaglou et al., 2016). Asimismo, la administración directa de prebióticos relacionados con la producción de ácidos grasos de cadena corta y su capacidad antiinflamatoria representa otra posible vía de intervención (Ginty y Conklin, 2015). Los antibióticos, además de su utilización en investigación como herramienta farmacológica para modular la composición del microbioma, están explorándose como adyuvantes en el tratamiento de la depresión (Emadi-Kouchak et al., 2016). Por último, el trasplante de heces aporta evidencias, hasta el momento únicamente en animales, de su potencial utilización en el futuro en enfermedades psiquiátricas (Kelly et al., 2016, Zheng et al., 2016).

La irrupción de los últimos avances científicos sobre el microbioma ha revolucionado la forma de entender las enfermedades hasta el punto de que a finales del año 2016 se encuentran activos 301 ensayos clínicos relacionados con el microbioma de los cuales 14 guardan relación con los trastornos depresivos (ClinicalTrials.gov National Institutes of Health, 2016).

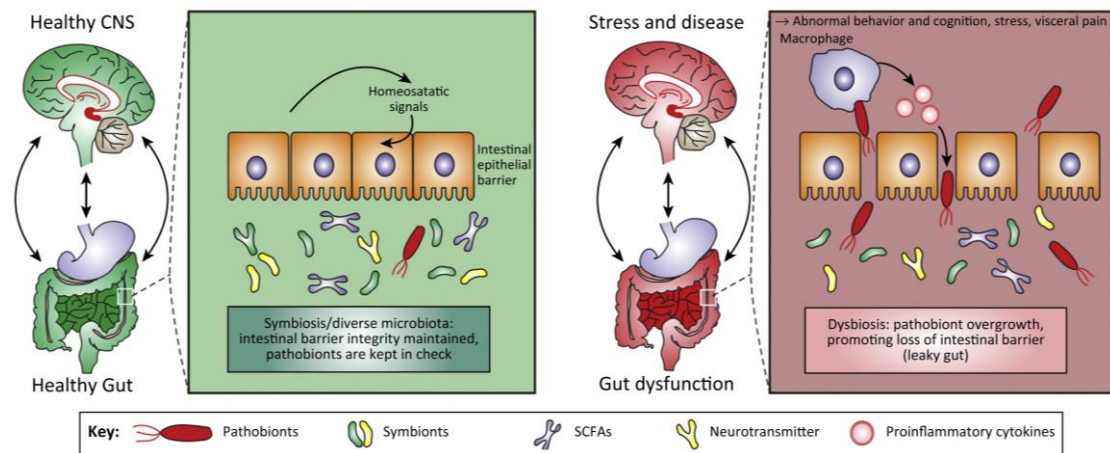


Figura 23. La comunicación bidireccional intestino-cerebro en situaciones de salud y enfermedad (Borre et al., 2014). CNS: sistema nervioso central; SCFA: ácido graso de cadena corta.

5. La serotonina y la depresión

La serotonina ha sido tradicionalmente el neurotransmisor más vinculado con los trastornos depresivos constituyendo el aumento en su transmisión la principal diana farmacológica de los antidepresivos más utilizados y llegando a conocerse coloquialmente como “la hormona de la felicidad”. En 1952 se concluyó que la sustancia previamente descrita en células enterocromafines nombrada como enteramina (Erspamer, 1946) y el vasoconstrictor presente en el suero al que denominaron serotonina (Rapport et al., 1948) eran la misma molécula, la 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Erspamer y Asero, 1952). Pocos años más tarde se identificó su papel en el SNC (Brodie et al., 1955) y terminaron así de definirse las tres principales localizaciones fisiológicas de la serotonina: el tracto gastrointestinal (responsable del 90% de la misma), las plaquetas y el SNC.

En el cerebro de un roedor, de manera similar al humano, las neuronas serotoninérgicas se organizan en nueve agrupaciones en el núcleo del rafe proyectando los más caudales (B1-B3) hacia la médula espinal y la periferia, mientras que los dorsales (B6, B7) y los mediales (B5, B8) lo hacen hacia diferentes regiones cerebrales de manera no exclusiva, incluyendo la corteza frontal y el hipocampo. Se convierte, por lo tanto, en el neurotransmisor clásico más ampliamente distribuido y responsable de articular una gran variedad de procesos como el control cognitivo, la regulación de las emociones, las respuestas autónomas y la actividad motora así como la plasticidad neuronal y la modulación de otras redes de neurotransmisión como la glutamatérgica (Figura 24) (Lesch y Waider, 2012). La naturaleza de su participación en el funcionamiento del SNC hace crítica su implicación en trastornos psiquiátricos como la depresión.

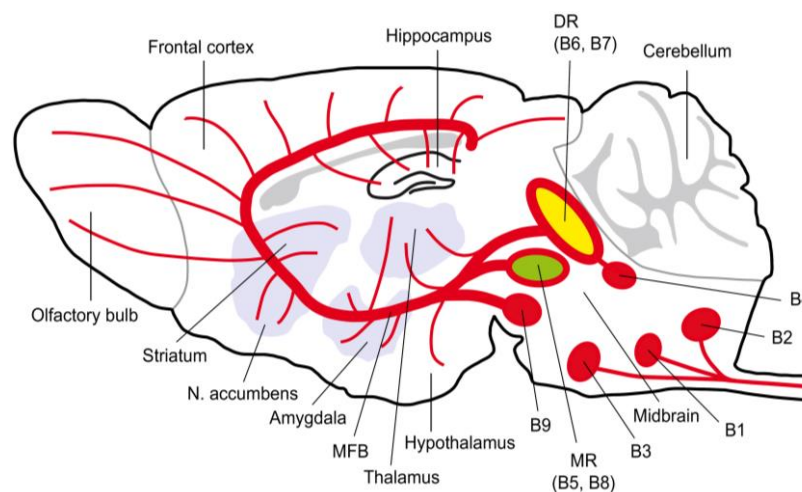


Figura 24. Sistema serotoninérgico en el cerebro de un roedor (Lesch y Waider, 2012). MFB: fascículo medial del prosencéfalo; B: núcleo del rafe; MR: núcleo medial del rafe; DR: núcleo dorsal del rafe.

Bioquímicamente, el precursor de la síntesis de serotonina es el triptófano, aminoácido esencial que se convertirá en 5-HT por la acción consecutiva de la triptófano hidroxilasa y la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos. De su degradación se ocuparán las MAOs y de su recaptación de la hendidura sináptica el transportador de serotonina (SERT), diana de los ISRSs. Su acción biológica como neurotransmisor se realiza mediante su unión a receptores específicos de serotonina (Figura 25) (Wong et al., 2005).

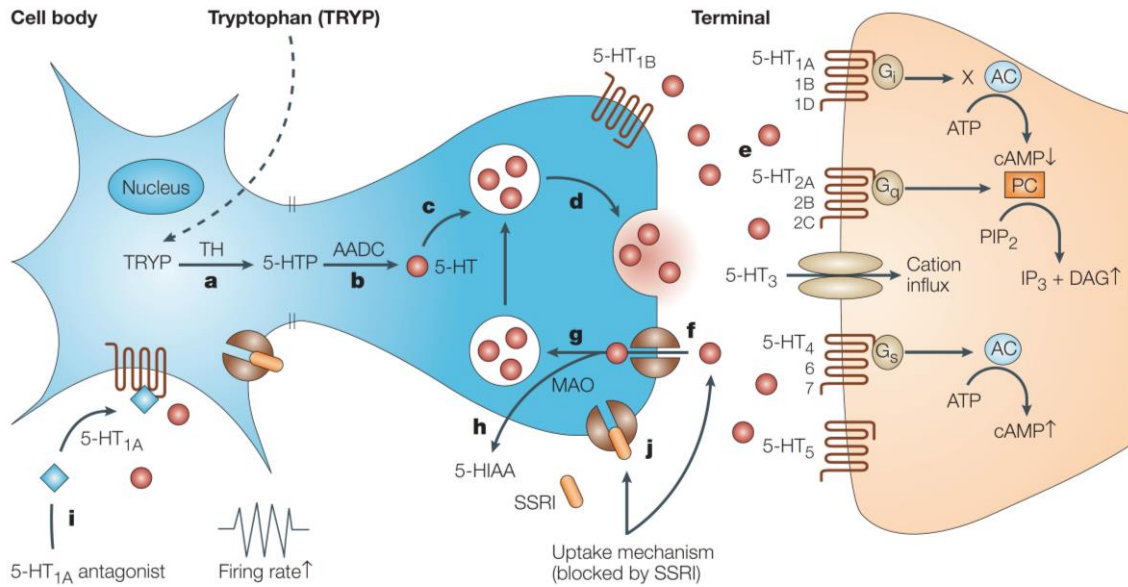


Figura 25. *Procesos bioquímicos asociados a la transmisión serotoninérgica* (Wong et al., 2005). TH: tirosina hidroxilasa; 5-HTP: 5-hidroxitriptófano; AADC: descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos; 5-HT: serotonina; 5-HT_x: receptor de serotonina “x”; MAO: monoaminoxidasa; SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; G_i: proteína G inhibitoria; G_q: proteína G subunidad q; G_s: proteína G estimulante; AC: adenilil ciclasa; ATP: adenosintrifosfato; cAMP: AMP cíclico; PC: fosfolipasa C; PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol.

5.1. Los receptores de serotonina en la depresión

Existen al menos 14 tipos de receptores de serotonina agrupados en 7 familias mediante transmisiones tanto excitadoras como inhibitorias a través de su acoplamiento a proteínas G, salvo en el caso de 5-HT₃ que es un canal iónico activado por ligando (Barnes et al., IUPHAR/BPS <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=1>. (acceso 06/02/2017)) (Tabla 3). De todas ellas, las más relacionadas con la patología depresiva son las familias 5-HT₁ 5-HT₂ y 5-HT₇ (Tabla 4).

Familia	Tipo	Transducción de la señal	Potencial
5-HT ₁	Acoplado a G _i /G _o	↓ AMPc	Inhibitorio
5-HT ₂	Acoplado a G _q /G ₁₁	↑ IP ₃ /DAG	Excitatorio
5-HT ₃	Canal iónico Na ⁺ /K ⁺	Despolarización	Excitatorio

5-HT₄	Acoplado a G _s	↑ AMPc	Excitatorio
5-HT₅	Acoplado a G _i /G _o	↓ AMPc	Inhibitorio
5-HT₆	Acoplado a G _s	↑ AMPc	Excitatorio
5-HT₇	Acoplado a G _s	↑ AMPc	Excitatorio
5-HT_{1P}	Huérfano	-	-

Tabla 3. Familias de receptores de serotonina

Familia	Receptor	Efecto antidepressivo
5-HT₁	5-HT _{1A}	<ul style="list-style-type: none"> • Autorreceptores antagonismo (Artigas et al., 1996) • Heterorreceptores: agonismo (Depoortere et al., 2010)
	5-HT _{1B}	<ul style="list-style-type: none"> • Autorreceptores antagonismo (Dawson et al., 2006) • Heterorreceptores: agonismo (Hwang y Chung, 2014)
5-HT₂	5-HT _{2A}	<ul style="list-style-type: none"> • Agonismo (Sato et al., 2010b) • Antagonismo (Artigas, 2013)
	5-HT _{2B}	Agonismo (Diaz et al., 2016)
5-HT₇	5-HT ₇	Antagonismo (Canale et al., 2016b)

Tabla 4. Principales clases de receptores de serotonina (5-HT) implicados en la depresión. 5-HT_x: receptor de serotonina "x"

De la primera familia, los 5-HT₁, la investigación se ha centrado en los HT_{1A} y HT_{1B}, ya que para los 5-HT_{1D} 5-HT_{1E} 5-HT_{1F} se encuentran disponibles escasos estudios relacionados con la depresión tanto por las herramientas disponibles como por sus propias características. Tanto los receptores 5-HT_{1A} como 5-HT_{1B} funcionan inhibiendo la adenilil ciclasa y abriendo canales de potasio (K⁺), por tanto, ejerciendo un potencial inhibitorio pre sinápticamente como autorreceptores o post sinápticamente como heterorreceptores. Su función como autorreceptores es fundamental para la regulación de la transmisión serotoninérgica al completar un *feedback* negativo sobre la neurona pre sináptica, aunque su distribución cerebral marca diferencias sustanciales. Los 5-HT_{1A} constituyen el autorreceptor por excelencia y se localizan principalmente sobre las neuronas de los núcleos del rafe por lo que su señalización tiene un gran efecto en la reducción de los niveles globales de serotonina en el cerebro, dadas sus múltiples proyecciones (Sprouse y Aghajanian, 1987). A este mecanismo se le ha atribuido la demora temporal en la efectividad de los ISRSs hasta que consiguen la desensibilización de estos receptores (Artigas et al., 1996). De hecho, algunos estudios muestran el aumento de su densidad en la depresión y riesgos genéticos derivados del mismo (Parsey et al., 2006, Neff et al., 2009) aunque la administración concomitante de antagonistas 5-HT_{1A} con los ISRSs no ha

sido efectiva en pacientes resistentes al tratamiento (Pérez et al., 1999). Sin embargo, numerosos estudios atribuyen propiedades beneficiosas a moléculas que presentan agonismo parcial por estos receptores, encontrándose esta propiedad presente en la vortioxetina, recientemente aprobado como antidepresivo (Bortolozzi et al., 2012, Mork et al., 2012). Además, dentro de sus funciones como heterorreceptores con importante presencia en hipocampo, *septum*, amígdala y regiones corticolímbicas, en el hipocampo actúan estimulando la neurogénesis en la región CA3 por lo que un efecto agonista sobre ellos resultaría en un potencial antidepresivo (Blier y Ward, 2003). Una de las vías de desarrollo de nuevos fármacos frente a la depresión trata de aprovechar estas características y aunar ambos efectos a través del desarrollo de moléculas agonistas con una mayor afinidad por los heterorreceptores 5-HT_{1A} y menor por los autorreceptores (Depoortere et al., 2010).

Por su parte, los autorreceptores 5-HT_{1B} poseen localización axonal en lugar de somatodendrítica como los 5-HT_{1A}, por lo que su responsabilidad en el tono serotoninérgico no resulta tan generalizada (Sprouse y Aghajanian, 1987). Los 5-HT_{1B} post sinápticos se expresan en neuronas no serotoninérgicas y modulan la liberación de otros neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, noradrenalina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA). Como consecuencia, la distribución de los 5-HT_{1B} en el cerebro es muy amplia, con una fuerte expresión en los ganglios basales y el subículo dorsal del hipocampo y moderada en la corteza cerebral, la capa molecular del hipocampo, el núcleo entopeduncular, la capa superficial gris del colículo superior, el caudado-putamen y el núcleo profundo del cerebelo (Sari, 2004). Debido a esta dualidad, el 5-HT_{1B} ha sido implicado en efectos antidepresivos tanto por antagonismo (Tatarczynska et al., 2004, Dawson et al., 2006) como por agonismo del mismo (Hwang y Chung, 2014, Yamanaka et al., 2014). La importancia para discernir entre auto y heterorreceptores ha otorgado protagonismo a la proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10 o p11), molécula implicada en la disposición de este receptor en la membrana y que se encuentra disminuida en depresión (Svenningsson et al., 2006).

La familia de los 5-HT₂, de localización post sináptica, ha sido clásicamente vinculada con la acción antidepresiva. Los 5-HT_{2A} alcanzan un alto grado de expresión en el neocórtex asociados a las transmisiones GABA y glutamatérgica (de Almeida y Mengod, 2007), aunque se extienden por todo el cerebro. Su actividad parece ser necesaria para la acción de los antidepresivos convencionales (Sato et al., 2010b), aunque su papel en depresión aún no está demasiado claro. Una interesante aportación acerca de un posible antagonismo beneficioso de los 5-HT_{2A} surge de su colocalización con los 5-HT_{1A} en áreas corticolímbicas, por lo que el bloqueo de su actividad

impulsaría la acción sobre los 5-HT_{1A}, reduciendo la transmisión de serotonina. La zona ventral del cíngulo anterior contiene mayor proporción de los 5-HT_{1A} sugiriendo un posible predominio inhibitorio en dicha zona y proyecta hacia zonas subcorticales donde precisamente se encuentra el área 25 de Brodmann, implicada en el tratamiento de la depresión resistente mediante la estimulación cerebral profunda (Artigas, 2013). Habitualmente relacionados con su distribución periférica, los 5-HT_{2B} no han sido muy caracterizados en los trastornos depresivos pero recientes estudios apuntan a la necesidad de su presencia para la acción antidepresiva y su expresión en el núcleo dorsal del rafe (Diaz et al., 2016), por lo que se abre la puerta a una nueva diana farmacológica de potencialidad limitada de antemano por las funciones pulmonares y cardiovasculares periféricas de dicho receptor. El último componente de esta familia, el 5-HT_{2C}, se distribuye también en diversas áreas cerebrales con especial importancia en su influencia sobre transmisiones GABAérgicas y dopaminérgicas (Bubar et al., 2011). Su papel en patología depresiva dista mucho de estar claro, con efectos antidepresivos mostrados por antagonistas en su administración concomitante junto a ISRSs que podrían deberse a la desensibilización crónica de los receptores (Cremers et al., 2004) pero también con potencial antidepresivo descrito para sus agonistas (Cryan y Lucki, 2000).

Con poco más de dos décadas desde su descubrimiento, el receptor 5-HT₇ se ha implicado en los procesos depresivos debido a su influencia en la regulación del aprendizaje, la memoria, la actividad locomotora y exploratoria, la termorregulación, los ritmos circadianos, el sueño y el estado de ánimo mediante una importante presencia en el tálamo, hipotálamo, hipocampo corteza y amígdala (Varnas et al., 2004, Guseva et al., 2014). El bloqueo del 5-HT₇ se ha relacionado con propiedades antidepresivas (Stroth y Svenningsson, 2015b, Canale et al., 2016b) y la habilidad de gran parte de los antipsicóticos por modular este receptor se está probando como potenciador del efecto de los antidepresivos convencionales (Berman et al., 2009).

Las complejas redes neuronales que se extienden en relación con la serotonina y sus receptores dificultan la eventual intervención farmacológica sobre los mismos pero podemos observar un esquema simplificado que nos ayuda a entender su distribución en el cerebro y el funcionamiento global del sistema en la Figura 26 (Artigas, 2013).

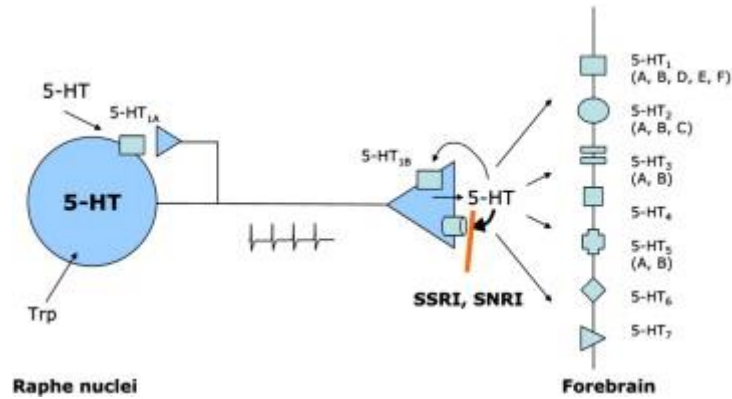


Figura 26. Representación esquemática del funcionamiento global del sistema serotoninérgico en el cerebro (Artigas, 2013). 5-HT: serotonina; 5-HT_x: receptor de serotonina “x”; Trp: triptófano; SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina; SNRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina.

5.2. Implicaciones de la vía de las kinureninas en la depresión: biodisponibilidad de serotonina y excitotoxicidad glutamatérgica

Uno de los retos que enfrenta la investigación en depresión es tratar de encontrar nexos de unión entre las evidencias que se registran y que sustentan las diferentes hipótesis fisiopatológicas. En este sentido, la ruta metabólica de las kinureninas presenta gran potencial no sólo por su implicación en la enfermedad si no porque ésta puede ser crucial en las interacciones entre la inflamación, los sistemas de neurotransmisión y el eje microbiota-intestino-cerebro (Figura 27).

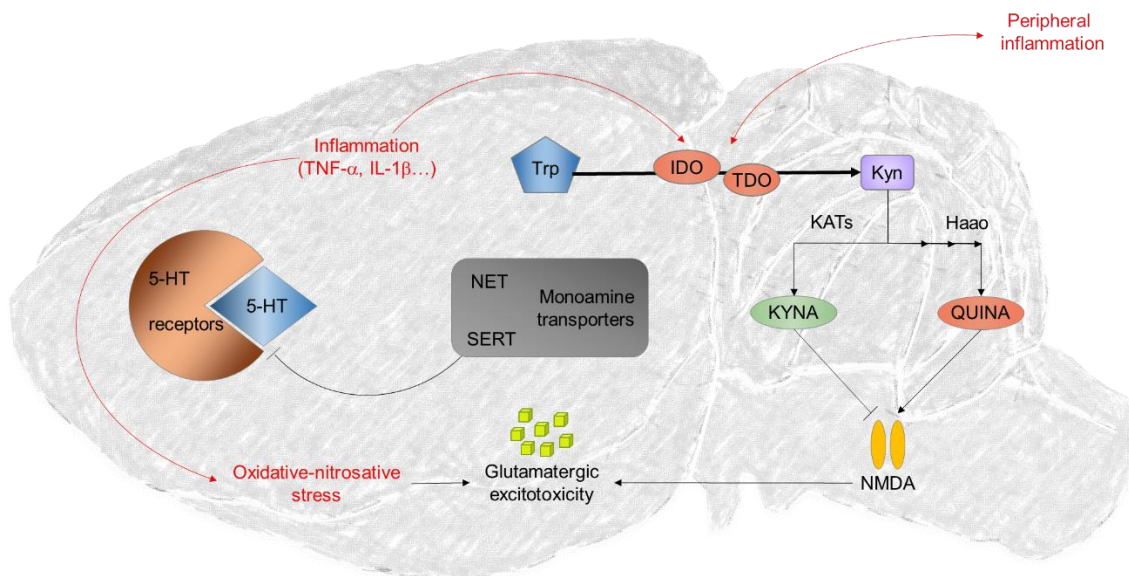


Figura 27. Activación de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la ruta de las kinureninas y su conexión con los sistemas de neurotransmisión. 5-HT: serotonina; NET: transportador de noradrenalina; SERT: transportador de serotonina; TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleuquina; Trp: triptófano; TDO: triptófano 2,3-dioxigenasa; Kyn: kinurenina; KAT: kinurenina aminotransferasa; Haao: 3-hidroxiantranilato 2,3-dioxigenasa; NMDA: N-metil-D-aspartato.

El estado inflamatorio generalizado inducido por el estrés con el que cursa la depresión puede suponer la activación de la IDO, enzima clave en la síntesis de kinurenina a partir de triptófano (Babcock y Carlin, 2000, O' Connor et al., 2009). Con una fuerte expresión en las células dendríticas (Fallarino et al., 2002), la IDO articula respuestas inmunes innatas frente a patógenos y su inducción se ha asociado con la caída en los niveles de triptófano en plasma registrada en enfermedades inflamatorias o los síntomas depresivos tras tratamiento con citoquinas (Capuron et al., 2002). Ello demuestra su potencial para afectar a la biodisponibilidad de triptófano en la síntesis de serotonina y podría ocurrir en el SNC donde se expresa ampliamente la IDO en neuronas, microglía y astrocitos (Guillemin et al., 2005). Este primer paso desde el triptófano pueden llevarlo a cabo también la isoforma 2 de la IDO (IDO-2) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). La IDO-2 posee una distribución celular diferente (Ball et al., 2007) y su función es aún desconocida aunque se sabe que es enzimáticamente menos activa que la IDO-1 (Pantouris et al., 2014). Por su parte, la TDO se expresa mayoritariamente en el hígado pero también en astrocitos y neuronas (Miller et al., 2004) y puede inducirse por GCs, aunque en circunstancias basales la regula el propio triptófano, por lo que su expresión es relativamente estable (Civen y Knox, 1960).

Sin embargo, el efecto sobre el triptófano descrito en la periferia no parece tener correlación a nivel del líquido cefalorraquídeo, pero sí lo tiene en los metabolitos derivados de la kinurenina (Raison et al., 2010) y este hecho abrió la puerta a la profundización en sus propiedades. La kinurenina por sí misma es inactiva y su conversión depende del tipo celular nervioso donde se haya producido o transportado. Compuestos neurotóxicos (3-hidroxikinurenina y ácido quinolínico) por su habilidad para generar estrés oxidativo y actuar como agonistas del receptor NMDA son generados en la microglía. Del lado neuroprotector, los astrocitos producen ácido kinurénico, antagonista NMDA y α -7 nicotínico, y las neuronas ácido picolínico (Dantzer et al., 2011) (Figura 28). El equilibrio puede ser modulado por factores endógenos que, a su vez, son susceptibles al entorno inflamatorio tanto central como periférico (Schwarcz et al., 2012) con las consiguientes implicaciones en patologías psiquiátricas.

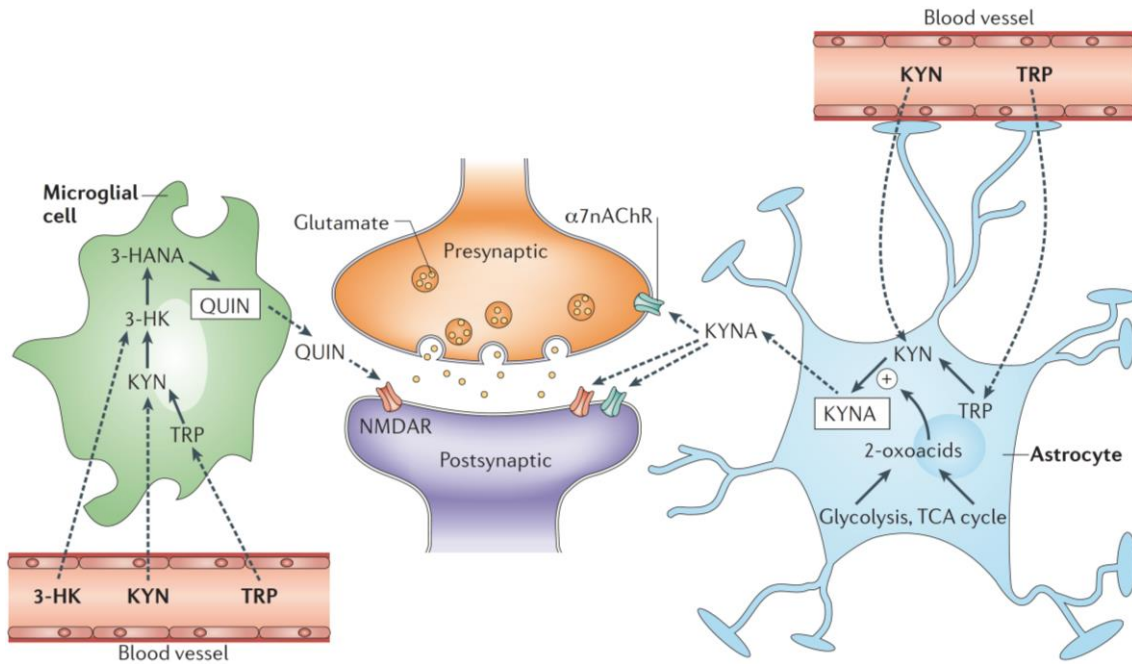


Figura 28. La vía de las kinureninas en el cerebro: implicación de los astrocitos y la microglía (Schwarcz et al., 2012). 3-HK: 3-hidroxicinurenina; KYN: kinurenina; TRP: triptófano; 3-HANA: ácido 3-hidroxiantranílico; QUIN: ácido quinolínico; KYNA: ácido kinurénico; α7nAChR: receptor de acetilcolina α7 nicotínico; NMDAR: receptor NMDA; TCA: ácido tricarbóxico.

La inducción inflamatoria de laIDO por agentes patológicos a nivel periférico no es la única manera por la que el microbioma puede modular la vía de las kinureninas (O' Connor et al., 2009, Li et al., 2011b). Dada la importancia de la comunicación periferia-SNC y los sistemas de transporte existentes, hay que tomar en consideración la actividad bacteriana como posible responsable en la síntesis o degradación de estos compuestos, sumada a su capacidad previamente mencionada de modificar los niveles de serotonina (Yano et al., 2015). El triptófano es un aminoácido esencial en humanos y la mayoría de mamíferos por lo que la dieta limita sus niveles, sin embargo, especies bacterianas son capaces de sintetizarlo *de novo* (Marinoni et al., 2008). Curiosamente, diversas bacterias muestran cierto perfil favorable al ácido quinolínico al probar su capacidad para sintetizarlo (Sakuraba et al., 2005, Marinoni et al., 2008, Reichmann et al., 2015), favorecer su producción al utilizar rutas alternativas (Garavaglia et al., 2009, Liu et al., 2010) y poder degradar el ácido kinurénico (Taniuchi y Hayaishi, 1963). Estamos muy lejos de asegurar la implicación de este metabolismo bacteriano del triptófano en presencia de enfermedad o, incluso, en su influencia en el organismo en condiciones basales, pero indudablemente es un factor más a tener en cuenta a la hora de explorar esta vía.

6. Hipótesis y objetivos

Basándonos en los últimos hallazgos y el conocimiento actual sobre la posible fisiopatología de los trastornos depresivos previamente descritos, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“Los mecanismos inflamatorios desencadenados por el estrés juegan un papel en la fisiopatología de la depresión a través de vías de inmunidad innata que involucran liberación de productos bacterianos de la microbiota intestinal y señalización intra e intercelular en cerebro a través de MAPKs, factores antioxidantes y alteraciones en el metabolismo de la serotonina y la vía de las kinureninas (Figura 29)”

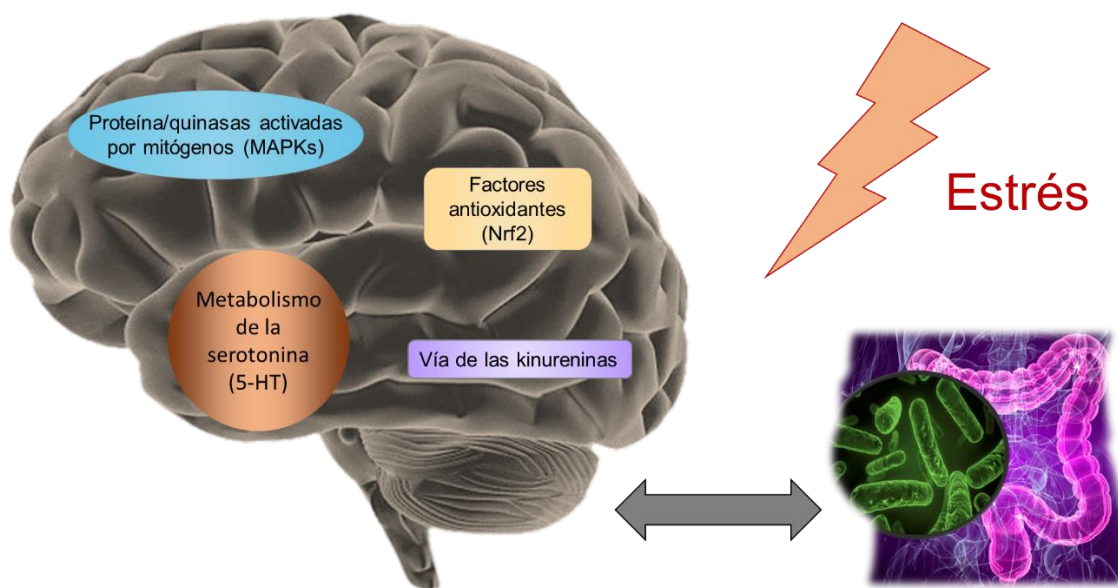


Figura 29. Hipótesis de trabajo

Se dispusieron los siguientes objetivos generales, desgranados en objetivos específicos, con el fin de constatar la veracidad de esta hipótesis.

6.1. Objetivos generales

1. Evaluar la posible afectación del mecanismo neuroprotector antioxidante articulado por Nrf2 bajo condiciones de estrés en la corteza prefrontal y el hipocampo de rata.
2. Estudiar el papel de la IDO y los metabolitos de la kinurenina en situaciones de estrés e inflamación en su relación con el sistema de transmisión serotoninérgico y sus implicaciones comportamentales.
3. Evaluar el efecto de 3 fármacos antidepresivos de diferentes mecanismos de acción utilizados en clínica sobre los mediadores relacionados con la inflamación y sus consecuencias.

4. Determinar la implicación de las MAPKs en la neuroinflamación registrada en la corteza prefrontal inducida por estrés en un modelo de depresión en rata.
5. Investigar el papel de la traslocación bacteriana en las alteraciones potencialmente nocivas que provoca la exposición crónica a estímulos estresantes y su implicación en los trastornos depresivos.
6. Explorar las posibles implicaciones comportamentales en depresión de parámetros relacionados con la inflamación mediante una aproximación a través del *sickness behavior* inducido por la administración de LPS en ratones.
7. Evaluar la posible traslacionalidad de la activación de TLR-4 como potencial diana terapéutica ante resistencias al tratamiento farmacológico comprobando si los parámetros afectados en el modelo animal aparecen también modificados en el cerebro de pacientes depresivos tras suicidio.

6.2. Objetivos específicos

1. Analizar el impacto del modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS) en la expresión de las MAPK, la ruta de Nrf2, la vía de las kinureninas y el sistema de neurotransmisión de serotonina.
2. Estudiar los efectos sobre el CMS en rata tras la administración de un representante de cada uno de los principales grupos de antidepresivos más utilizados en clínica (ATC, ISRS e IRSN).
3. Utilizar la descontaminación intestinal con antibióticos en rata como aproximación experimental para determinar la participación de bacterias de la microbiota en la neuroinflamación y el comportamiento de tipo depresivo.
4. Explorar las implicaciones de la activación inflamatoria de laIDO sobre el comportamiento en modelos de ratón transgénico tras el estímulo inflamatorio con LPS y evaluar la respuesta tras el bloqueo farmacológico de su transporte en la BHE.
5. Analizar el papel de moléculas reguladoras de procesos potencialmente vinculados a la anhedonia (FGF-21) e involucradas en el transporte de kinurenina y triptófano (L-leucina) sobre el *sickness behavior* producido por un modelo de neuroinflamación por administración de LPS.
6. Estudiar parámetros inflamatorios relacionados con las alteraciones por la activación de TLR-4 descritas en el CMS en cerebros humanos *post mortem* de pacientes con depresión y estudiar su posible correlación con la presencia o ausencia de tratamiento antidepresivo.

III) Material y métodos

1. Modelos y diseño experimental

1.1. Chronic mild stress (CMS) en rata

Se utilizaron ratas adultas jóvenes Wistar Hannover (HsdRccHan:Wist) macho (no consanguíneas) con un peso inicial entre 200 y 225 gramos. Estabuladas en jaulas individuales bajo condiciones estándar de humedad y temperatura, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (encendido a las 8 am) y agua y comida *ad libitum*, se mantuvieron bajo condiciones constantes durante los 7 días previos al inicio del estrés. Todos los protocolos experimentales siguieron las directrices del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo a la legislación española (RD 53/2013, de 1 de febrero) y europea vigentes (2010/63/EU) (se adjuntan los permisos necesarios al final de este bloque II). Con el objetivo de minimizar al máximo el sufrimiento animal y el número de animales empleado, se aplicaron los principios de las tres R (reducir, reemplazar y refinar) siempre que fuera posible.

Como modelo de depresión se llevó a cabo una adaptación del propuesto por Willner (Willner et al., 1987) y conocido como “*chronic mild stress*” (CMS). Se trata de un estrés crónico de tipo mixto físico-psicológico, que resulta impredecible, inescapable e incontrolable para los animales y que deriva en la inducción de un comportamiento de tipo depresivo además de compartir alteraciones bioquímicas y estructurales relacionadas con esta enfermedad psiquiátrica. Estas características le confieren al modelo robustez y potencial suficientes para las aproximaciones experimentales al estudio de la depresión tal y como refrendan numerosos estudios que respaldan su validez de contenido, predictiva y de constructo (Willner, 2016a, b):

- 1. Validez de contenido:** el CMS induce en los animales muchos de los síntomas típicos de la depresión humana, validados a través de los test de comportamiento correspondientes, como la anhedonia, la apatía y falta de motivación, la ansiedad o la pérdida de peso, incluso alteraciones bioquímicas como la disminución en la biodisponibilidad de serotonina, marcadores inflamatorios en plasma y el incremento de la principal hormona del estrés (en humanos el cortisol, en roedores la corticosterona).
- 2. Validez predictiva:** los principales tratamientos farmacológicos utilizados en humanos frente a la depresión (antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina-noradrenalina) son capaces de revertir o atenuar las modificaciones comportamentales provocadas tras el CMS.

3. Validez de constructo: el estrés crónico se ha identificado como uno de los principales desencadenantes de los procesos de tipo depresivo (Leonard y Song, 1996). La etiología de la enfermedad se ve refrendada así en este modelo.

Por todas estas razones, el CMS representa en la fecha de realización de esta Tesis Doctoral el mejor modelo animal contrastado y validado para realizar una aproximación experimental al estudio de la depresión gracias a su etiología, cambios inducidos tanto comportamentales como bioquímicos y estructurales en el animal y los efectos positivos de los fármacos antidepresivos disponibles y utilizados en la actualidad sobre el fenotipo de tipo depresivo provocado por el CMS.

1.1.1 Protocolo

Como ya hemos indicado previamente, el protocolo empleado se trata de una modificación del original empleado por (Willner et al., 1987). La duración total del estrés crónico fue de 21 días tras comprobar en estudios previos de nuestro grupo de investigación que era suficiente para inducir un comportamiento de tipo depresivo y alteraciones bioquímicas relacionadas con la depresión (Gárate et al., 2011b, Bravo et al., 2012). Cada animal fue estabulado individualmente y sometido a dos estresores diferentes diarios cambiados cada 12 horas con dos mañanas de descanso a la semana siguiendo así un patrón irregular que resultase impredecible para los animales. La aplicación de los estresores a lo largo de cada una de las tres semanas queda resumida en la Tabla 5.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
8 am	A visita a B	Serrín húmedo	B visita a A	Privación de comida y bebida	Jaula inclinada	Descanso	Descanso
8 pm	Iluminación intermitente	Privación de comida y bebida	Jaula inclinada	Serrín húmedo	Luz estroboscópica	Iluminación intermitente	Privación de comida y bebida

Tabla 5. Protocolo de realización del chronic mild stress (CMS)

Los diferentes estresores empleados constituyen un estrés de intensidad moderada y la descripción de la utilización de cada uno es la siguiente:

- *Emparejar animales:* representa el paradigma de invasor-huésped. Se emparejan, además, tras un período de privación de comida y bebida, lo cual supone un estrés adicional para los animales.
- *Iluminación intermitente:* cambio de ciclo luz/oscuridad cada 2 horas.

- *Serrín húmedo*: humedecer el serrín con 350 mL de agua. Al finalizar el estrés, se cambió por serrín nuevo.
- *Privación de comida y bebida*: retirada del libre acceso a comida y bebida.
- *Jaula inclinada*: inclinación de las jaulas en un ángulo de 45 grados.
- *Luz estroboscópica*: colocación de un foco de leds con una frecuencia de iluminación de 150 flashes/minuto.

1.1.2 Diseños experimentales

a Tratamiento con antidepresivos

Con el objetivo de estudiar los mecanismos de acción de los fármacos antidepresivos convencionales utilizados en clínica y su posible modulación sobre los parámetros bioquímicos modificados por el CMS los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos experimentales. Tres de ellos incluían la administración diaria de un representante de cada una de las tres principales familias de antidepresivos entre los días 14 y 21 del CMS. Los otros dos fueron grupos control y CMS inyectados diariamente con suero salino intraperitoneal (i.p.), usado como vehículo para los fármacos, diariamente durante la semana previa al sacrificio para servir como controles de la forma de administración del antidepresivo.

Los antidepresivos seleccionados para el estudio fueron: clorhidrato de desipramina 20 mg/kg i.p. (Sigma-Aldrich) como antidepresivo tricíclico, oxalato de escitalopram 15 mg/kg i.p. (Sigma-Aldrich) como inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRSs) y, dentro de los inhibidores duales de la recaptación de serotonina y noradrenalina (ISRNSs), el clorhidrato de duloxetina 15 mg/kg i.p. (Sigma-Aldrich). La elección de estos antidepresivos se basó en la representación de los tres principales grupos de fármacos utilizados en clínica para tratar la depresión y, dentro de ellos, aquellos que más auge han tomado en los últimos años a la hora de prescribirse en nuestro país según el Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS, 2014). Las dosis empleadas habían mostrado tener actividad antidepresiva en estudios previamente publicados (Rénéric y Lucki, 1998, Kuøemider et al., 2007).

El diseño experimental teniendo en cuenta todas estas consideraciones resulta en un total de 7 grupos y queda reflejado en la Figura 30. Dado que la administración del vehículo salino no arrojó diferencias para ninguno de los parámetros analizados respecto a los grupos equivalentes sin la inyección, ambos se encuentran agrupados en todas las gráficas para simplificar los resultados.

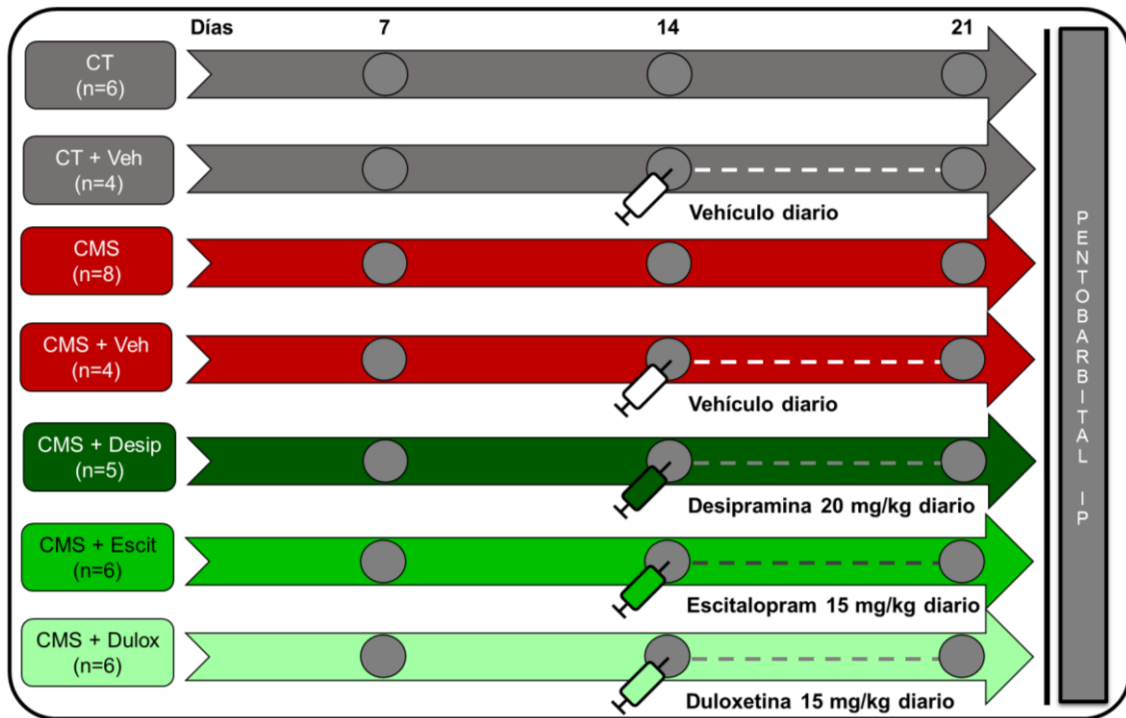


Figura 30. Diseño experimental *chronic mild stress* (CMS) y administración de antidepresivos. CT: control; Veh: vehículo; Desip: desipramina; Escit: escitalopram; Dulox: duloxetina; IP: intraperitoneal.

b Descontaminación intestinal con antibióticos

Para evaluar los posibles efectos de las bacterias intestinales en los cambios bioquímicos y comportamentales inducidos por el CMS, se realizaron dos grupos experimentales sometidos a un tratamiento antibiótico para evitar la traslocación bacteriana (Control+ATB y CMS+ATB). Estreptomocina sulfato 2mg/ml (Sigma) y penicilina G 1500 U/ml (Sigma) se administraron disueltos en el agua de bebida desde el día 1 del experimento hasta el 21 con acceso libre a la misma. Además, los biberones se protegieron con papel de aluminio para evitar la posible fotodegradación de la penicilina G en disolución, renovándose además la solución antibiótica cada 72 horas. Este protocolo ha sido utilizado previamente (Ando et al., 2000, Caso et al., 2009, Gárate et al., 2011b) demostrando su eficacia para reducir la microbiota intestinal endógena en ratas sin tener efectos antiinflamatorios ni neuroprotectores en el sistema nervioso central.

Se establecieron de forma aleatoria 4 grupos experimentales para los estudios de los posibles efectos de la traslocación bacteriana en el modelo de CMS (Figura 31). A la hora de exponer los resultados, los grupos control (CT) y control con antibiótico (CT+ATB) se expresan agrupados para simplificar los mismos.

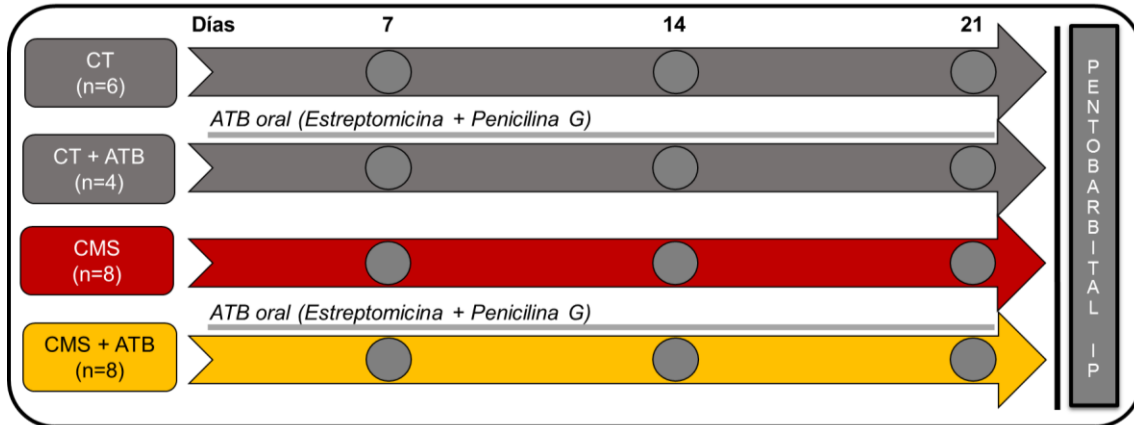


Figura 31. Diseño experimental chronic mild stress (CMS) y administración de antibióticos (ATB). CT: control; ATB: antibiótico; IP: intraperitoneal.

c Curso temporal del CMS

A fin de obtener información acerca de la evolución temporal de los cambios inducidos por el CMS, se realizó un estudio piloto con grupos experimentales que siguieron el protocolo durante 7, 14 y 21 días, tal como recoge la Figura 32. Los resultados del mismo no se incluyen en esta Tesis Doctoral debido a la escasa potencia estadística consecuencia del reducido tamaño muestral por grupo en aras de respetar las tres R (reemplazar, reducir, refinar).

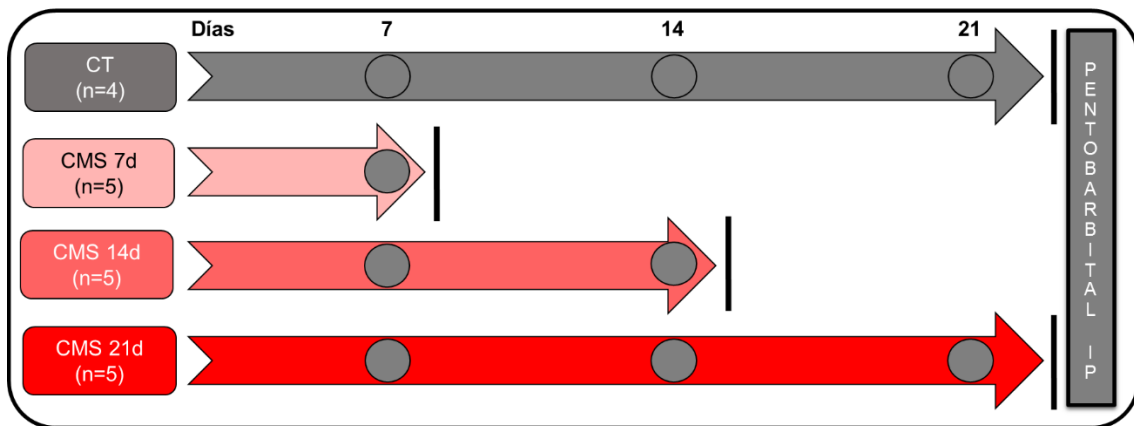


Figura 32. Diseño experimental curso temporal chronic mild stress (CMS). CT: control; d: días; IP: intraperitoneal.

1.2. Modelo neuroinflamatorio por inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratón

Estos experimentos se realizaron durante una estancia de 3 meses en el MD Anderson Cancer Center en Houston (Texas, EEUU) bajo la supervisión del profesor Robert Dantzer y gracias a la subvención concedida por la Fundación Boehringer Ingelheim, siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC). Con el objetivo de

minimizar al máximo el sufrimiento animal y el número de animales empleado, se aplicaron los principios de las tres R (reducir, reutilizar y reciclar) siempre que fuera posible.

Se utilizaron ratones C57BL/6 (consanguíneos) y *knockout* para la indolamina 2,3-dioxigenasa IDO1-/- adultos jóvenes (IDO -/-; B6.129-Ido1^{tm1Alm}/J, Jax Strain #005867) con un peso inicial de 20-25 g. Estabulados en jaulas de hasta 4 animales cada una bajo condiciones estándar de humedad y temperatura, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas normal o invertido según el experimento realizado y agua y comida *ad libitum*, se mantuvieron bajo condiciones constantes durante los 14 días previos al inicio de los experimentos. Al inicio del entrenamiento para los diferentes test comportamentales se estabularon individualmente y se mantuvieron hasta alcanzar la línea base estable para cada test, siempre con un mínimo de 8 días antes del inicio del experimento.

Como modelo neuroinflamatorio se utilizó la administración de LPS (Sigma-Aldrich, EEUU), capaz de inducir un comportamiento enfermizo o *sickness-behavior* en los animales (Dantzer et al., 2008). El LPS se disolvió en tampón fosfato salino (PBS) hasta conseguir una dosis mínima de 0,33 mg/kg, suficiente para sostener el *sickness behavior* durante al menos 24 horas (Godbout et al., 2008, Vichaya et al., 2014). Las dosis empleadas en los protocolos fueron de 0,33 mg/kg y de 0,83 mg/kg. Se registró el peso y el consumo de comida durante las 48 horas posteriores para comprobar que la administración de LPS había sido adecuada.

1.2.1 Diseños experimentales

a Bloqueo de la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO): administración oral de L-leucina y utilización de ratones transgénicos *knockout* para la IDO-1 (IDO1-/-)

La L-leucina y el triptófano utilizan para atravesar la barrera hematoencefálica el transportador de aminoácidos grandes 1(LAT-1) (Kanai et al., 1998) al igual que la kinurenina (Fukui et al., 1991a). Por ello, se hipotetizó que si se incrementaba la concentración de L-leucina en plasma competiría con el triptófano y la kinurenina por estos transportadores, reduciendo el flujo de los mismos al cerebro y disminuyendo la activación de la vía de las kinureninas que se produce en situaciones neuroinflamatorias, contribuyendo a minimizar los efectos del *sickness behavior*.

Con este fin, se inyectaron 0,33 mg/kg i.p. de LPS a todos los ratones macho (n=16) para inducir la neuroinflamación y se realizaron dos administraciones intragástricas de L-leucina a las 12 y 20 horas tras el LPS a la mitad de ellos, recibiendo la otra mitad sólo agua. El motivo para estas dos administraciones fue mantener una concentración de L-leucina elevada alrededor de las 24 horas, momento en el que se había descrito el incremento en la expresión de la IDO y la

manifestación del *sickness behavior* (Martin et al., 2014). La dosis de L-leucina disuelta en agua fue de 400mg/kg por haber demostrado previamente su capacidad para señalizar en el cerebro (Zampieri et al., 2013).

El diseño experimental con los dos grupos descritos se refleja en la Figura 33.

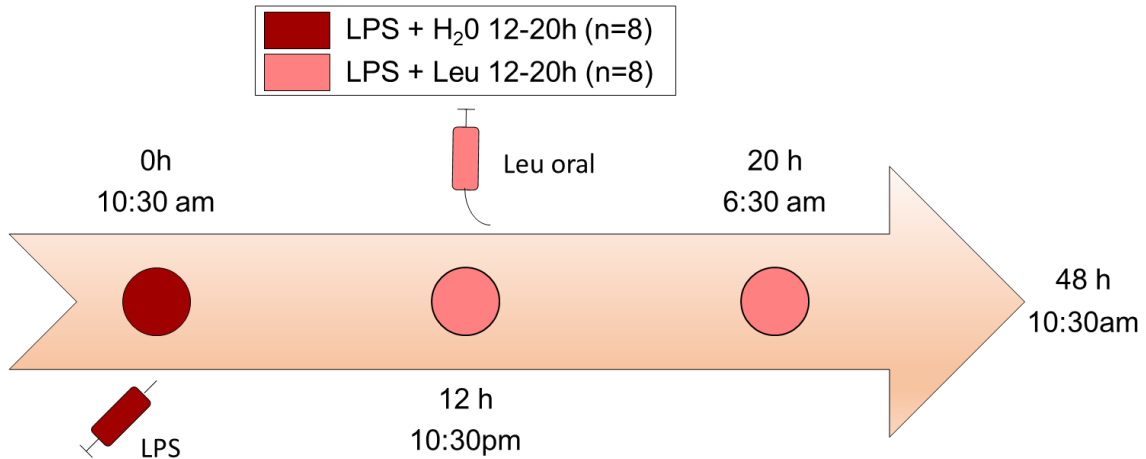


Figura 33. *Diseño experimental administración de lipopolisacárido (LPS) y L-leucina (Leu) oral.*

Para asegurar que los efectos que observásemos se debieran a una ausencia de actividad de laIDO, se llevó a cabo un diseño paralelo con la misma administración de LPS de 0,33 mg/kg en ratones hembra (debido a disponibilidad) (n=13) C57/Bl6 y *knockout* IDO1^{-/-}. (Figura 34).

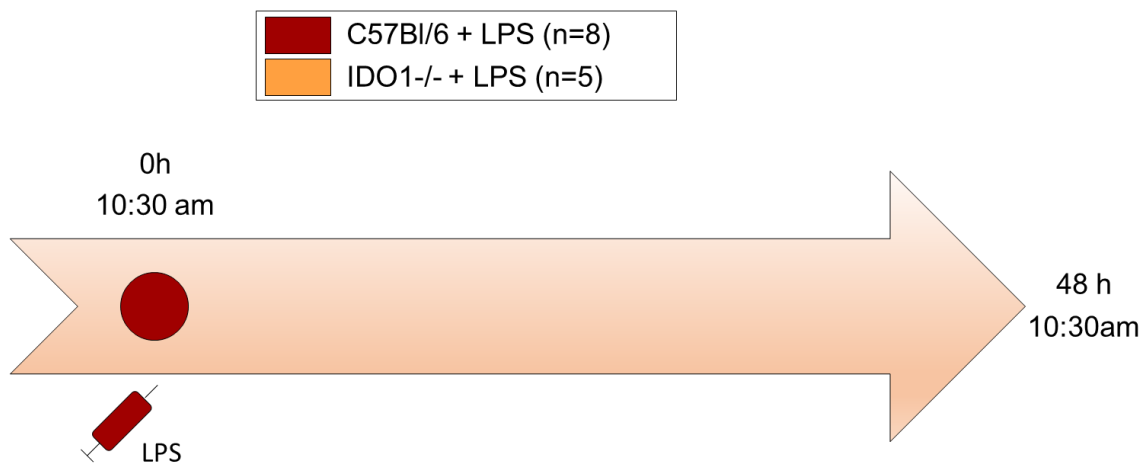


Figura 34. *Diseño experimental administración de lipopolisacárido (LPS) en ratones C57Bl/6 y knockout para la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1^{-/-}).*

b Bloqueo periférico de la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21)

El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) actúa en el núcleo paraventricular del hipotálamo para suprimir la ingesta de soluciones azucaradas y la preferencia por el dulce (von Holstein-Rathlou et al., 2016). Además, estudios previos revelaron un incremento de la

expresión del mismo en el hígado a las 12 horas tras la administración de 0,83 mg/kg de LPS a ratones macho en ciclo de luz invertido (Laumet et. al, en preparación), utilizando PBS como vehículo. Con estos indicios, se decidió replicar este experimento con el objetivo de analizar el comportamiento añadiendo dos grupos experimentales para tratar de neutralizar la señalización del FGF-21 periféricamente inyectando un anticuerpo antiFGF-21 de ratón (12180 AIS, China), con inmunoglobulina G (IgG) como vehículo. Las dosis y tiempos de administración del mismo se decidieron en base a la literatura para asegurar el bloqueo completo del FGF-21 (Li et al., 2012), con cuatro grupos experimentales y un desarrollo como muestra la Figura 35.

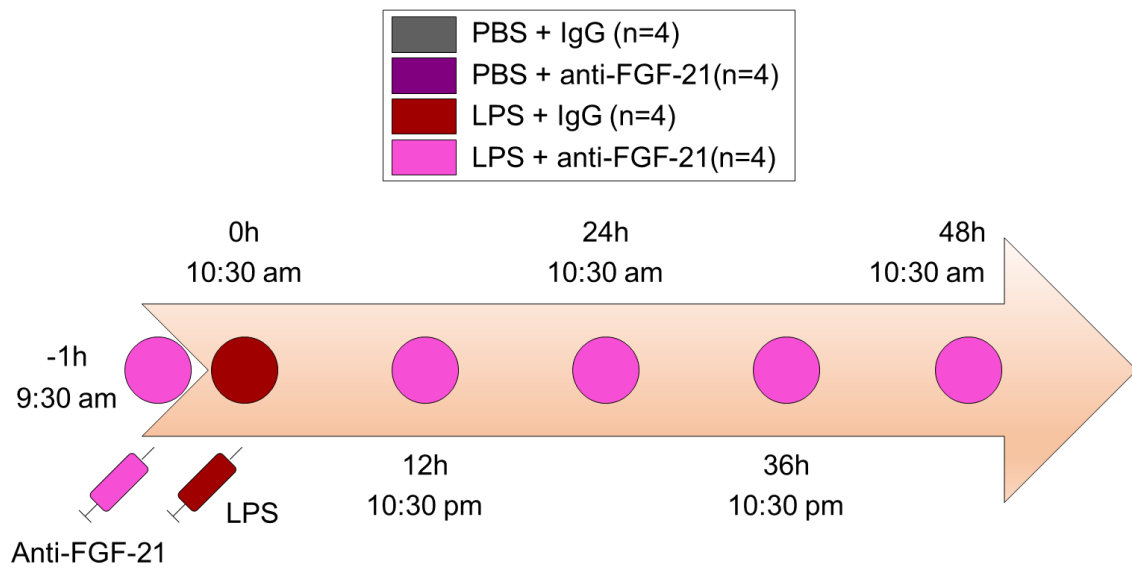


Figura 35. Diseño experimental administración de lipopolisacárido (LPS) y neutralización de la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21). PBS: tampón fosfato salino; IgG: inmunoglobulina G; anti: anticuerpo.

1.3. Cerebros humanos *post-mortem*

Las muestras de cerebros humanos se obtuvieron de autopsias (Instituto Vasco de Medicina Legal, Bilbao, España), en colaboración con el grupo de Javier Meana de la Universidad del País Vasco y el Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (UPV/CIBERSAM), cumpliendo con la legalidad vigente para los estudios *post-mortem* en humanos (se adjuntan los permisos necesarios al final de este bloque II). Tras una búsqueda retrospectiva en sus historias médicas, 30 individuos diagnosticados con trastorno depresivo mayor (MDD), según el DSM-IV, se emparejaron por sexo y edad (± 4 años) con sujetos sanos en un diseño por pares. Los criterios de selección de los sujetos control fueron ausencia de trastornos psiquiátricos y de drogas de abuso. Se seleccionaron preferentemente las muertes repentinas e inesperadas para evitar posibles variables confusoras de carácter agónico.

Se realizó un análisis toxicológico en la sangre para determinar la presencia de antidepresivos, drogas y etanol. Acorde a la presencia de trazas de antidepresivos, el grupo de los individuos con MDD se subdividió en no tratados con antidepresivo (MDD sin tto.) y tratados con antidepresivo (MDD con tto.), quedando la distribución de grupos experimentales como se muestra en la Figura 36.

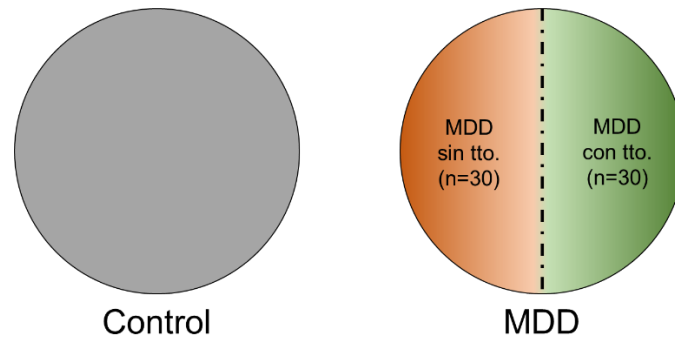


Figura 36. *Grupos experimentales en el estudio de cerebros humanos*

Las características demográficas completas pareadas se muestran en la Tabla 6. Previo al análisis estadístico, se realizaron análisis de correlaciones entre las variables para descartar factores de confusión en ellas que se muestran en el apartado de análisis estadístico (Tabla 11)

Pacientes MDD sin tratamiento (n=15) y sus controles pareados (n=15)										
Caso/Control (MDD/CT)	Sexo (M/F)	Edad (años)	RPM (horas)	Almacenaje (meses)	IMC	NIR	Causa/Mecanismo de la muerte	pH cerebral	Antidepresivos en sangre	Otros fármacos en sangre
MDD1	M	30	4	132	21	8,0	Suicidio/Salto	7,09		THC
CT1	M	30	11	134	25	8,0	Accidente/Electrocución	7,10		
MDD 2	M	31	23	82	23	9,0	Suicidio/Ahorcamiento	6,33		ETH (1,02g/l), BZD
CT2	M	23	17	105	28	7,1	Accidente/Electrocución	N/A		
MDD 3	M	43	15	100	31	N/A	Suicidio/Tren	N/A		
CT3	M	42	27	198	24	N/A	Accidente/AT	N/A		
MDD 4	M	35	13	153	23	N/A	Suicidio/Ahorcamiento	N/A		
CT4	M	33	4	111	31	9,1	Accidente/AT	N/A		
MDD 5	F	26	26	235	19	N/A	Suicidio/Salto	N/A		
CT5	F	28	55	237	23	N/A	Accidente/AT	N/A		
MDD 6	M	48	32	239	24	N/A	Suicidio/Ahorcamiento	N/A		
CT6	M	45	30	238	23	6,3	Accidente/AT	6,82		ETH (3,09g/l)
MDD 7	M	59	31	195	18	N/A	Suicidio/Ahorcamiento	N/A		ETH (0,99g/l)
CT7	M	58	20	235	25	6,2	Accidente/Caída	6,74		
MDD 8	F	52	18	74	26	8,1	Suicidio/Salto	6,2		
CT8	F	50	11	79	24	8,2	Natural/PCR	6,21		
MDD 9	M	48	15	106	30	7,9	Natural/PCR	N/A		ETH (3,20g/l)
CT9	M	47	15	56	30	7,4	Accidente/AT	6,15		ETH (1,55g/l)
MDD 10	M	56	22	69	23	N/A	Suicidio/Arma de fuego	6,19		ETH (0,60g/l)
CT10	M	54	24	63	27	N/A	Accidente/AT	6,33		
MDD 11	F	39	17	70	24	7,2	Natural/PCR	6,35		
CT11	F	38	22	58	22	7,6	Accidente/AT	6,44		ETH (1,42g/l)
MDD 12	M	50	24	68	23	N/A	Suicidio/Arma de fuego	6,8		
CT12	M	51	18	51	30	N/A	Accidente/AT	6,2		BZD
MDD 13	M	34	18	150	27	9,0	Suicidio/Salto	N/A		ETH (1,69g/l)
CT13	M	36	18	152	30	9,2	Accidente/Atropello	N/A		AMP
MDD 14	M	42	16	49	23	N/A	Suicidio/Ahogamiento	6,3		
CT14	M	41	14	73	24	N/A	Natural/Ataque cardiaco	6,81		AMP, THC
MDD 15	M	32	16	97	25	7,1	Suicidio/Salto	6,33		ETH (0,96g/l)
CT15	M	31	13	111	35	8,2	Accidente/AT	N/A		
Grupo MDD	12M/3F	42±3	19±2	121±16	24±1	8,0±0,3		6,5±0,1		
Grupo CT	12M/3F	41±3	20±3	127±18	27±1	7,7±0,3		6,5±0,1		

Pacientes MDD con tratamiento (n=15) y sus controles pareados (n=15)										
Caso/Control (MDD/CT)	Sexo (M/F)	Edad (años)	RPM (horas)	Almacenaje (meses)	IMC	NIR	Causa/Mecanismo de la muerte	pH cerebral	Antidepresivos en sangre	Otros fármacos en sangre
MDD 16	M	37	3	49	22	7,6	Suicidio/Salto	6,56	MIR, PAR	BZD
CT16	M	36	23	63	33	8,2	Accidente/Caída	6,42		
MDD 17	M	61	5	148	30	N/A	Natural/PCR	N/A	FLU	
CT17	M	58	16	151	30	N/A	Accidente/AT	N/A		ETH (0,77g/l)
MDD 18	M	45	6	81	26	8,1	Suicidio/Salto	6,48	MIR	BZD
CT18	M	43	10	142	23	7,1	Accidente/AT	N/A		ETH (2,50g/l)

MDD 19	F	49	18	92	22	8,0	Suicidio/Ahogamiento	6,56	FLU	ETH (0,51g/l)
CT19	F	45	12	81	31	7,9	Natural/Ataque cardiaco	6,37	CIT	BZD
MDD 20	M	43	34	105	23	8,4	Suicidio/Ahorcamiento	N/A		
CT20	M	44	21	104	31	8,5	Accidente/AT	N/A		
MDD 21	M	35	20	91	25	8,2	Suicidio/Arma de fuego	5,98	FLU	BZD, COC, ETH (0,74g/l)
CT21	M	32	28	139	25	8,0	Accidente/AT	6,83	CIT	
MDD 22	M	47	18	105	21	N/A	Suicidio/Ahorcamiento	N/A		
CT22	M	47	39	132	29	N/A	Accidente/AT	N/A	VEN, CIT	ETH (1,16g/l)
MDD 23	F	34	6	131	21	N/A	Suicidio/Sobredosis	N/A		BZD, CLZ, TOP
CT23	F	32	18	133	21	N/A	Accidente/AT	N/A		ETH (1,21g/l)
MDD 24	F	74	22	107	25	8	Suicidio/Salto	5,70	SER	TRA
CT24	F	75	39	190	28	N/A	Accidente/AT	N/A		
MDD 25	M	34	10	63	26	N/A	Suicidio/Ahorcamiento	6,50	CMI	ETH (2,20g/l)
CT25	M	37	14	132	23	N/A	Accidente/AT	N/A		
MDD 26	F	60	17	65	22	N/A	Suicidio/Salto	6,49	VEN	
CT26	F	57	14	96	23	N/A	Natural/PCR	N/A		
MDD 27	M	50	23	93	24	8,2	Suicidio/Arma de fuego	6,23	VEN	ETH (1,04g/l)
CT27	M	51	13	58	29	8,1	Accidente/AT	6,31		ETH (2,13g/l)
MDD 28	M	60	18	120	28	8,0	Suicidio/Ahorcamiento	N/A	FLU	BZD, OLZ
CT28	M	61	23	152	27	8,0	Accidente/AT	7		ETH (0,72g/l)
MDD29	M	70	16	129	18	N/A	Suicidio/Ahorcamiento	N/A	MIR, VEN	
CT29	M	71	21	139	28	N/A	Natural/PCR	N/A		
MDD30	F	70	14	139	31	N/A	Natural/PCR	N/A	CIT	
CT30	F	70	7	137	34	N/A	Accidente/AT	N/A		
Grupo MDD	10M/5F	51±4	15±2	101±8	25±1	8,0±0,1		6,3±0,1		
Grupo CT	10M/5F	51±4	20±3	123±9	27±1	8,0±0,2		6,6±0,1		
Pacientes MDD sin tratamiento y con tratamiento (n=30) y sus controles pareados (n=30)										
Grupo MDD	22M/8F	46±2	17±1	111±9	24±1	8,1±0,1		6,4±0,1		
Grupo CT	22M/8F	46±2	20±2	125±10	27±1	7,8±0,2		6,6±0,1		

Tabla 6. Características demográficas de los sujetos del estudio: sexo, edad, retraso post mortem (RPM), tiempo de almacenaje, índice de masa corporal (IMC), número de integridad del ácido ribonucleico (NIR)), causa de la muerte/mecanismo, pH cerebral y análisis toxicológicos de los pacientes con trastorno depresivo mayor (MDD) y sus controles pareados (CT). Los valores de los grupos son la media±error estándar de la media (SEM). M: masculino; F: femenino; PCR: parada cardiorrespiratoria; AT: accidente de tráfico; N/A: no disponible; AMP: amfetamina; BZD: benzodicepinas sin especificar o sus metabolitos; CIT: citalopram; CLZ: clonazapina; CMI: clomipramina; COC: cocaína; ETH: etanol; FLU: fluoxetina; MIR: mirtazapina; PAR: paroxetina; SER: sertralina; THC: tetrahidrocannabinol; TOP: topiramato; TRA: tramadol; VEN: ventafaxina

2. Estudios comportamentales

Todos los estudios comportamentales se llevaron a cabo en condiciones controladas de humedad, temperatura, iluminación y acústica y minimizando lo máximo posible el tiempo del investigador en la sala de comportamiento durante la realización de los mismos. Los distintos comportamientos a estudiar fueron grabados utilizando una se grabó con una videocámara, realizando posteriormente el análisis de los vídeos con el investigador ajeno a las condiciones del experimento.

2.1. Estudios comportamentales en rata

La siguiente tabla resumen recoge el despliegue temporal de los test, realizados tras los 21 días de CMS, en dos sets diferentes de animales para evitar someterlos a un estrés excesivo (Tabla 7).

	Día 22		Día 23	
SET 1	Mañana	SPT	Mañana	mFST
	Tarde	Entrenamiento mFST	Tarde	
SET 2	Día 22		Día 23	
	Mañana		Mañana	EPM
	Tarde	ST	Tarde	

Tabla 7. Despliegue temporal de los test comportamentales tras el CMS. SPT: test de preferencia por la sacarosa; mFST: test de natación forzada modificado; ST: “splash” test; EPM: laberinto en cruz elevada

2.1.1 Test de natación forzada modificado (mFST)

Tras los 21 días de estrés, al día siguiente se comenzó a realizar el test de natación forzada modificado basado en el método descrito por Porsolt (Porsolt et al., 1977). Los recipientes utilizados fueron cilindros de polimetilmetacrilato de 40 cm de altura y 18 cm de diámetro llenos de agua a 25 °C hasta aproximadamente 30 cm de tal manera que los animales no pudieran tocar el fondo. El test se desarrolló de manera individual y en dos sesiones: un pre-test a modo de entrenamiento donde cada rata estuvo nadando durante 15 minutos y, 24 horas más tarde, el test propiamente dicho durante 5 minutos. Esta sesión fue grabada con una videocámara para el posterior análisis de los parámetros que definen la prueba comportamental: el parámetro clásicamente determinado en el FST de Porsolt, la inmovilidad, y los dos que añade la versión modificada del mismo, escalada y natación. El tiempo de inmovilidad se registra cuando los

animales no muestran más movimientos de los necesarios para mantener su cabeza fuera del agua. El tiempo de escalada se corresponde con aquel en el que los animales realizan movimientos con sus patas delanteras tratando de trepar por el borde del recipiente intentando escapar del agua. Finalmente, la natación se entiende como el tiempo que el animal se desplaza activamente en el agua incluyendo los cruces hacia otros cuadrantes. El comportamiento de tipo depresivo se define como un incremento en el tiempo de inmovilidad, aunque los comportamientos de natación y escalada han sido relacionados con diferencias en la actividad de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico respectivamente (Detke et al., 1995). La incorporación de estos parámetros en la versión modificada del test (mFST) agregan información muy valiosa, como la capacidad de discernir entre los efectos de diferentes tipos de antidepresivos, y la validez del mismo se encuentra plenamente contrastada en la literatura (Cryan et al., 2002), motivos por los cuales se optó por su utilización en lugar del original de Porsolt.

2.1.2 *Test de preferencia por la sacarosa (SPT)*

La reducción en la preferencia por las soluciones dulces apetitosas para el roedor como la sacarosa o la sacarina constituye el fundamento de este test como medida de la anhedonia del animal que ha demostrado ser inducida por el CMS (Willner et al., 1987). Para el desarrollo del test, se retiraron la comida y el agua en las 12 horas previas y se colocaron dos biberones en cada jaula pesados previamente, uno con agua y otro con sacarosa al 1% (p/v). Se permitió el libre acceso a ambos durante 1 hora y posteriormente se retiraron y pesaron. Para evitar el posible sesgo por la posición de los biberones se alternaron con respecto a sus posiciones en la semana previa. Las diferencias en el consumo de ambas soluciones se refirieron respecto a una línea base de preferencia construida a partir de los resultados de dos test separados temporalmente al menos 5 días. Los test tanto en el grupo control como en el CMS se realizaron al final de cada semana del protocolo de estrés los días 8, 15 y 22.

2.1.3 *"Splash" test (ST)*

El "splash" test constituye otra prueba comportamental acerca de parámetros relacionados con un comportamiento de tipo depresivo y fue realizado adaptando un protocolo empleado previamente (Yalcin et al., 2005). La evaluación se realiza tras el día 21 de estrés, el día 22 de experimento, a través del comportamiento de acicalamiento o *grooming* del animal tras pulverizar una solución de sacarosa al 10% en el pelaje dorsal durante la fase de actividad y bajo condiciones de oscuridad. El *grooming* se considera un índice de higiene personal, así como una medida indirecta de la apetencia por una solución dulce relacionada con características

anhedónicas. Se cuantificó el tiempo hasta el inicio del *grooming* (tiempo de latencia) y la duración del mismo mediante el análisis del registro realizado con videocámara por un período de 5 minutos.

2.1.4 *Test del laberinto en cruz elevada (EPM)*

El laberinto en cruz elevada es una medida validada del conflicto de ansiedad en ratas (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). Consiste en una estructura elevada 50 cm del suelo y compuesta por cuatro brazos del mismo tamaño, dos abiertos y dos cerrados con paredes de 40 cm de altura, formando un ángulo de 90º alternativamente entre cada uno de ellos. El test se realizó el día 23 de experimento, dos días después del día 21 de CMS. Cada animal se colocó en el centro encarando un brazo abierto y se registraron sus movimientos con una videocámara durante 5 minutos. Se contabilizó el tiempo pasado en los brazos abiertos y el número de entradas en ellos. La relación porcentual con respecto al tiempo y entradas en brazos totales respectivamente resulta inversamente proporcional a la ansiedad del animal, esto es, a menor porcentaje, mayor ansiedad.

2.2. Estudios comportamentales en ratón

Todos los estudios comportamentales en ratón que forman parte de esta Tesis Doctoral se realizaron durante una estancia de 3 meses en el MD Anderson Cancer Center de Houston (Texas, EEUU) bajo la dirección del profesor Robert Dantzer y gracias a la beca concedida por la Fundación Boehringer Ingelheim.

2.2.1 *Test de ejercicio espontáneo en rueda giratoria (VWR)*

El ejercicio espontáneo en rueda giratoria (VWR) releja aspectos de la actividad física y también tiene implicaciones en el comportamiento de los animales, sobre todo en el aspecto motivacional relacionado con fenómenos de tipo depresivo o ansiedad (Novak et al., 2012). Tras su aclimatación, los ratones fueron estabulados individualmente colocando una rueda giratoria de perfil bajo (Med. Associates, Vermont, EEUU) que registra las vueltas completadas y lo envía teleméricamente por conexión inalámbrica a un ordenador ubicado en la habitación. Antes de comenzar cualquier tipo de experimento, los animales han de permanecer un mínimo de 14 días de entrenamiento hasta alcanzar una línea base estable. Los datos se expresaron como el número total de vueltas completadas durante las 12 horas de la fase de oscuridad diaria, su fase de actividad.

2.2.2 *Test de preferencia por la sacarosa (SPT)*

El test de preferencia por la sacarosa posee el mismo fundamento teórico que el descrito para rata, pero con modificaciones en el desarrollo del protocolo. En este caso, los animales tuvieron libre acceso a dos biberones, uno de agua y otro de sacarosa al 1% (p/v) renovados cada 72 horas, durante la semana previa al inicio de la experimentación como mínimo hasta alcanzar todos los animales una preferencia por la sacarosa superior al 80% en gramos de sacarosa consumidos/gramos de líquido totales, forma en la que se representó los resultados. Se alternó la posición de los biberones cada 24h para evitar cualquier tipo de asociación del sabor con la ubicación de los mismos. Tras la inyección de LPS, se registró su peso y se intercambiaron sus posiciones cada 12 horas.

2.2.3 *Test de natación forzada de Porsolt (FST)*

De igual forma a como ocurre en el caso del test de preferencia por la sacarosa, el test de natación forzada (FST) presenta algunos cambios en su aplicación a ratones, siendo más fiel al original de Porsolt, aunque el fundamento teórico e implicaciones continúan siendo idénticas. Los recipientes utilizados en este caso fueron de plástico, con un diámetro de 23 cms y se llenaron de agua a una temperatura de 24°C. El test se desarrolló en una única sesión bajo condiciones de luz roja a las 24 horas tras la administración del LPS (10 am) durante 6 minutos y se registró con una videocámara para su posterior análisis que consistió en la medición del tiempo de inmovilidad total de los ratones durante los 5 últimos minutos del vídeo.

3. Recogida y procesamiento de muestras

3.1. Recogida de muestras

3.1.1 Recogida de muestras de rata

La toma de muestras biológicas en las ratas se realizó de manera escalonada y equilibrada entre los diferentes grupos para minimizar las posibles interferencias por las variaciones circadianas de los niveles de corticosterona. Tras sobredosis de anestesia vía intraperitoneal (320mg/kg) con pentobarbital sódico (Vetoquinol®), se comprobó la ausencia de reflejos, tanto podal como de retirada de la cola, se procedió a la apertura de la cavidad torácica tras esterilizarla con etanol 70% (v/v) y a la extracción de los tejidos.

a Tejido fresco

A continuación, se detalla el proceso de extracción según el tipo de tejido:

- **Plasma:** la sangre se extrajo por punción cardíaca tras la apertura de la cavidad torácica. Mediante jeringuillas estériles cargadas con 0,5ml de citrato sódico al 3,15% (p/v) como anticoagulante, se extrajo la sangre en proporción 9:1. La separación de las distintas fracciones sanguíneas se realizó por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el plasma (sobrenadante) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior utilización para los diferentes ensayos.
- **Cerebro:** se procedió a la extracción y limpieza del encéfalo desde el cráneo separando y recogiendo dos áreas cerebrales: corteza frontal dividida en 6 segmentos y el hipocampo. Inmediatamente se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -80 °C para su posterior utilización, a excepción de aquellos que se utilizaron para la extracción en fresco de proteínas y RNA.

La elección de ambas estructuras cerebrales se debe a su implicación en la depresión (Drevets et al., 1992, Bremner et al., 2000). El córtex prefrontal juega un papel crucial en la conocida como función ejecutiva que incluye el procesamiento de las emociones y la toma y planificación de decisiones (Damasio et al., 1994). Se trata de una estructura con especial sensibilidad hacia mediadores pro y antiinflamatorios inducidos por estrés, el factor etiológico de la depresión que emula el modelo animal (de Pablos et al., 2006, García-Bueno et al., 2008a). Además, estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que los TLR-4, receptor de inmunidad innata objeto central de la

investigación de la que parte esta tesis doctoral, se encuentran activados en el córtex prefrontal tras el CMS (Gárate et al., 2011b). Por otro lado, el hipocampo está estrechamente ligado con la patología de la depresión y su tratamiento (MacQueen y Frodl, 2011a). Diversos estudios apuntan hacia una disminución del volumen hipocampal en pacientes deprimidos (MacQueen et al., 2003, Mamdani et al., 2015) incluso relacionándolo con el riesgo de suicidio (Colle et al., 2015) y al registro de un aumento en el mismo por la acción de los antidepresivos sobre la neurogénesis en el giro dentado, cobrando importancia los factores neurotróficos (Boldrini et al., 2009, Malykhin et al., 2010).

- **Ganglios linfáticos mesentéricos, bazo e hígado:** en condiciones de esterilidad, se pesaron y homogeneizó la misma cantidad de cada tipo de tejido en 2 mL de solución salina estéril para los posteriores cultivos microbiológicos dentro del estudio de la traslocación bacteriana desde el colon.
- **Colon descendente:** se tomaron 2 cm de la parte distal del colon (entre el ángulo esplénico y el recto) y tras la limpieza de las heces se llevó a cabo la extracción en fresco de proteínas y RNA, congelando una pequeña porción inmediatamente en hielo seco y conservándola a -80 °C para posteriores análisis. La elección de esta zona se escogió debido a que nuestra investigación se centra en la vía del TLR-4 y ésta es la que mayor cantidad de expresión de este receptor registra (Wang et al., 2010).

b Extracción de cerebros fijados para estudios de microscopía

La fijación de los cerebros para los estudios de inmunohistoquímica se llevó a cabo con paraformaldehído (PFA). Una vez anestesiado el animal y abierta la cavidad torácica tal y como se ha descrito previamente, se procedió a la canulación del ventrículo izquierdo y a la perfusión de aproximadamente 300 mL de suero salino (0,9%) mediante una bomba de inyección (Masterflex® L/S) para eliminar la sangre. A continuación, se perfundió a través de esa cánula con 300 mL de PFA al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,2M a pH 7,4. Se extrajo el cerebro y se sumergió durante 24 horas a 4 °C en PFA al 4% para después pasarlo a una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato salino potasio (KPBS) 0,1 M hasta que la densidad del cerebro es mayor que la de la propia disolución. Así, aseguramos su crioprotección y lo almacenamos a -40 °C hasta su posterior utilización.

3.1.2 Cerebros humanos

Las muestras (0.5-1 g de tejido del área 9 de Brodmann (BA9) obtenidas en la autopsia se extrajeron según el protocolo establecido por Rajkowska and Goldman-Rakic (1995) y se

congelaron inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Los valores de pH cerebrales y el número de integridad de del RNA (RIN) se determinaron como índices de calidad (García-Sevilla et al., 2010), mostrándose sus valores promedio en la Tabla 6.

3.2. Procesamiento de muestras

3.2.1 *Fracción citosólica y nuclear*

Para la separación de las fracciones citosólica y nuclear celulares se siguió el método descrito por Schreiber (Schreiber et al., 1989) con algunas modificaciones. Todo el protocolo se realizó a 4°C . El tejido se homogeneizó (TyssueLyser, QUIAGEN[®]) y una frecuencia de 50 oscilaciones/s en 600 μl de una solución tampón compuesta por: HEPES 10mM a pH 7,9, EDTA 1mM, EGTA 1mM, KCl 10mM, DTT 1mM, 0,5 NaF 5mM, NaVO_4 1mM y N_2MoO_4 10mM con cóctel de inhibidor de proteasas compuesto por extracto de páncreas, pronasa, termolisina, quimiotripsina, tripsina y papaína (cOplete, Roche[®]). Tras 5 minutos en hielo, se adicionó el detergente Nonidet p-40 (Roche[®]) al 0,05% y se agitó enérgicamente en el *vórtex* (VELP científica, Italia) para mantenerlas de nuevo 5 minutos en hielo. Se centrifugaron las muestras 5 minutos a 3000 rpm. Recogimos el sobrenadante y con él realizamos otra centrifugación de 3 minutos a 13000 r.p.m. Guardamos el sobrenadante, que constituye la fracción citosólica. Al pellet añadimos 70-100 μl (según la cantidad del mismo) del tampón inicial al que se le añadió glicerol al 20% y KCl para una concentración final 0,4M y agitamos vigorosamente durante 30 minutos. Se llevó a cabo una última centrifugación de 5 minutos a 13000 r.p.m. y recogimos el sobrenadante, es decir, la fracción nuclear. Ambos extractos, nuclear y citosólico, se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior procesamiento. Este método se utiliza habitualmente y ha demostrado proporcionar un extracto nuclear de elevada pureza prácticamente sin contaminación citosólica (Gárate et al., 2011b).

3.2.2 *Extracción de RNA*

En condiciones de esterilidad, el tejido (cerebro o colon) se homogeneizó (TyssueLyser, QUIAGEN[®]) en 600 μl de Trizol[®] (Invitrogen, Life Technologies) durante 4 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una frecuencia de 50 oscilaciones/s. Recogimos el sobrenadante y le añadimos 200 μL de cloroformo y, previo paso por el *vortex* e incubación de 2-3 minutos a temperatura ambiente, lo centrifugamos a 12000 rpm durante 15 minutos en frío. De las dos fases resultantes (acuosa y orgánica), obtuvimos la acuosa y repetimos la extracción con 200 μL de Trizol[®] y 40 μL cloroformo. Nuevamente, nos quedamos con la fase acuosa y añadimos 400 μl de isopropanol dejando reposar tras mezclar en *vortex* durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación,

centrifugamos a 12000 rpm 10 minutos en frío y obtuvimos un pellet de RNA sobre el que realizamos tres lavados con 600 µl de etanol 80%, disolución preparada con agua con dietilpirocarbonato libre de RNAasas y DNAasas, (agua DEPC, Invitrogen). Una vez evaporado el etanol, resuspendimos el pellet en 50 µl de agua DEPC y agitamos con el *vortex* para garantizar la dilución. El almacenamiento de las muestras se llevó a cabo a -40 °C hasta su posterior uso.

3.2.3 Preparación de homogeneizado total

Con el objetivo de estudiar mediadores intercelulares y cantidades de proteína globales en el tejido, se realizó un procedimiento para la obtención del homogeneizado total del tejido. Para ello, se homogeneizó (TissueLyser, QUIAGEN®) la porción de colon o cerebro en 600 µl a 50 oscilaciones/s y 4 °C durante 4 minutos. El homogeneizado total se obtuvo al tomar el sobrenadante después de una centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos en frío. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los ensayos correspondientes.

3.2.4 Extracción de eicosanoides

Una porción de corteza se homogeneizó por sonicación en 400 µl de tampón fosfato 0,1M a pH=7,4 suplementado con EDTA 1mM e indometacina 10 µM. Al homogeneizado se le añadió 1ml de etanol absoluto (Merk, GB), se agitó y se dejó reposar la mezcla 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 3000g en frío durante 10 minutos y nos quedamos con el sobrenadante al que añadimos 10 µl de ácido acético glacial (Sigma, España) para acidificarlo. Transcurridos 15 minutos a 4 °C para que reposase se llevó a cabo una nueva centrifugación de 2 minutos a 500g y recogimos el sobrenadante que pasamos por las columnas de C18 previamente activadas.

La activación de las columnas C18 (C18, Sep-Pak®, Waters Corp., EEUU) se realizó añadiendo 3 ml de metanol seguidos de 3 ml de agua milli-Q. Tras la activación y lavado de las columnas, agregamos la muestra y filtramos por gravedad hasta que toda la muestra ha atravesado la columna. Previo lavado de la misma con 3 ml de agua milli-Q y 3 ml de hexano (Sigma, España), las prostaglandinas unidas a la fase sólida se eluyeron con 1 ml de acetato de etilo (Sigma, España). Las muestras purificadas se guardaron a -80 °C hasta 24 horas después, cuando se evaporó el disolvente bajo un flujo continuo de nitrógeno a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 250 µl del tampón comercial correspondiente proporcionado por el kit.

3.2.5 *Preparación para estudios de microbiología*

La traslocación bacteriana se midió por el crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFCs) en diferentes órganos. Se seleccionaron fueron los ganglios linfáticos mesentéricos linfáticos (GLMs), el hígado y el bazo, además de la propia sangre, y todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Se pesó cada tejido y se homogeneizó en 2mL de suero salino estéril 9% (v/v) realizando dos diluciones seriadas de cada muestra y sembrando las tres en los medios de cultivo microbianos.

4. Técnicas bioquímicas

4.1. Estudios microbiológicos

Los medios de cultivo utilizados fueron Agar sangre y Agar MacConkey 5% para el recuento de bacterias aerobias y Agar Brucella Sangre suplementado con vitamina K1 y hemina para las anaerobias. Pasadas 24 horas de incubación a 37 °C para las aerobias y 48 horas para las anaerobias se procedió al recuento de UFCs, expresándolas por UFCs/mg de tejido. La identificación de las diferentes especies bacterianas se hizo mediante tinción de Gram y ensayos bioquímicos estándar. En el caso de los microorganismos aerobios, se emplearon los ensayos de la oxidasa (Mast Diagnostics®), discos antibióticos de optoquina, bacitracina y novobiocina (Mast®), coagulasa (Beckton Dickinson®), catalasa, y el sistema de identificación bioquímica BBLTM Enterotubo IITM (Difco Laboratories, Detroit, MI, EEUU). El sistema API 20 NE (Biomerieux®), se utilizó para los bacilos Gram – no fermentadores, y el API 20 Strep para *enterococcus*. Para los anaerobios, se empleó el sistema de identificación Rapid ID 32 A (Biomerieux®).

Los experimentos de cultivos e identificación bacteriana se realizaron en colaboración con el equipo de investigación de la Dra. Gómez-Lus del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

4.2. Determinación de los niveles de corticosterona

Los niveles de corticosterona en plasma se analizaron mediante un kit comercial ELISA (Corticosterone ELISA Kit, ENZO Life Sciences). La absorbancia se midió con el lector de microplacas Synergy 2 (BioTek®, EEUU) y el procesamiento de los datos se realizó con el software incorporado Gen5 Data Analysis Software (BioTek®, EEUU). Con una sensibilidad de 27,0 pg/ml, el rango de detección del kit se encuentra entre 32 pg/ml y 20000 pg/ml.

4.3. Determinación del lipopolisacárido (LPS) plasmático

El LPS es el principal componente de las bacterias Gram – y realizamos el análisis de esta endotoxina como medida indirecta de la presencia bacteriana en plasma por su capacidad para desencadenar una respuesta inmune innata. Para ello, se utiliza el kit comercial *LAL Chromogenic Endpoint Assay* (Hycult® Biotechnology, EEUU) que se basa en la capacidad del LPS para desencadenar una reacción enzimática en el lisado de amebocitos del cangrejo cacerola, *Limulus polyphemus*, provocando su gelificación. Aprovechando esta característica del LPS, el kit dispone una enzima sensible al mismo que en su presencia provoca la liberación de un

cromóforo, la p-nitroanilina. La reacción se para con ácido acético y la absorbancia se mide a 405 nm con el lector de microplacas Synergy 2 (BioTek®, EEUU), interpolando la concentración de endotoxina de las muestras gracias a un estándar de la misma. El límite de detección inferior del kit es de 0,04 EU/ml.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa o *Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)*

La determinación de la expresión génica del mRNA se llevó a cabo por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa tras la conversión del RNA extraído en los diferentes tejidos a DNA complementario (cDNA) mediante una retrotranscripción o transcripción reversa.

4.4.1 *Transcripción reversa o Reverse transcription (RT)*

La cantidad de RNA extraído se cuantificó y se comprobó su pureza por espectrofotometría utilizando el NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU). Las concentraciones de RNA se normalizaron a 100 ng/μl diluyendo con agua DEPC en un volumen final de 10 μl al que se añadieron 4,5 μl de una mezcla con Random primers, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y agua DEPC. Se sometió la solución a un calentamiento secuencial de 10 minutos en el termociclador My Cycler™ (Bio-Rad, EEUU): 1 min a 95 °C, 8 min a 70 °C y 1 min a 42 °C. Este paso permite la desnaturalización de la doble hebra de DNA y la hibridación azarosa de los primers a las cadenas monocatenarias. A continuación, se agregaron 5,5 μl de un segundo mix formado por la enzima retrotranscriptasa, su buffer correspondiente e inhibidores de RNAsas y se calentaron las muestras durante 60 minutos a 42 °C para que se produjese la transcripción inversa. Por último, a los 20 μl se añadieron 80 μl de agua DEPC y el cDNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

4.4.2 *Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa o quantitative-Polymerase Chain Reaction (qPCR)*

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR o real time-PCR) es una variante de la PCR convencional que tiene la capacidad de amplificar y, simultáneamente, cuantificar de forma comparativa el mRNA de la proteína que pretendemos determinar. La detección es posible gracias a la utilización de un fluoróforo intercalante inespecífico, en nuestro caso SYBR® Green, excitado mediante luz azul ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) y que emite luz verde ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$) recogida por el propio termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Alemania).

Se mezclaron para cada muestra 2 µl de cDNA y 18 ml de una mezcla formada por Quantimix Easy Master Mix (Biotools B&M Labs, España), agua-DEPC y el primer/cebador específico para la secuencia de la proteína a detectar (Tabla 8). Tras un calentamiento inicial de 3 minutos a 95 °C, los ciclos a los que se sometieron las muestras en la PCR fueron de 10 s a 95 °C para la desnaturalización, 15 s a 60 °C para el alineamiento y 20 s a 72 °C para la extensión, repitiéndose este proceso para un total de 35 ciclos de amplificación. Las concentraciones relativas de mRNA se realizaron desde el punto de despegue de la PCR utilizando el software comercial incorporado y se normalizaron con los niveles de tubulina.

Los oligonucleótidos utilizados como primers/cebadores en la qPCR se diseñaron con la herramienta *Primer3* (Untergasser et al., 2012). Su especificidad por la proteína diana se probó a través de una PCR *in silico* disponible en *USCS GenomeBrowser* (Kent et al., 2002) y un alineamiento de secuencias Blast (NCBI) frente a DNA complementario (cDNA) y DNA genómico (gDNA), seleccionando aquellos primers/cebadores capaces de hibridar únicamente con la secuencia diana.

Proteína	Cebador directo	Cebador inverso
Akt	5'-CCAAGGAGATCATGCAGCAC-3'	5'-TTCAGTGTCCACACACTCCAT-3'
PI3K	5'-GGTACAAGTCCCTTCAGCCC-3'	5'-GGTCAGCCCCATCTTCAGTC-3'
Nrf2	5'-TGA CTCTGACTCCGGCATTTC ACT-3'	5'-TCCATTTCCGAGTCACTGAACCCA-3'
HO-1	5'-TTCAGAAGGGTCAGGTGTCC-3'	5'-AAGGCCATGTCTGTCTAG-3'
NQO-1	5'-GCTTGCTTTCAGTTTTCGCC-3'	5'-GAGGCCCTAATCTGACCTC-3'
SOD-1	5'-AGGGCGTCATTCACTTCGAG-3'	5'-CCTCTTTCATCCGCTGGAC-3'
GPx-1	5'-TGAGAAGTGCGAGGTGAATG-3'	5'-CGGGGACCAAATGATGTACT-3'
Catalasa	5'-CACCTGAAGGACCCTGACAT-3'	5'-CCATTCGATTAACCAGCTT-3'
5-HT_{1A}	5'-TGGGTACTCTCATTTTCTG-3'	5'-CAGCACTGATACCATGAG-3'
5-HT_{1B}	5'-GGTGGACTATTCTGCTAAA-3'	5'-GGAGTAGACCGTGTAGAG-3'
5-HT_{2A}	5'-ATGCTGCTGGGTTTCCTTGT-3'	5'-TTGAAGCGGCTGTGGTGAAT-3'
5-HT_{2B}	5'-GGCCAATCAGTGCAATTCCC-3'	5'-AAAGCAGCCAGTGACCCAAA-3'
5-HT₇	5'-TCTCTTCGGATGGGCTCAGA-3'	5'-TTCCTGGCGGCCTTGTAAT-3'
TNFα	5'-CTGGCCAATGGCATGGATCTCAA-3'	5'-ATGAAATGGCAAATCGGCTGACGG-3'
IL-1β	5'-ACCTGCTAGTGTGTGATGTTCCA-3'	5'-AGGTGGAGAGCTTTCAGCTCACAT-3'
IDO-1	5'-GAGGGGACACAGTTACAGC-3'	5'-AAGACAGAATGGGAGGCAGC-3'
TDO	5'-GAACGCACACCTGGCTTAGA-3'	5'-CATCGAACAAGCAGAGCAGC-3'

Hao	5'-GGCACATCCCTAAGCCTGTT-3'	5'-GCCACAGCCACACATCTACA-3'
KAT-1	5'-TCACACCTCGCACCAAGATC-3'	5'-TGGCACAGATTAGCCACCAG-3'
KAT-2	5'-AGGTTCTCACTGCAACGAG-3'	5'-AGGAGCCAGGGAGATGATGT-3'
KAT-3	5'-TGGCCTGAAACCCATCATCC-3'	5'-GCGGATACAGGAATGGCTGA-3'
MKP-1	5'-CTCAAGTCTTCTTCTCAA-3'	5'-CAGGAAGGACAGGATCTCCA-3'
MKP-3	5'-TGAGGCCATTTCTTTCATAG-3'	5'-CTGGCCCATGAAGTTGAAGT-3'
LAT-1	5'-CCCTGGCCATCATCATCTCC-3'	5'-AGCCACGAAGACAGGAATG-3'
Tubulina	5'-CCCTCGCCATGGTAAATACAT-3'	5'-ACTGGATGGTACGCTTGGTCT-3'

Tabla 8. *Secuencias de primers específicos para cada proteína a detectar por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).*

4.5. Western blot

4.5.1 Cuantificación de proteínas y preparación de muestras

Los ensayos de expresión proteica mediante la técnica de Western blot requieren una normalización previa del contenido total de proteína en las muestras. El contenido proteico total se midió según el ensayo Bradford (Bradford, 1976) basado en el cambio de absorbancia del colorante azul brillante de Coomassie® en condiciones ácidas adquiriendo un tono azulado al unirse a las proteínas. El mecanismo por el cual esto transcurre se debe a dos tipos de interacciones que el colorante establece con las proteínas. Su forma rojiza dona su electrón libre a los grupos ionizables proteicos provocando la exposición de las zonas hidrofóbicas presentes en la estructura terciaria de la proteína. Esto permite su interacción con las regiones apolares del colorante de Coomassie® por fuerzas de van der Waals permitiendo además que la unión colorante-proteína se fortalezca por interacción iónica al aproximar cargas de diferente polaridad. Los cambios derivados de esta unión estabilizan la forma azulada del colorante y puede utilizarse como medida indirecta de la cantidad total de proteína presente en las muestras. La absorbancia se lee a 595 nm con el lector de microplacas *Synergy 2* (BioTek®, EEUU) tras 5 minutos de incubación y se estima la cantidad de proteína por interpolación con una recta de calibrado creada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (Sigma) entre 0 y 400 µg/ml, tras la dilución previa de las muestras correspondiente.

Conocida la concentración de proteínas, se normalizaron las muestras a 1µg/µl y se les añadió el tampón Laemmli (BioRad®, EEUU) con β-mercaptoetanol al 5% como agente desnaturizante.

4.5.2 Western blot

Se cargaron 15-20 µg de proteína en los diferentes pocillos, reservando uno para el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ (BioRad, EEUU), de geles de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) en porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (BioRad, EEUU) variable según el peso molecular de la proteína objeto de estudio (Tabla 9). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V hasta la migración completa del frente a través del gel y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot® Midi Nitrocellulose (BioRad®, EEUU) mediante el sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad®, EEUU) durante 10 minutos a 2,5 A y 2,5 V.

Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon durante 1 hora con una solución al 5% de leche desnatada o albúmina de suero bovino (PanReac, Alemania) para evitar las uniones inespecíficas al anticuerpo y reducir el ruido de fondo. A continuación, se incubaron las membranas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico de la proteína a detectar en la dilución adecuada de TBS-Tween (Tabla 8). Tras tres lavados de 10 minutos con tampón Tris-salino con Tween 20 (BioRad, EEUU) al 0,1% (TBS-Tween), las membranas se incubaron con la dilución adecuada en TBS-Tween del anticuerpo secundario específico correspondiente: ratón, conejo o cabra (Tabla 9).

Tras eliminar el exceso de anticuerpo secundario efectuando tres nuevos lavados con TBS-Tween, el revelado se realizó por quimioluminiscencia aplicando el kit Amersham ECL Prime (GE Healthcare, Reino Unido) que permite la oxidación catalizada del luminol por acción de la peroxidasa acoplada a los anticuerpos secundarios. La detección de la quimioluminiscencia emitida se registró con el equipo Odyssey® Fc Imager (LI-COR®, EEUU) y la cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el software ImageJ (NIH, EEUU). Se optimizó la señal obtenida analizando diferentes exposiciones temporales para asegurar la linealidad de la intensidad de las bandas, basándonos siempre en la literatura disponible.

Como controles de carga se utilizaron la *beta*-actina (β -actina) en el caso de muestras de homogeneizado total o citosólicas y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para las muestras nucleares.

Proteína (kDa)	Tipo de muestra	% Acrilamida	Ac Primario (dilución)	Ac Secundario (dilución)
p-Akt (60 kDa)	Citosol	8 %	Cell Signaling (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
Akt total (60 kDa)	Citosol	8 %	Cell Signaling (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)

PI3K (110 kDa)	Citosol	7 %	Sta. Cruz (1:750; 1% BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
Nrf2 (62 kDa)	Núcleo	8 %	Sta. Cruz (1:750; 1% BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
Keap-1 (70 kDa)	Citosol	8 %	R&D Systems (1:1000)	Anti-mouse GE Healthcare (1:2000)
p-GSK3β (47 kDa)	Citosol	8 %	Sta. Cruz (1:750; 2% BSA)	Anti-goat Sigma (1:5000; 1% BSA)
GSK3β total (47 kDa)	Citosol	8 %	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
4-HNE (66 kDa)	Homog. total	8 %	R&D systems (1:750; 2% BSA)	Anti-mouse GE Healthcare (1:2000)
PPAR-γ (58 kDa)	Núcleo	8 %	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
SERT (70 kDa)	Homog. total	8 %	Sta. Cruz (1:750; 2,5% BSA)	Anti-goat Sigma (1:5000; 1% BSA)
NET (58 kDa)	Homog.total	8 %	Sta. Cruz (1:750; 2% BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
IDO-1 (45 kDa)	Homog.total	8 %	Sta. Cruz (1:750; 1% BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
COX-2 (72 kDa)	Citosol	7 %	Sta. Cruz (1:1000; 2% BSA)	Anti-goat Sigma (1:5000; 1% BSA)
CCL28 (14 kDa)	Homog. total	14 %	R&D Systems (1:1000)	Anti-mouse GE Healthcare (1:2000)
ZO-1 (220 kDa)	Homog. total	7 %	Sta. Cruz (1:750; 1 % BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
Ocludina (66 kDa)	Homog. total	7 %	Sta. Cruz (1:750; 2,5 % BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
p-p38 (38 kDa)	Citosol	8 %	Sta. Cruz (1:1000; 1% BSA)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
p-ERK1/2 (44-42 kDa)	Citosol	8 %	Cell Signaling (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
p-JNK (54-46 kDa)	Citosol	8 %	Cell Signaling (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
TLR-4 (95 kDa)	Citosol	7 %	Sta. Cruz (1:750; 2% BSA)	Anti-goat Sigma (1:5000; 1% BSA)
Hsp 60 (60 kDa)	Citosol	7 %	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
Hsp 70 (70 kDa)	Citosol	7%	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-goat Sigma (1:5000; 1% BSA)
NF-κB (p65) (65 kDa)	Núcleo	8 %	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)
p38 α/β (38 kDa)	Citosol	8 %	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-mouse GE Healthcare (1:2000)
DUSP2 (35 kDa)	Núcleo	8 %	Sta. Cruz (1:1000)	Anti-mouse GE Healthcare (1:2000)
S100A10 (11 kDa)	Citosol	16 %	Abcam (1:500)	Anti-mouse GE Healthcare (1:2000)
Bcl-xL (30 kDa)	Citosol	8 %	Cell Signaling (1:1000)	Anti-rabbit Sta.Cruz (1:2000)

β-actina (42 kDa)	Homog. total / citosol	7-16%	Sigma (1:15000)	Anti-mouse GE Healthcare (1:10000)
GAPDH (37 kDa)	Núcleo	7-16%	Sigma (1:10000)	Anti-mouse GE Healthcare (1:10000)

Tabla 9. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para cada proteína a detectar por Western Blot.

4.6. Determinación de los niveles de prostaglandinas en corteza prefrontal

Estos ensayos se realizan tras la extracción de eicosanoides aplicada sobre la corteza prefrontal detallada en el apartado procesamiento de muestras.

4.6.1 Cuantificación de la prostaglandina E_2 (PGE_2)

La cuantificación de los niveles de la PGE_2 en la corteza prefrontal se realizó mediante un ensayo ELISA competitivo comercial “Prostaglandin E_2 EIA Kit” (Cayman Europe, Estonia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit se basa en la competitividad entre la PGE_2 presente en la muestra y el conjugado PGE_2 -acetilcolinesterasa del kit en su unión a los anticuerpos específicos anti- PGE_2 adheridos al fondo de los pocillos de la placa. Al ser la concentración del conjugado constante, las diferencias en la unión vendrán dadas por los niveles de la PGE_2 de cada muestra que serán inversamente proporcionales a los del conjugado retenido por los anticuerpos. Después del lavado de los pocillos, se incubó con el reactivo de Ellmans que incluye el sustrato de acción de la acetilcolinesterasa generándose un producto amarillo detectado al leer la absorbancia a 412 nm con el lector de placas Synergy 2 (BioTek®, EEUU). El límite de detección del ensayo son 15 pg/ml (80% B/B₀).

4.6.2 Cuantificación de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J_2 (15-dPGJ₂)

La 15-dPGJ₂ se determinó utilizando un kit ELISA competitivo comercial “15-deox- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 ELISA” (DRG®, Alemania). El fundamento del ensayo es similar al descrito para la PGE_2 : la 15-dPGJ₂ presente en la muestra compite frente a un conjugado 15-dPGJ₂-alcalinafosfatasa del kit por la unión al anticuerpo adherido en los pocillos de la placa. Tras el lavado correspondiente, la adición del sustrato desencadena una coloración amarilla catalizada por el conjugado de tal manera que la intensidad de la señal será inversamente proporcional a la concentración de la 15-dPGJ₂ de la muestra y se detecta al leer a 405 nm con el lector Synergy 2 (BioTek®, EEUU). El rango de detección comprende entre 195 pg/ml y 200000 pg/ml.

4.7. Determinación del estrés oxidativo

4.7.1 Peroxidación lipídica (MDA) en corteza prefrontal

La peroxidación lipídica es el resultado de la degradación de lípidos de membrana como consecuencia de la acumulación de radicales libres ante un estado de estrés oxidativo en la célula. Los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares y se genera una reacción en cadena que afecta principalmente a ácidos grasos poliinsaturados ya que poseen hidrógenos especialmente reactivos en los grupos metileno situados entre los dobles enlaces. Uno de los productos que se forma, el malonildialdehido (MDA), puede utilizarse como medida indirecta de los niveles de estrés oxidativo gracias a una adaptación del test del ácido tiobarbitúrico descrito por Das and Ratty (1987). Las muestras de tejido cerebral se homogeneizaron (TyssueLyser, QUIAGEN®) en 10 volúmenes de tampón fosfato 50 mM y se desproteinizaron con ácido tricloroacético (TCA) al 40% (p/v) y ácido clorhídrico (HCl) 5 M seguidos de la adición de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 2% (p/v) disuelto en hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M. La mezcla se agitó delicadamente y se dejó transcurrir a la reacción colorimétrica durante 15 minutos a 90 °C, quedándonos finalmente con el sobrenadante tras una centrifugación de 10 minutos a 12000 rpm. El cromógeno rosa se leyó en un lector de microplacas *Synergy 2* (BioTek®, EEUU) a 532 nm y los resultados se expresaron como nanomoles de MDA, obtenidos por extrapolación en una recta patrón de concentraciones conocidas de MDA, por miligramo de proteína total determinada por ensayo Bradford.

4.7.2 Medición de los niveles de nitritos (NO_2^-) en corteza prefrontal

Los catabolitos provenientes del óxido nítrico, nitritos y nitratos contribuyen al estrés oxidativo/nitrosativo celular. Para la determinación de los mismos, se siguió el método descrito por Peter Griess en 1858 conocido como “ensayo Griess”. El tejido cerebral se homogeneizó (TyssueLyser, QUIAGEN®) en 10 volúmenes de tampón fosfato 50 mM y se centrifugaron a 13000g durante 15 minutos a 4 °C, quedándonos con el sobrenadante. En una placa de 96 pocillos se realizaron duplicados con 100 µl de muestra o estándar de nitrito de sodio para la recta patrón a los que se añadieron 50 µl de N-1-(Naftil)-etil-enediamina (Neda) al 0,1% (p/v) y 50 µl de sulfanilamida al 1% (p/v). La lectura se realizó en el lector de microplacas *Synergy 2* (BioTek®, EEUU) a 540 nm y se extrapolaron las concentraciones de nitritos según la recta patrón, normalizándolas posteriormente con la cantidad total de proteína cuantificada por Bradford.

4.8. Determinación de otros parámetros bioquímicos

4.8.1 Cuantificación de inmunoglobulina A (IgA)

La inmunoglobulina A representa la primera línea de defensa en el epitelio intestinal y para llevar a cabo el análisis de sus niveles se utilizó el kit comercial *Mouse IgA ELISA Quantitation Set* (Bethyl Laboratories®, EEUU). Los homogeneizados totales del colon constituyeron el material de partida para la determinación, siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de las absorbancias se realizó con el lector de microplacas *Synergy 2* (BioTek®, EEUU), siendo la sensibilidad del ensayo de 15 ng/ml y el límite inferior de detección 15,625 ng/ml.

4.8.2 Cuantificación de los metabolitos de la kinurenina: ácido quinolínico (QUINA) y ácido kinurénico (KYNA)

El ácido quinolínico y el ácido kinurénico son metabolitos de la vía de las kinureninas y se analizó su presencia en homogeneizado total de corteza prefrontal mediante kits comerciales ELISA (Cloud-Clone Corp., EEUU) según las indicaciones del fabricante. Para el ELISA del ácido quinolínico la sensibilidad es de 0,58 ng/ml y el rango de detección de 1,23-100 ng/ml. Por su parte, el de ácido kinurénico posee una sensibilidad de 9.24 ng/ml y el rango de detección es de 24.69-2000 ng/ml. La lectura de las absorbancias se realizó en ambos casos con el lector de microplacas *Synergy 2* (BioTek®, EEUU).

4.9. Inmunohistoquímica de fluorescencia

Con el fin de identificar los tipos celulares nerviosos que expresan una determinada proteína, así como de apreciar posibles diferencias en la intensidad de la misma, se puso a punto un protocolo de doble inmunofluorescencia. El tejido cerebral preparado para este fin, tal y como se describe en el apartado de toma de muestras, se cortó con un micrótopo de deslizamiento SM2000 (Leica, Alemania) en rebanadas de 30 μm que se guardaron en líquido anticongelante a -40 °C hasta su posterior uso.

Para disminuir la autofluorescencia del tejido debida a compuestos similares a la lipofuscina, los cortes se trataron con una solución de sulfato cuproso Cu_2SO_4 10mM en acetato de amonio 50 mM a pH=5. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno con agua destilada, las secciones se bloquearon con BSA 10% durante 1 hora y, posteriormente, se incubaron con KPBS, BSA 10% y los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 10) durante 48 horas a 4 °C en agitación. La incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos se realizó tras eliminar el exceso de anticuerpo primario con tres lavados de KPBS y teniendo en cuenta que la proteína de interés emitiría en rojo y el marcador celular lo haría en verde, dejando el azul para la tinción

con DAPI (Tabla 10). Se incluyeron controles del ensayo suficientes para asegurar que la unión antígeno-anticuerpo y la señal emitida eran las correctas evitando inespecificidades y situaciones de reactividad cruzada entre anticuerpos.

Los cortes se colocaron en húmedo sobre portaobjetos SuperFrost™ Plus (ThermoFisher Scientific, EEUU) utilizando como medio de montaje ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies™, EEUU). La visualización del tejido marcado por inmunohistoquímica de fluorescencia se llevó a cabo mediante un microscopio confocal FluoView1200 (Olympus, Japón) con un análisis de correlación de fluorescencia *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (PicoQuant, Alemania). Se incluyeron experimentos control incubando las secciones de tejido con cada anticuerpo individualmente y después con ambos anticuerpos secundarios para asegurar que estos últimos no mostraban reactividad cruzada con el primario o entre ellos. Asimismo, se optimizó la señal obtenida analizando diferentes exposiciones temporales, basándonos siempre en la literatura disponible.

Marcaje	Proteína	Ac primario (dilución)	Ac secundario (dilución)
Proteína problema	p-p38	Sta. Cruz (1:500)	Donkey anti-rabbit o anti-goat IgG conjugado con Alexa 555 (1:2000)
	p-ERK1/2	Cell Signaling (1:1000)	
	p-JNK	Cell Signaling (1:1000)	
Marcador tipo celular	NeuN (neurona)	Abcam (1:1000)	Donkey anti-rabbit o anti-mouse IgG conjugado con Alexa 488 (1:2000)
	Iba1 (microglía)	Abcam (1:1000)	
	GFAP (astroglía)	Sta. Cruz (1:1000)	

Tabla 10. Combinación de anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica de fluorescencia.

5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm SEM (error estándar de la media) y el análisis estadístico utilizado depende del número de grupos entre los que comparar y del número de variables independientes, siendo diferente en las muestras de animales y en las humanas como consecuencia de la capacidad de control de variables debido a su propia naturaleza. El software empleado en los análisis fue GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EEUU) e InVivoStat (Mockett Media, Reino Unido).

En todos los casos, se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

5.1. Estudios con animales

En el caso de dos grupos experimentales y una variable independiente se realizó una *t de Student* no pareada de dos colas a la que se le aplicó la corrección de Welch cuando las varianzas no fueran iguales. Para más de dos grupos experimentales y una variable independiente, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de un *post hoc* de Neuman-Keuls. Se analizaron los datos con el test de Brown-Forsythe para asegurar la distribución *gaussiana* y, de no resultar así, se realizó un ANOVA no paramétrico con un test de Kruskal-Wallis y el *post hoc* elegido fue el de Dunn. Cuando procedemos al análisis de grupos experimentales con dos variables independientes, el análisis elegido fue un ANOVA de dos vías (con medidas repetidas o no según el caso) seguido de un *post hoc* de Sidak.

5.2. Estudios en humanos

Se procesó cada par de muestras en paralelo para cada caso y su control pareado correspondiente para controlar la varianza experimental. Se aseguró la distribución *gaussiana* para los valores semicuantitativos de proteína obtenidos y se compararon los pacientes depresivos frente a los controles mediante un test *t de Student* no pareada de dos colas. Al separar los pacientes depresivos en tratados y no tratados, el número de grupos experimentales ascendió a tres y se utilizó una ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Dunnet frente al grupo control. Se realizó un análisis de correlaciones para evaluar la influencia del sexo, la edad, el tiempo de recogida del cerebro *post mortem*, el tiempo de almacenamiento y el índice de masa corporal (IMC) (Tabla 11). En caso de correlación entre variables, se reanalizaron los resultados mediante un análisis de la covarianza (ANCOVA) controlando para el factor correspondiente como covariable.

Proteína	Sexo		Edad		RPM		IMC		pH cerebral	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TLR-4										
Hsp 60					0,2811	0,0325				
Hsp 70			0,5419	0,0042						
NF-κB							0,3088	0,0390		
p-ERK1/2										
p-p38/p38α/β										
p-JNK									-0,6658	0,0026
DUSP2					0,3809	0,0378				
PI3K										
Keap-1							-0,277	0,0353		
Nrf2										
S100A10										
Bcl-xL			0,4387	0,025						

Tabla 11. Análisis de correlaciones para las variables sexo, edad, recogida post mortem (RPM), índice de masa corporal y pH cerebral. TLR-4: receptor *Toll-like* 4; Hsp: proteína de choque térmico; NF-κB: factor nuclear *kappa* B; ERK: quinasa de la señal extracelular; p38: proteína 38; JNK: quinasa NH₂ terminal de c-jun; DUSP2: fosfatasa dual específica; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; Keap-1: proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1; Nrf2: factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2); S100A10: proteína S100 de unión a calcio A10; Bcl-xL: proteína extra grande del linfoma de células B.



Instituto de Estudios de
Ciencias de la Salud
de Castilla y León



VNIvERSIDAD
DSALAMANCA

S.E.A.

Servicio de
Experimentación Animal

EL INSTITUTO DE ESTUDIOS DE CIENCIAS DE LA SALUD DE CASTILLA Y LEÓN Y EL SERVICIO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
CONCEDEN EL PRESENTE

DIPLOMA

A D/D^a **DAVID MARTÍN HERNÁNDEZ**

CON D.N.I./PASAPORTE: 71093695M

POR HABER REALIZADO EL CURSO

X CURSO DE CAPACITACIÓN PARA EXPERIMENTADORES EN CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

CELEBRADO EN SALAMANCA DEL 4 AL 8 DE FEBRERO DE 2013, CON UNA DURACIÓN DE 40 HORAS LECTIVAS.
SALAMANCA, 8 DE FEBRERO DE 2012



FDO. DR. D. ALBERTO CABALLERO GARCÍA
DIRECTOR GERENTE DEL INSTITUTO DE ESTUDIOS DE
CIENCIAS DE LA SALUD DE CASTILLA Y LEÓN

FDO.: D. LUÍS MUÑOZ DE LA PASCUA
DIRECTOR DEL SERVICIO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PROGRAMA CURSO DE CAPACITACIÓN PARA EXPERIMENTADORES EN CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO (40 horas)

PROGRAMA TEÓRICO (20 horas lectivas)

A. Aspectos éticos y alternativas al uso de animales

T1. Introducción a las Ciencias del Animal de Laboratorio. Ética en la investigación con animales

- 1.1. Introducción a las Ciencias del Animal de Laboratorio
- 1.2. La Ética en la experimentación animal
- 1.3. Pensamiento social, científico y filosófico
- 1.4. Debate ético
- 1.5. Comités éticos. Composición y funcionamiento

T2. Procedimientos alternativos

- 2.1. Refinamiento, reemplazamiento y reducción
- 2.2. Definición y estudio de alternativas y métodos complementarios a los procedimientos experimentales con animales
- 2.3. Posibilidades y limitaciones de las alternativas
- 2.4. Alternativas validadas y métodos aceptados en docencia e investigación
- 2.5. Ayudas en la Web para la búsqueda de alternativas

B. Legislación en Experimentación Animal

T3. Marco normativo: Legislación nacional, europea e internacional

- 3.1. Real Decreto 1201/05
- 3.2. Directiva 609/86 CEE; Convenio europeo ETS 123
- 3.3. Otras regulaciones relacionadas con la experimentación animal

C. Manejo y principios básicos del mantenimiento de las especies más relevantes utilizadas como animales de laboratorio:

T4. Biología general de las especies más relevantes utilizadas en experimentación

- 4.1. Anatomía y fisiología comparada de roedores y lagomorfos
- 4.2. Anatomía y fisiología comparada de carnívoros y suidos
- 4.3. Anatomía y fisiología comparada de peces y anfibios

T5. Estandarización microbiológica

- 5.1. Gnotobiología
- 5.2. Clasificación de los animales de experimentación en base a su flora microbiana
- 5.3. Producción y mantenimiento de animales gnotobióticos
- 5.4. Barreras y zonas protegidas

T6. Estandarización genética

- 6.1. Tipos de animales en base a su constitución y selección genética
- 6.2. Animales modificados genéticamente. Métodos de generación y tipos principales.

6.3. Calidad genética y su control

6.4. Criopreservación de líneas y transferencia embrionaria

T7. Reproducción y cronobiología

- 7.1. Fisiología de la reproducción. Factores modificadores
- 7.2. Tipos de cría y manejo reproductivo en roedores
- 7.3. Cronobiología. Concepto
- 7.4. Influencia de los ritmos en los parámetros fisiológicos y en los experimentos

T8. Cuidados generales y alojamiento. Higiene. Enriquecimiento ambiental. Identificación Manejo y transporte de animales de laboratorio. Nutrición

- 8.1. Cuidados generales, alojamiento, ejercicio, cama
- 8.2. Métodos de higiene, desinfección y descontaminación
- 8.3. Enriquecimiento ambiental, identificación de los animales

- 8.4. Manejo, transporte, captura, y cuarentena
- 8.5. Nutrición

T9. Instalaciones y medioambiente

- 9.1. Instalaciones para mantenimiento de animales de experimentación
- 9.2. Diseño y barreras
- 9.3. Características constructivas
- 9.4. Control medioambiental

F. El bienestar Animal. Valoración del dolor, sufrimiento y angustia

T10. Bienestar animal en procedimientos científicos

- 10.1. Introducción al Bienestar Animal
- 10.2. Síndrome general de adaptación GAS
- 10.3. Fisiología del dolor
- 10.4. Valoración del bienestar / malestar
- 10.5. Control de la severidad de procedimientos. Tablas de tanteo. Criterios de punto final

E. Implicaciones del estado sanitario de los animales.

T11. Estatus y control sanitario de los animales

- 11.1. Concepto salud-enfermedad
- 11.2. Prevención, calidad sanitaria y controles sanitarios
- 11.3. Métodos de contención y descontaminación

T12. Patología de los animales de experimentación

- 12.1. Principales enfermedades y patologías no infecciosas
- 12.2. Interacciones del estado sanitario en los experimentos
- 12.3. Tratamientos farmacológicos y sus consecuencias

G. Procedimientos experimentales. Realización y desarrollo práctico

T13. Buenas prácticas de laboratorio. Protocolos normalizados de trabajo

13.1. Concepto de BPL y su aplicación en la experimentación animal

13.2. Concepto de Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT) Diseño y elaboración

13.3. Control de calidad

T14. Obtención de muestras biológicas y administración de sustancias

14.1. Inmovilización y entrenamiento del animal

14.2. Extracción de sangre y otras muestras biológicas

14.3. Biopsias

14.4. Vías y procedimientos comunes para la administración de sustancias

T15. Anestesia, analgesia y eutanasia

15.1. Anestesia

15.2. Analgesia

15.3. Eutanasia

T16. Principios de cirugía. Asepsia. Técnicas quirúrgicas básicas

16.1. Asepsia

16.2. Preparación del campo quirúrgico e instrumental básico

16.3. Técnicas quirúrgicas básicas

H. Seguridad y salud ocupacional

T17. Salud laboral y prevención

17.1. Riesgos laborales en los animalarios. Físicos, químicos y biológicos

17.2. Alergias y medicina preventiva en trabajadores. (vacunas)

17.3. Bioseguridad en infecciones experimentales

PROGRAMA PRÁCTICO (20 horas lectivas)

P1. Revisión ética de proyectos. Supuesto práctico (aula)

P2. Estrategias para las 3Rs. Criterios a seguir y búsqueda de información. Ejemplos prácticos. (aula)

P3. Manejo de los animales de experimentación

- Biología y manejo de la rata

- Biología y manejo del ratón

- Biología y manejo del conejo

- Manejo en barrera

P4. Anestesia, cirugía y analgesia

P5. Genética aplicada. Nomenclatura internacional (aula)

P6 Administración de sustancias y toma de muestras

P7. Valoración del bienestar animal y del dolor (aula)

P9. Procedimientos experimentales específicos (a determinar)

P10. Visita a las instalaciones del S.E.A.



Universidad del País Vasco Euskal Herriko
Unibertsitatea

Dr. Juan Carlos Leza Carro
Departamento de Farmacología
Universidad Complutense de Madrid

José Javier Meana Martínez, en calidad de responsable de la colección de muestras cerebrales inscrita en el Registro oficial del Instituto de Salud Carlos III con el número 35, declara su conformidad a la utilización de muestras procedentes de la citada colección en el desarrollo del Proyecto “*Papel de la microbiota en el origen y las consecuencias de la inflamación en depresión. Estudio traslacional*” cuyo investigador principal es el Dr. Juan Carlos Leza Carro.

La obtención y utilización de las muestras señaladas se rige por la Ley 14/2007, el RD 1716/2011 (BOE de 2 de diciembre) y el Acuerdo de colaboración suscrito entre la Universidad del País Vasco UPV/EHU y el Instituto Vasco de Medicina Legal.

A efectos informativos, la **obtención** de las muestras sigue los procedimientos marcados en el artículo 26 del mencionado RD: “*La obtención y utilización de muestras biológicas de personas fallecidas podrá realizarse en el caso de que así lo hubieran dispuesto en vida o cuando no hubieran dejado constancia expresa de su oposición. A estos efectos se indagará la existencia de instrucciones previas y, en ausencia de estas, se consultará a los familiares mas próximos del fallecido y a los profesionales que le atendieron en el centro sanitario, y se dejará constancia de las consultas realizadas*”.

Igualmente le informamos de los requerimientos legales señalados en el mismo artículo en los que se hace necesario dictamen de un Comité de Ética para la **utilización** de las muestras: “*Las muestras solo podrán destinarse a investigación biomédica previo dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación correspondiente al centro*”.

En ese sentido, debe entender que la responsabilidad de la solicitud de evaluación ante un Comité de Ética de Investigación, ha de recaer en el grupo de investigación que hará uso de las muestras y no sobre el grupo de investigación encargado de la obtención y custodia de las mismas, cuyas actividades poseen una regulación ajena al desarrollo y evaluación de Proyectos de investigación concretos.

Por otra parte, conforme al RD 1716/2011 la Universidad del País Vasco UPV/EHU y el Instituto Vasco de Medicina Legal suscribieron un Convenio que garantiza el cumplimiento de los requisitos legales establecidos en el proceso de obtención de cada una de las muestras incorporadas a la colección. Las muestras son cedidas en condiciones de disociación reversible por lo que **no se incorporan datos personales** a los responsables de la colección.



Se le recuerda que por las características legales de las colecciones de muestras establecidas fuera del ámbito de un Biobanco y los acuerdos interinstitucionales arriba mencionados:

- a) El desarrollo del Proyecto en el apartado correspondiente a la utilización de muestras cerebrales postmortem ha de realizarse en régimen de colaboración entre el grupo del Dr. Leza y el grupo de Neuropsicofarmacología de la UPV/EHU. Desde el punto de vista legal no es una cesión desde un Biobanco sino que posee los requerimientos específicos establecidos para las colecciones mantenidas fuera del ámbito de Biobancos.
- b) Las muestras se utilizarán exclusivamente para la realización del Proyecto arriba mencionado. Las muestras no podrán ser utilizadas con fines comerciales ni para Convenio, contrato o colaboración de ningún tipo con empresas u otras instituciones al margen de lo reseñado en este documento.
- c) En las publicaciones y cualquier otra forma de difusión de los resultados científicos a que den lugar los trabajos de investigación fruto de la utilización de las muestras se deberá reconocer y hacer constar el origen de las muestras, la participación del Instituto Vasco de Medicina Legal, así como la financiación que hace posible la obtención, mantenimiento y gestión de la colección.
- d) Existen condiciones pactadas entre la UPV/EHU y el Instituto Vasco de Medicina Legal respecto al potencial uso pericial de los resultados de la actividad investigadora desarrollada con las muestras cedidas, los derechos de propiedad intelectual y la protección industrial derivada. La colaboración entre el grupo dirigido por el Dr. Leza y el grupo de Neuropsicofarmacología se desarrollará bajo esas condiciones.

En Leioa a diecinueve de mayo de dos mil catorce

Fdo.: Dr. J. Javier Meana



IV) Resultados

1. *Efectos de los antidepresivos sobre la neuroinflamación inducida por el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)*
2. *Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)*
3. *Conexión entre los efectos comportamentales y la inflamación a través del sickness behavior inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones*
4. *Activación neuroinflamatoria en depresión y resistencia al tratamiento: estudios en cerebros humanos post-mortem*

1. Efectos de los antidepresivos sobre la neuroinflamación inducida por el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS)

En este primer capítulo se describen algunos desequilibrios neuroinflamatorios tras el CMS y cómo el tratamiento con antidepresivos usados actualmente en la clínica fue capaz de modularlos.

1.1. Efectos del CMS y los antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) en el PFC y el hipocampo

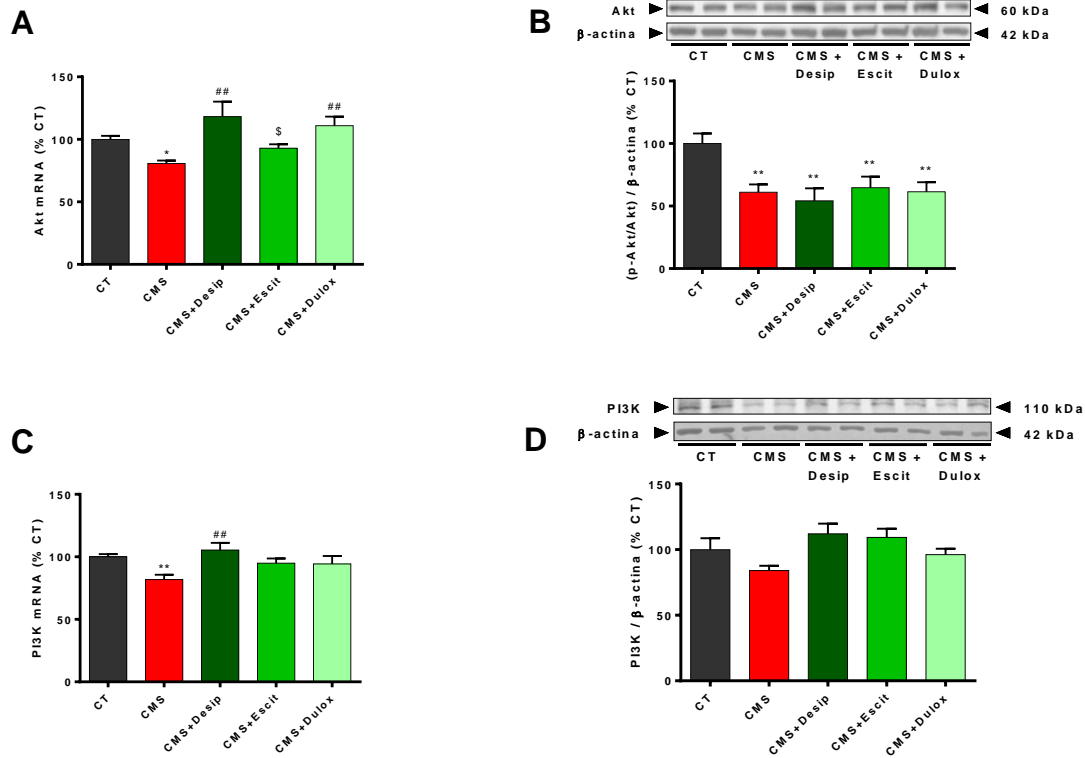
El factor nuclear Nrf2 juega un papel crucial en la respuesta antioxidante celular contra el estrés oxidativo y se ha relacionado con propiedades neuroprotectoras en patologías psiquiátricas como se ha descrito previamente. Se analizó el impacto del CMS y los tratamientos antidepresivos en el córtex prefrontal (PFC) y en el hipocampo.

1.1.1 *Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre los activadores de Nrf2*

La proteína quinasa B (Akt) y la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) controlan rutas de supervivencia celular y pueden activar a Nrf2. El CMS disminuyó la expresión del mRNA de PI3K en el PFC. Los tratamientos basados en desipramina y duloxetina indujeron la expresión del mRNA de Akt, pero sólo la desipramina incrementó los niveles de mRNA de PI3K (Figura 37A,C). El ratio de las formas fosforilada (activa) y total del Akt se redujo tras el CMS y los antidepresivos no fueron capaces de recuperarlo (Figura 37B). La expresión proteica de PI3K no se modificó en ninguno de los grupos (Figura 37D).

En el hipocampo, los niveles de proteína de p-Akt/Akt y PI3K disminuyeron en el grupo de CMS. Aunque el escitalopram para PI3K y p-Akt/Akt y la duloxetina para p-Akt/Akt mostraron una tendencia hacia restaurar su expresión, únicamente el tratamiento con duloxetina aumentó los niveles de proteína de PI3K (Figura 37F,H). No se registraron variaciones en los niveles de mRNA (Figura 37E,G).

PFC



Hipocampo

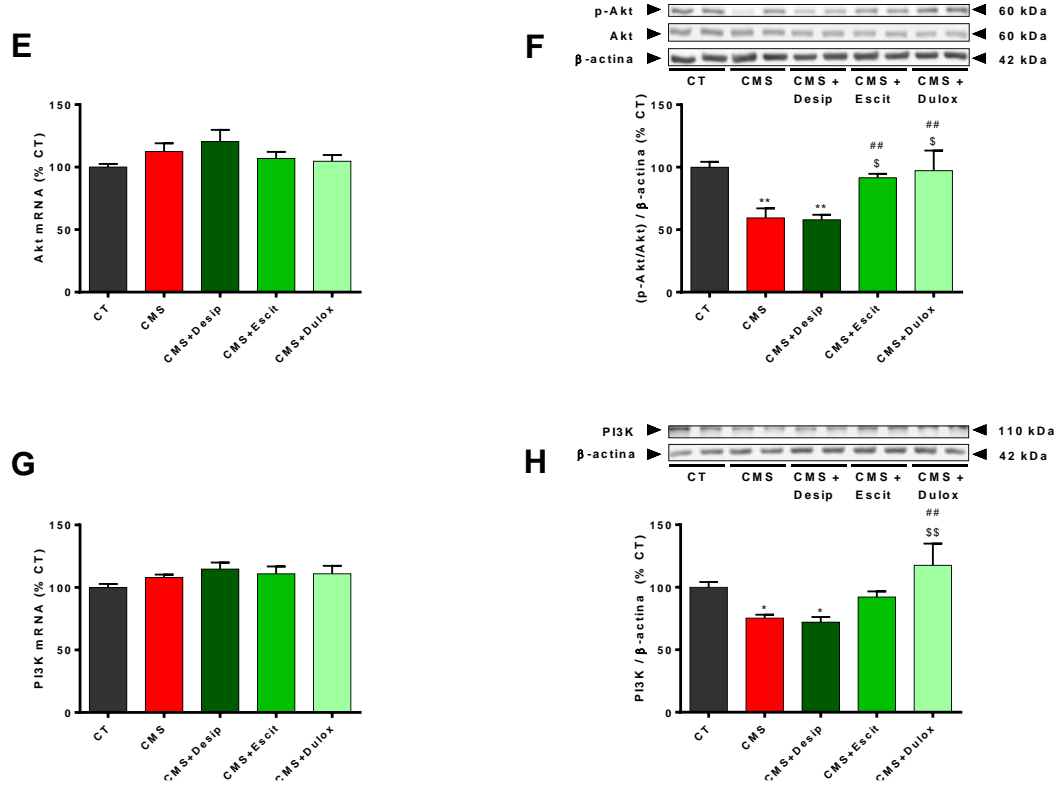


Figura 37. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre los activadores del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (*Nrf2*). Niveles de expresión relativa de mRNA de la proteína quinasa B (Akt) (A) y la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (C), niveles de proteína de p-Akt/Akt (B) y PI3K (D) en el córtex prefrontal (PFC) y niveles de proteína de p-Akt/Akt (F) y PI3K (H) en el hipocampo. Los grupos experimentales

inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del *Western blot* se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control (CT); ### $p < 0,01$ vs. CMS; \$ $p < 0,05$ vs. CMS + Desipramina. En (F), se analizaron los datos mediante un ANOVA no paramétrico con un test de Kruskal-Wallis seguidos de un *post hoc* de Dunn. En el resto de los datos se realizó un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.1.2 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de Nrf2 y sus inhibidores

El Nrf2 es activo cuando transloca al núcleo evadiendo la inhibición de la proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1 (Keap-1) y de la quinasa de la glucógeno sintasa 3 *beta* fosforilada (p-GSK-3 β). En el PFC, tanto los niveles de mRNA como de proteína en el núcleo de Nrf2 disminuyeron tras el protocolo de CMS (Figura 38A,B). Además, el CMS incrementó la expresión de Keap-1 y del ratio de p-GSK-3 β /GSK-3 β (aunque éste último no alcanzó significación estadística debido al test no paramétrico) (Figura 38C,D). Los tratamientos con desipramina y duloxetina, pero no el de escitalopram, restauraron la expresión de Nrf2, Keap-1 y p-GSK-3 β /GSK-3 β ratio (de nuevo éste último sin significación estadística) (Figura 38B,C,D).

El CMS no modificó la expresión de Nrf2 y sus inhibidores en el hipocampo (Figura 38E-H). En estos tres tratamientos, el único efecto en esta estructura cerebral fue la inducción de la expresión nuclear de Nrf2 con la duloxetina (Figura 38F).

PFC

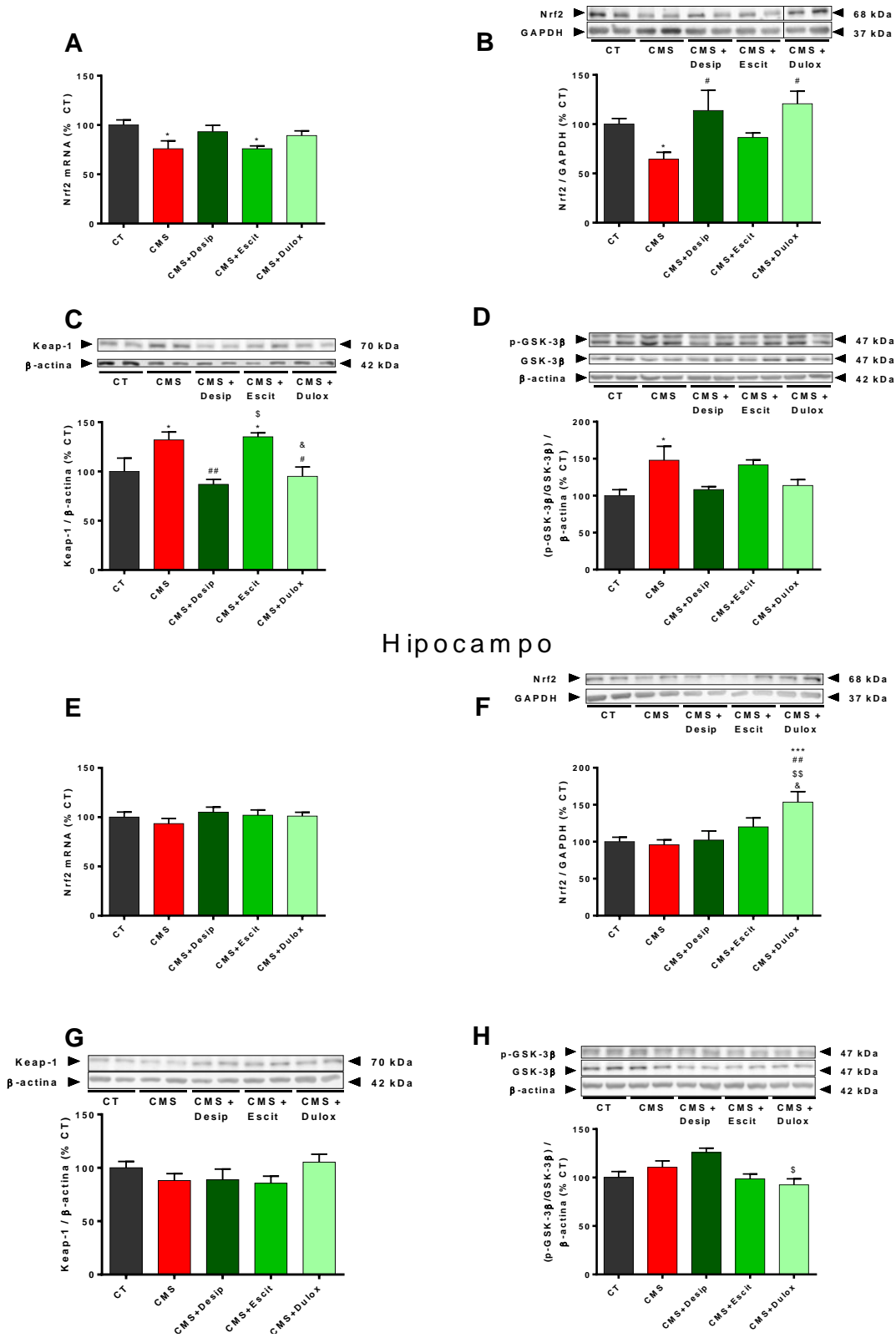


Figura 38. Efectos del chronic mild stress (CMS) y los antidepresivos evaluados sobre la expresión del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) y sus inhibidores. Niveles de expresión relativos de mRNA de Nrf2 (A) y niveles de proteína de Nrf2 (B), proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1 (Keap-1) (C) y ratio de la quinasa de la glucógeno sintasa 3 beta fosforilada (p-GSK-3 β /GSK-3 β) (D) en el PFC. Niveles de expresión relativos de mRNA de Nrf2 (E) y niveles de proteína de Nrf2 (F) y Keap-1 (G) y p-GSK-3 β /GSK-3 β (H) en el

hipocampo. Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) (B) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. control (CT); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. CMS; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ vs. CMS + Desipramina; & $p < 0,05$ vs. CMS + Escitalopram. En (D), se analizaron los datos mediante un ANOVA no paramétrico con un test de Kruskal-Wallis seguidos de un *post hoc* de Dunn. En el resto de los datos se realizó un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.1.3 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de enzimas antioxidantes

El Nrf2 libre en el núcleo reconoce las secuencias de los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) del genoma e induce la transcripción de enzimas detoxificantes de fase II. En el PFC, los niveles de mRNA de la NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO-1), la glutatión peroxidasa 1 (GPx-1) y catalasa pero no de la hemoxigenasa 1 (HO-1) disminuyeron bajo condiciones de CMS (Figura 39A-E). Los tres antidepresivos evaluados restauraron la expresión de GPx-1 (Figura 39A) y la duloxetina incrementó los niveles de catalasa, mostrando los otros dos antidepresivos una clara tendencia en esta dirección (Figura 39 E)

No se registraron cambios en la expresión de mRNA de las enzimas antioxidantes en el hipocampo tras el CMS (Figura 40A-E). Las únicas acciones ejercidas por los antidepresivos en esta estructura cerebral fue una inducción con la desipramina y una clara tendencia por parte de la duloxetina en los niveles de HO-1 (Figura 40A).

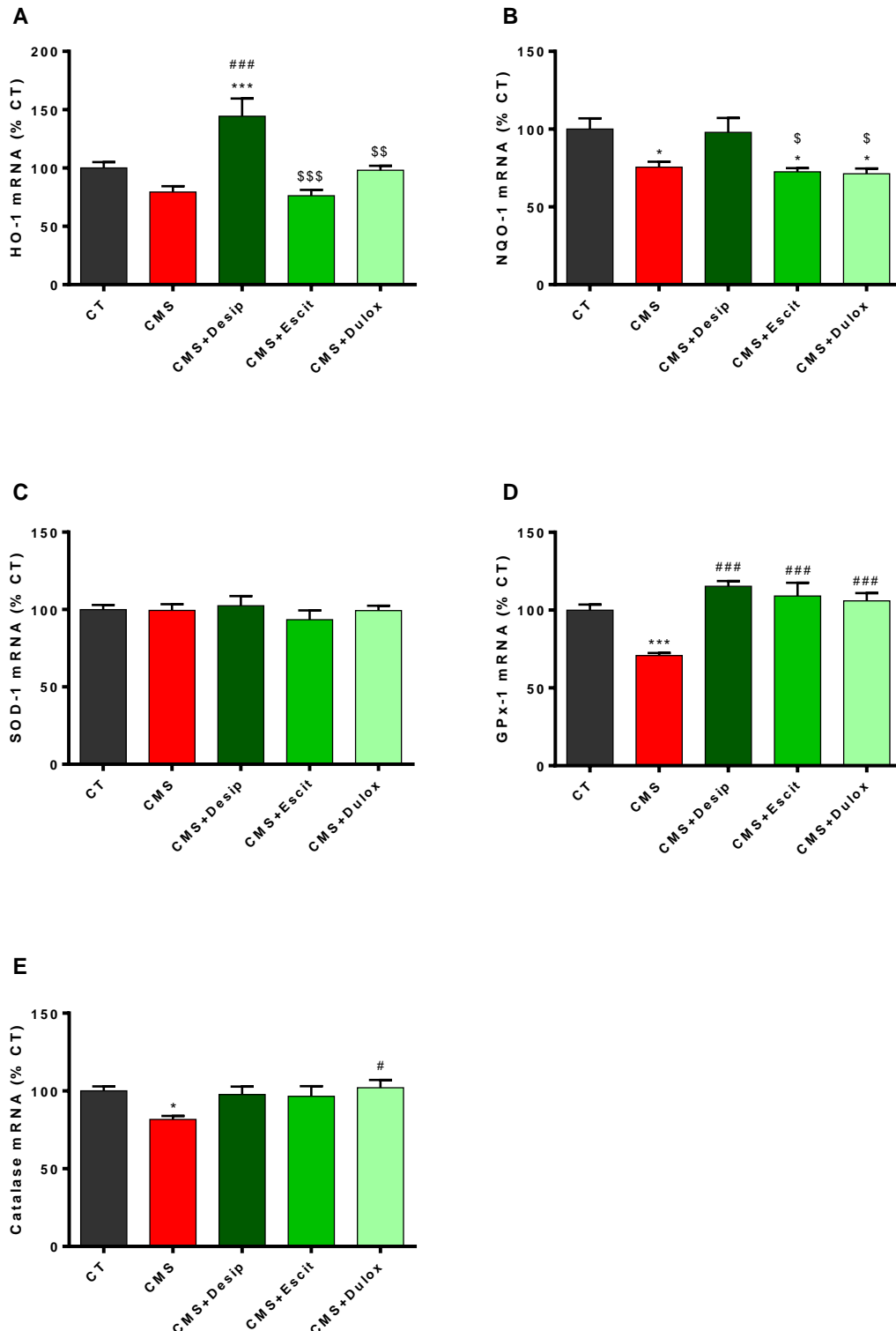


Figura 39. Efectos del chronic mild stress (CMS) y los antidepresivos evaluados sobre la expresión de enzimas antioxidantes en el córtex prefrontal (PFC). Niveles de expresión relativa de mRNA de la hemoxigenasa 1 (HO-1) (A), NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO-1) (B), la superóxido dismutasa 1 (SOD-1) (C), la glutatión peroxidasa 1 (GPx-1) (D) y catalasa (E). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. control (CT); # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ vs. CMS; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. CMS + Desipramina. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

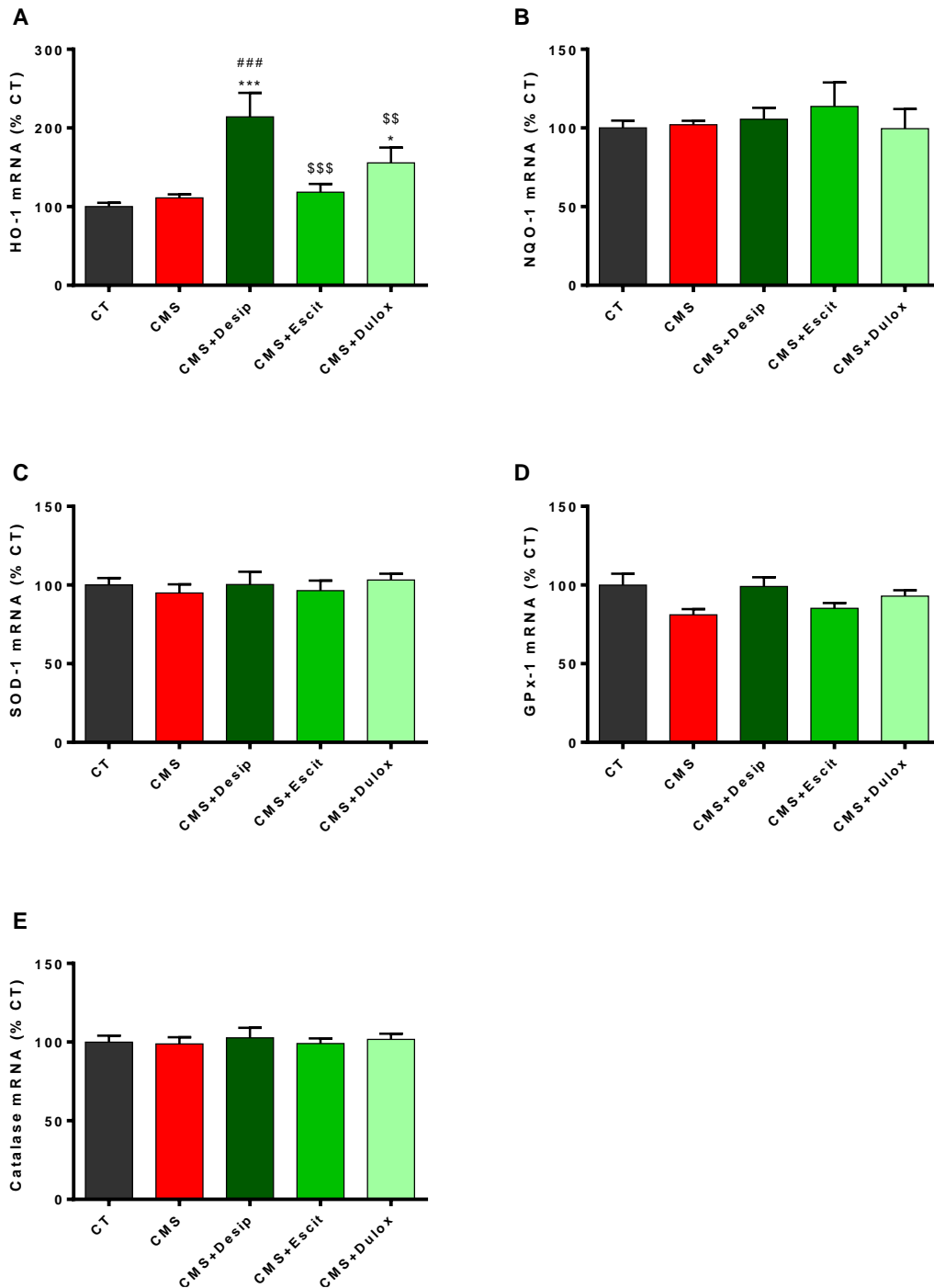


Figura 40. Efectos del chronic mild stress (CMS) y los antidepresivos evaluados sobre la expresión de enzimas antioxidantes en el hipocampo. Niveles de expresión relativos de mRNA de la hemoxigenasa 1 (HO-1) (A), NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO-1) (B), la superóxido dismutasa 1 (SOD-1) (C), la glutatión peroxidasa 1 (GPx-1) (D) y catalasa (E). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. control (CT); ### $p < 0,001$ vs. CMS; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. CMS + Desipramina. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.1.4 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre los niveles plasmáticos de corticosterona, la peroxidación lipídica (MDA y 4-HNE) y los niveles de nitritos (NO_2^-)

La corticosterona es la principal hormona del estrés en roedores. El CMS aumentó sus niveles plasmáticos (CT = 88.58 ± 17.66 ng/mL vs. CMS = 415.5 ± 146.6 ng/mL; $p = 0.0489$; test t de dos colas no pareado) y los antidepresivos evaluados parecen prevenir dicho incremento (mostrando una tendencia, aunque sin resultar estadísticamente significativa): CMS + Desipramina = 199.1 ± 70.40 ng/mL; CMS + Escitalopram = 82.23 ± 24.77 ng/mL; CMS + Duloxetina = 108.7 ± 25.28 ng/mL.

Los análisis de los productos de la peroxidación lipídica, el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), y los nitritos (NO_2^-) son indicadores del estrés oxidativo/nitrosativo. El CMS provocó un incremento en los niveles de MDA y 4-HNE en el PFC y los antidepresivos evaluados lo evitaron (Figura 41A,B). En el hipocampo no se pudieron detectar valores medibles de MDA (datos no mostrados) debido a los niveles tan bajos de los mismos y el 4-HNE permaneció invariable en todos los grupos (Figura 41C). Respecto al ensayo de nitritos, el CMS aumentó sus niveles en ambas estructuras cerebrales y los antidepresivos fueron incapaces de mantenerlos al nivel de los controles (Figura 41D,E).

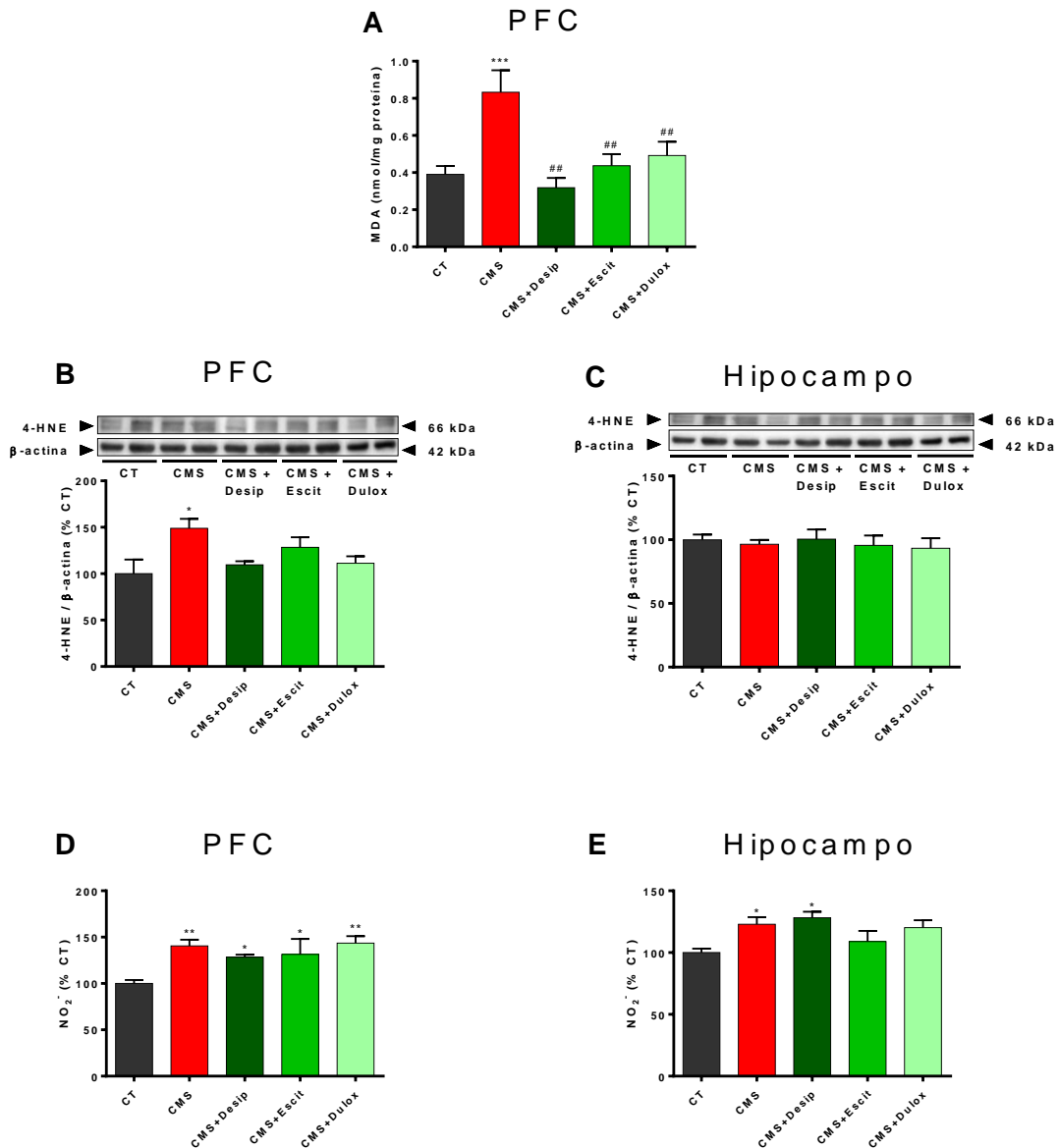


Figura 41. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre el estrés oxidativo/nitrosativo. Niveles de malonildialdehído (MDA) (A) en el córtex prefrontal (PFC), de 4-hidroxinonal (4-HNE) en el PFC (B) y en el hipocampo (C) y niveles de nitritos (NO₂⁻) en el PFC (D) y en el hipocampo (E). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control (CT); ## $p < 0,01$ vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.1.5 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre el receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR- γ), la prostaglandina (PG) 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -J₂ y la PGE₂

El receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR- γ) posee propiedades antiinflamatorias y uno de sus ligandos es la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15-dPGJ₂), la cual también parece activar a Nrf2. En el lado opuesto, la prostaglandina E₂ (PGE₂) es un potente

mediador inflamatorio y del estrés oxidativo/nitrosativo. La expresión nuclear de PPAR- γ se redujo tanto en el PFC como en el hipocampo en el grupo del CMS (Figura 42A,B). En el PFC, la duloxetina aumentó su expresión y la desipramina y el escitalopram también mostraron una tendencia en esta dirección (Figura 42A). Los tres antidepresivos evaluados reestablecieron los niveles de PPAR- γ en el hipocampo (Figura 42B).

El análisis de las dos prostaglandinas se realizó en el PFC. El CMS no modificó la expresión de la prostaglandina antiinflamatoria 15-dPGJ₂, pero la desipramina podría inducirla (Figura 42C). Se registró una clara tendencia al aumento en los niveles de la prostaglandina inflamatoria PGE₂ tras el CMS que alcanzó significación estadística en los grupos tratados con desipramina y escitalopram (Figura 42D).

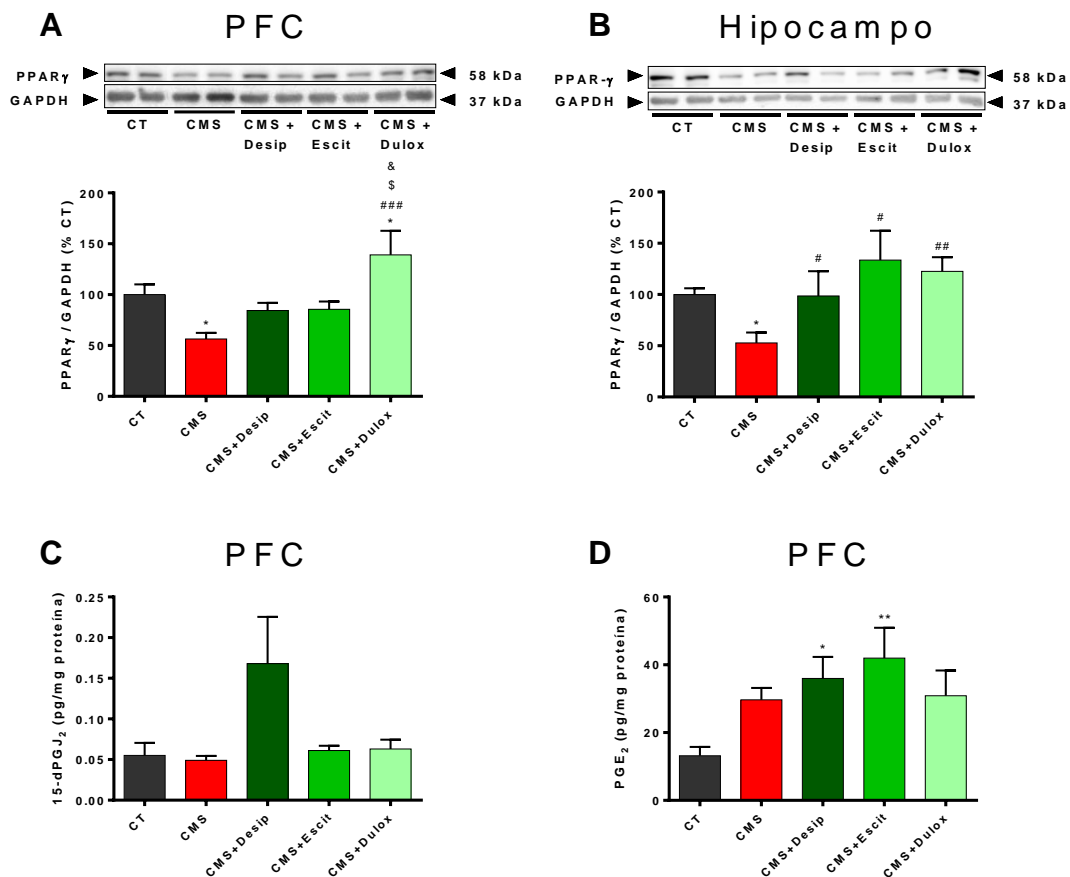


Figura 42. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR- γ), la prostaglandina (PG) 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -J₂ (15-dPGJ₂) y la PGE₂. Niveles de PPAR- γ en el córtex prefrontal (PFC) (A) y en el hipocampo (B) y niveles de la 15-dPGJ₂ (C) y la PGE₂ (D) en el PFC. Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; *p < 0,05, **p < 0,01 vs. control (CT); #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 vs. CMS; \$ p < 0,05 vs. CMS + Desipramina; & p < 0,05 vs. CMS + Escitalopram. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.2. Efectos de los antidepresivos sobre los receptores de serotonina (5-HT) y la posible conexión con la activación inflamatoria de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y los metabolitos de la kinurenina en el PFC

De aquí en adelante, los análisis se realizaron únicamente en el PFC en base a los resultados del apartado 1.1 y a otros motivos sobre los que profundizaremos en la discusión.

1.2.1 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de los receptores de serotonina (5-HT) 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇ en el PFC.

En la transmisión serotoninérgica, el 5-HT_{1A}, el 5-HT_{1B}, el 5-HT_{2A}, el 5-HT_{2B} y el 5-HT₇ son los receptores más relacionados con la depresión en el sistema nervioso central. Tras el CMS, los niveles de mRNA del autorreceptor 5-HT_{1A} y del postsináptico 5-HT_{2B} se incrementaron en el PFC (Figure 43A,D). Los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} no variaron su expresión (Figura 43B,C). La exposición al CMS aumentó los niveles de mRNA del 5-HT₇ al comparar únicamente frente al grupo control ($p=0,005$; test t de dos colas no pareado) (Figura 43E).

El incremento detectado para el 5-HT_{1A} desapareció con los antidepresivos evaluados (Figura 43A). La expresión de mRNA del receptor 5-HT_{1B} aumentó con los tratamientos de desipramina y escitalopram (Figure 43B).

La desipramina y la duloxetina provocaron un incremento en los niveles de mRNA del 5-HT_{2A} comparando con los grupos Control (CT) y CMS (Figura 43C). Los antidepresivos no modificaron el aumento en la expresión del 5-HT_{2B}, pero el grupo tratado con duloxetina no alcanzó significación estadística (Figura 43D).

Los niveles de mRNA del receptor 5-HT₇ no cambiaron con los tratamientos antidepresivos (Figura 43E).

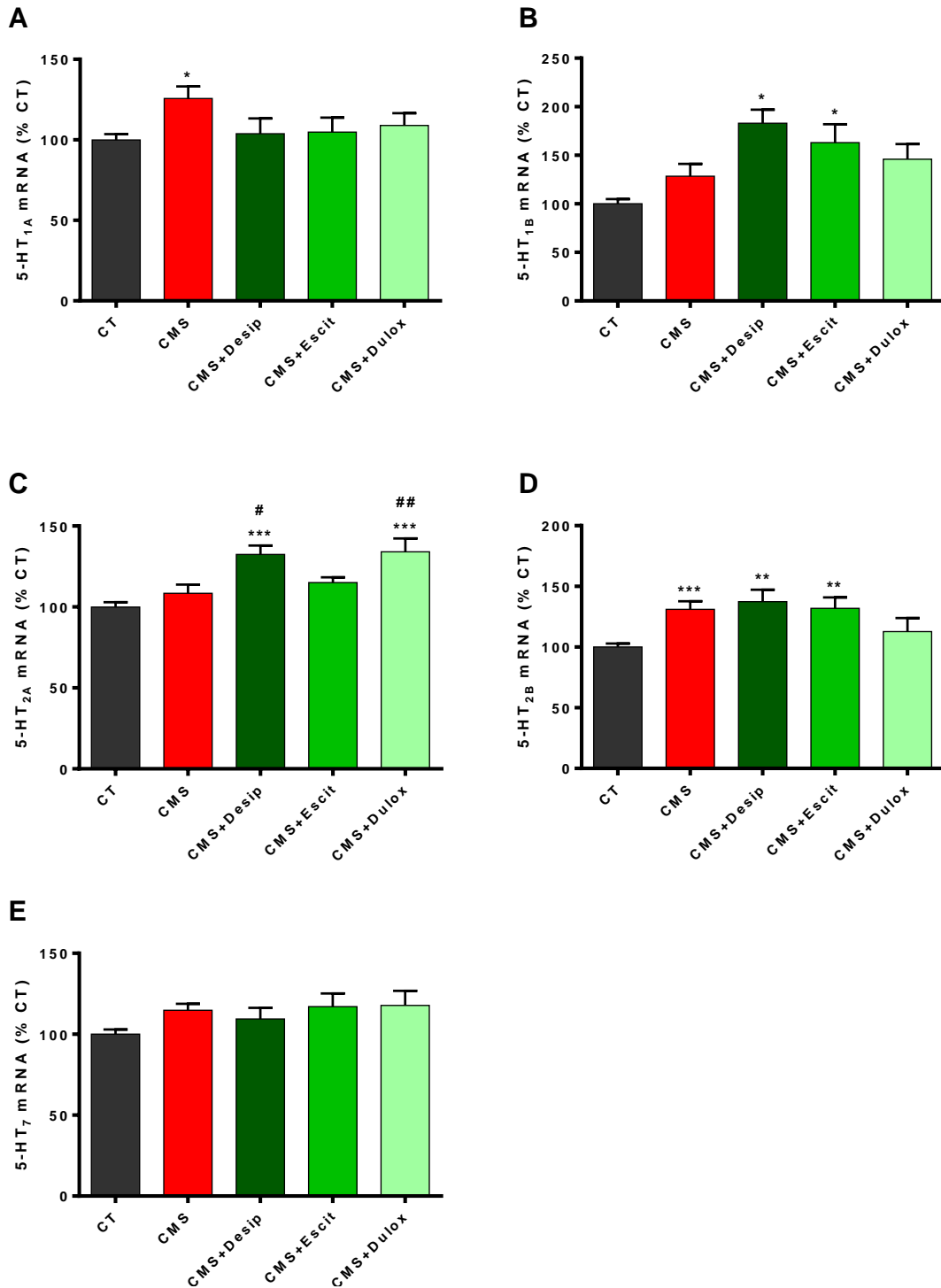


Figura 43. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre la expresión de los receptores de serotonina (5-HT) 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇ en el córtex prefrontal (PFC). Niveles de expresión relativos de mRNA de 5-HT_{1A} (A), 5-HT_{1B} (B), 5-HT_{2A} (C), 5-HT_{2B} (D) y 5-HT₇ (E) en el PFC. Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (CT); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.2.2 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de los transportadores de serotonina (SERT) y noradrenalina (NET) en el PFC

Los transportadores de recaptación de serotonina (SERT) y de noradrenalina (NET) son complejos esenciales en la regulación de estos sistemas de neurotransmisión y, además, representan una de las principales dianas de los antidepresivos más empleados en clínica. El CMS no modificó la expresión de los niveles de SERT e incrementó la de NET en el PFC (Figura 44A,B).

No se registraron efectos con los tratamientos de desipramina y escitalopram, pero la duloxetina indujo la expresión de SERT (Figura 44A).

El tratamiento parece mitigar el aumento en los niveles de los transportadores tras el protocolo de CMS. De hecho, la duloxetina alcanzó significación estadística al compararlo sólo con el CMS ($p=0,0027$; test t de dos colas no pareado con la corrección de Welch) (Figura 44B).

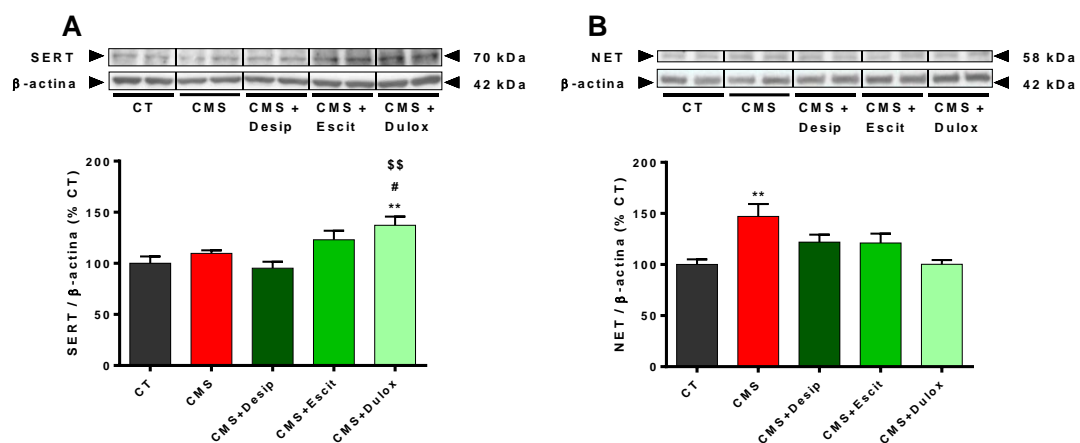


Figura 44. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre la expresión proteica de los transportadores de serotonina (SERT) y noradrenalina (NET) en el córtex prefrontal (PFC). Niveles de expresión proteica de SERT (A) y NET (B) en el (PFC). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; ** $p < 0,01$ vs. control (CT); # $p < 0,05$ vs. CMS; \$\$ $p < 0,01$ vs. CMS+Desipramina. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.2.3 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre las rutas de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) en el PFC

Las citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α) e interleuquina 1 *beta* (IL-1 β) pueden activar las rutas de la IDO-1 y la TDO, desviando el triptófano disponible para la producción de metabolitos de la kinurenina. La expresión de mRNA de TNF- α e IL-1 β en el PFC se incrementó tras el protocolo de CMS (Figura 45A,B). Dicho aumento detectado para ambas

citoquinas respecto a control desapareció con todos los tratamientos para el TNF- α . El escitalopram y la duloxetina también previnieron el de la IL-1 β , pero no la desipramina, aunque consiguió una reversión parcial al comparar sólo frente al grupo de CMS ($p=0,0497$; test t de dos colas no pareado con la corrección de Welsch) (Figura 45A,B).

Tanto los niveles de mRNA y proteína de laIDO-1 como el de mRNA de la TDO aumentaron bajo condiciones de CMS (Figura 45C,D,E). Los antidepresivos consiguieron restaurar a nivel de los controles la expresión proteica de laIDO-1 pero no se modificó la expresión de mRNA de laIDO-1 ni de la TDO (Figura 45E).

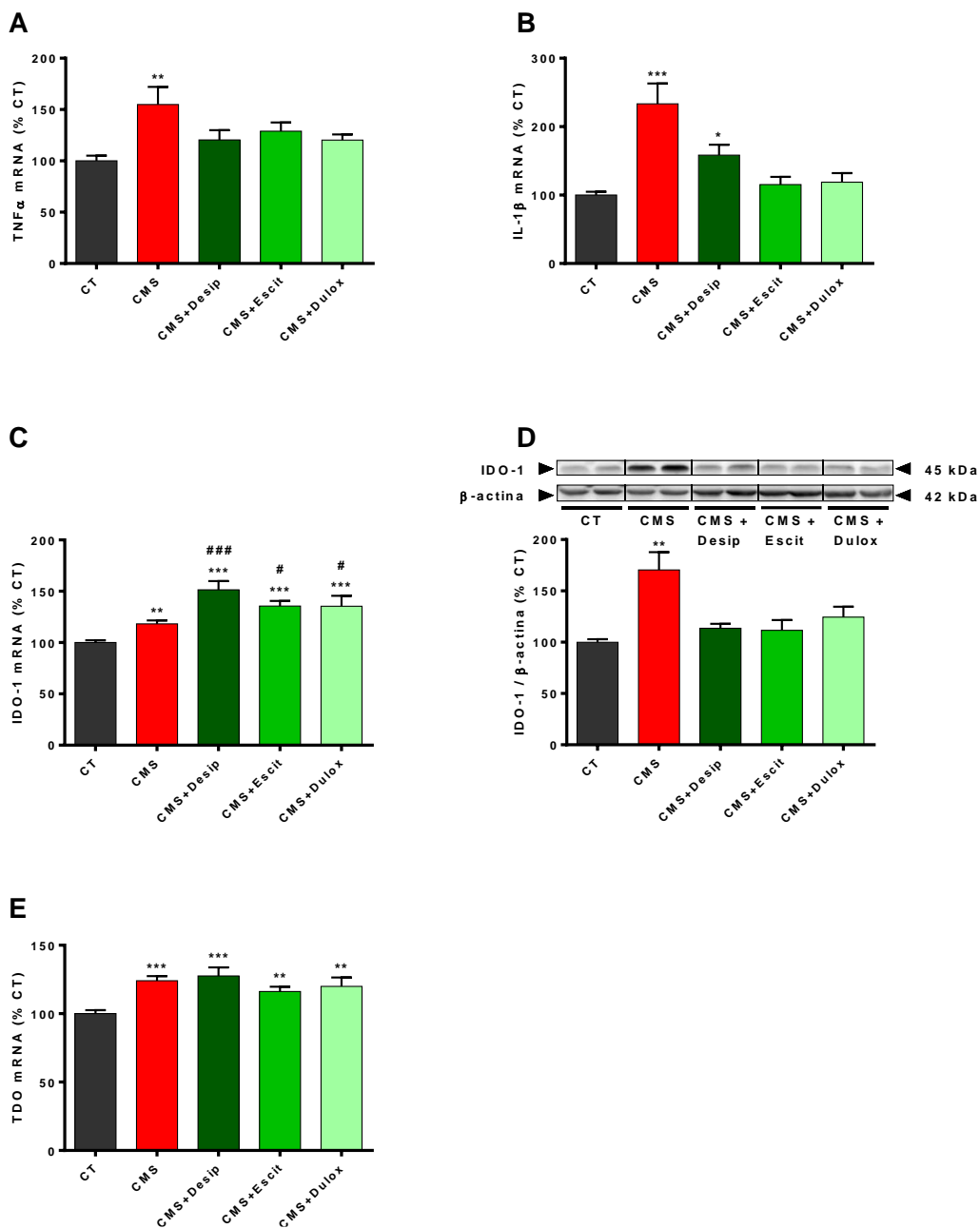


Figura 45. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre las rutas de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO-1) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) en el córtex prefrontal (PFC). Niveles de expresión relativa de mRNA del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (A), la interleuquina 1 β (IL-1 β) (B), IDO-1 (C) y TDO (E) en el PFC y niveles de expresión proteica de IDO-1 (D). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control (CT); # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. CMS. En (B), se analizaron los datos mediante un ANOVA no paramétrico con un test de Kruskal-Wallis seguidos de un *post hoc* de Dunn. En el resto de los datos se realizó un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

1.2.4 Efectos del CMS y el tratamiento con antidepresivos sobre la vía de las kinureninas en el PFC

El ácido quinolínico (QUINA) y el ácido kinurénico (KYNA) son los principales metabolitos de la kinurenina y poseen, respectivamente, propiedades neurotóxicas y neuroprotectoras. Para la síntesis del QUINA es esencial la actividad de la 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa (HaaO) en el penúltimo paso de su producción (el último es una reacción no enzimática) y las tres isoformas de la kinurenina aminotransferasa (KAT) catalizan la transformación de la kinurenina en KYNA, como se ha explicado en la página 92 de la introducción.

El CMS incrementó la expresión de QUINA en el PFC y los antidepresivos evaluados previnieron dicho aumento (Figura 46A). En esta misma dirección, se produjo un aumento de la HaaO sólo en el grupo de CMS (Figura 46B).

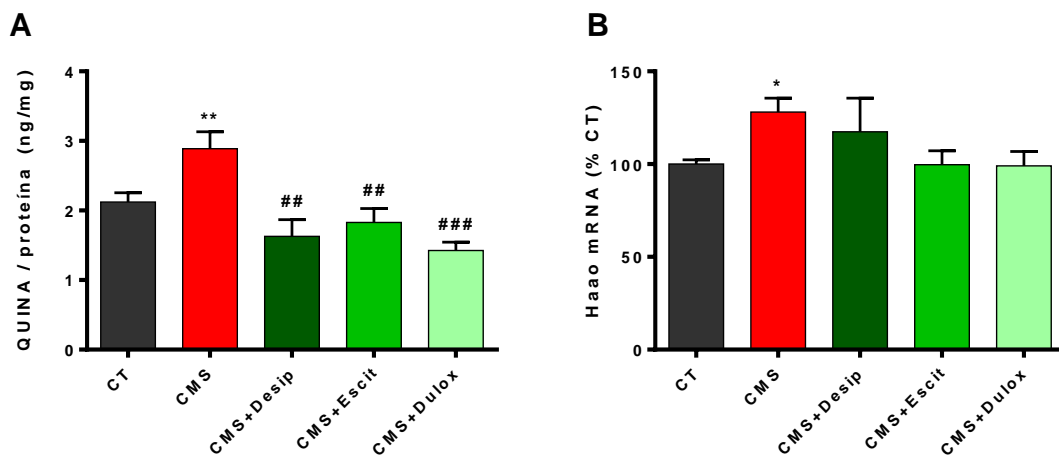


Figura 46. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre el ácido quinolínico (QUINA) en el córtex prefrontal (PFC). Niveles de QUINA (A) y niveles de expresión relativa de mRNA de la 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa (HaaO) (B). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (CT); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

Aunque sin resultar estadísticamente significativo, se observó una tendencia al incremento de los niveles de KYNA en el PFC tras el CMS que los antidepresivos no modificaron (Figura 47 A).

El CMS aumentó la expresión de mRNA de KAT-1, KAT-2 y KAT-3 y el tratamiento con antidepresivos no previno dicho incremento para KAT-2. Además, el incremento en la desipramina resultó estadísticamente significativo en las tres isoformas al comparar con el grupo control (Figura 47B,C,D).

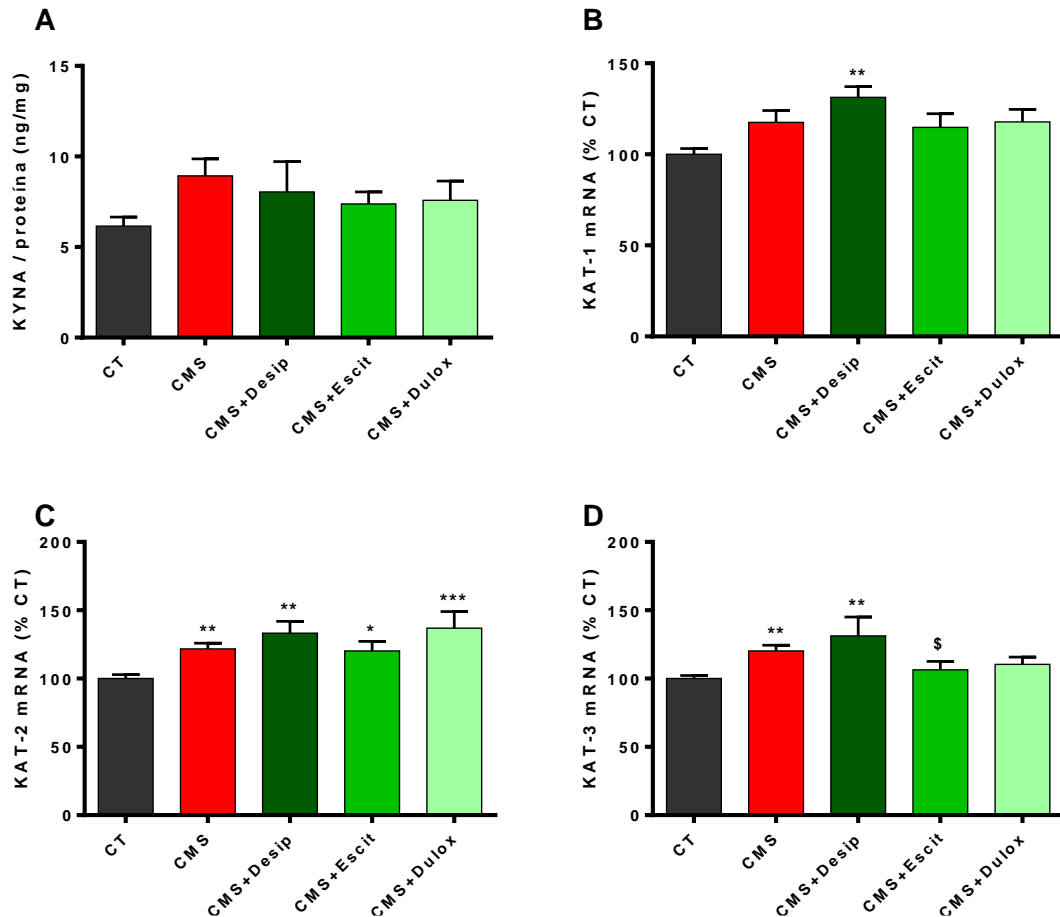


Figura 47. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre el ácido kinurénico (KYNA) en el córtex prefrontal (PFC). Niveles de KYNA (A) y niveles de expresión relativos de mRNA de las isoformas de la kinurenina amino transferasa (KAT) KAT-1 (B), KAT-2 (C), KAT-3 (D). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (CT); \$ $p < 0.05$ vs. CMS+Desipramina. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

Se realizó un ratio entre los niveles de QUINA y KYNA como un posible indicador de riesgo de excitotoxicidad. El CMS aumentó el porcentaje de este ratio frente al control (CT) ($p=0,0436$; test t de dos colas no pareado con corrección de Welch) mostrando los antidepresivos valores cercanos a la ausencia de estrés (Figura 48).

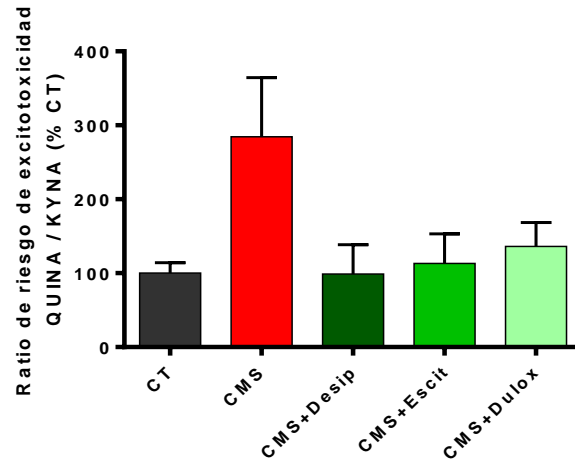


Figura 48. Efectos del CMS y los antidepresivos evaluados sobre el ratio entre los niveles del ácido quinolínico (QUINA) y los de ácido kinurénico (KYNA) en el córtex prefrontal (PFC). Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA no paramétrico con un test de Kruskal-Wallis seguidos de un *post hoc* de Dunn. Desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina.

2. Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS)

La siguiente sección está dedicada al análisis del papel de la traslocación bacteriana desde el colon y la neuroinflamación detectada tras la exposición al CMS.

2.1. Efectos del CMS sobre la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon y las proteínas de las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions*. Impacto del tratamiento con antibióticos.

La expresión de algunos parámetros en el colon está relacionada con la disfunción intestinal que se produce como consecuencia del estrés.

El CMS provocó un aumento en la expresión de la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa 2 (COX-2) en el colon (Figura 49A). La exposición al CMS disminuyó los niveles de la inmunoglobulina A (IgA), primera línea de defensa frente a patógenos en el intestino (Figura 49B). Asimismo, se incrementó la expresión proteica de la quimioquina asociada a la mucosa epitelial 28 (CCL28), que puede ser activada por bacterias y modula la migración de las células que expresan la IgA (Figura 49C). Finalmente, el CMS redujo la proteína *zona occludens 1* (ZO-1) pero no varió la ocludina, ambas proteínas integrantes de las *tight junctions* (Figura 49D,E).

El tratamiento con antibióticos no modificó los cambios provocados por el CMS previamente descritos en COX-2, CCL28 y ZO-1 (Figura 49A,C,E) pero sí previno la disminución de IgA (Figura 48B).

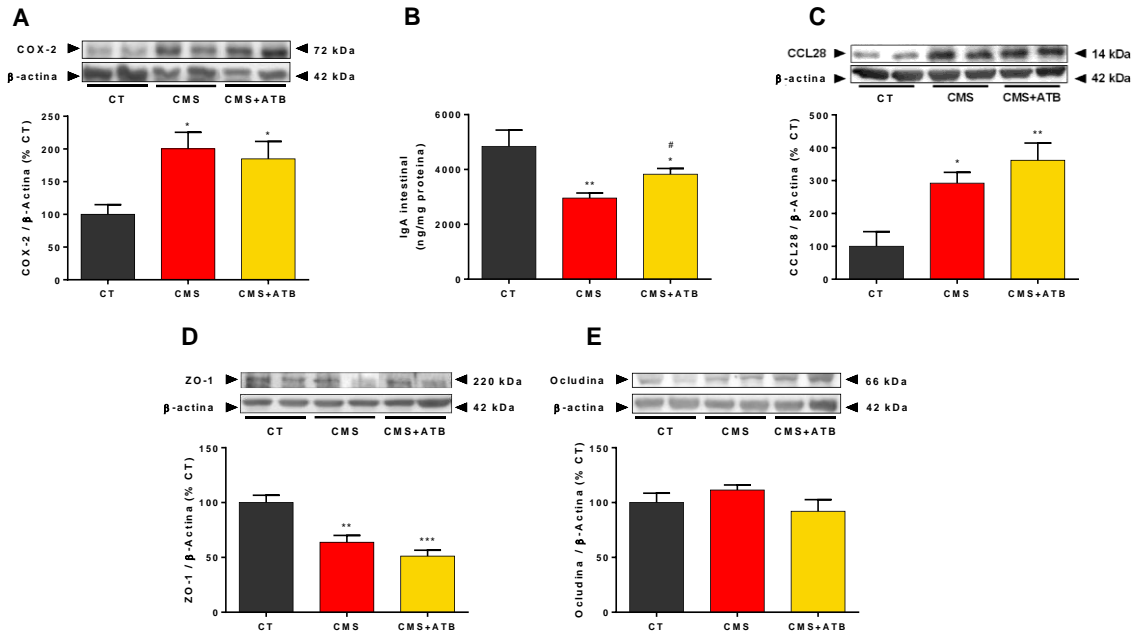


Figura 49. Efectos del CMS sobre la expresión de enzimas proinflamatorias en el colon y las proteínas de las uniones intercelulares estrechas o tight junctions. Impacto del tratamiento con antibióticos. Expresión proteica de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) (A), inmunoglobulina A (IgA) (B), la quimioquina asociada a la mucosa epitelial 28 (CCL28) (C), la zona ocludens 1 (ZO-1) (D) y la ocludina (E). El grupo experimental tratado sólo con antibiótico (CT+ATB) no difirió del grupo control (CT) y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; **p < 0.05; ***p < 0.01; ****p < 0.001 vs. control (CT); #p < 0.05 vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls.

2.2. Efectos del CMS sobre la traslocación bacteriana y acciones del tratamiento con antibióticos

Para evaluar la traslocación bacteriana desde el colon se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) en tejidos periféricos como los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs), bazo, hígado y sangre, así como se determinaron los niveles de lipopolisacárido (LPS) en plasma.

Los GLMs, el bazo y el hígado mostraron UFCs tras el CMS y se identificaron en ellos las cepas de bacterias Gram-positivas *Enterococcus sp.*, *Actinomyces sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus coagulase negative* y las cepas Gram-negativas *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter sp.* y *Morganella morganii* (Figura 50A). No se detectaron UFCs en estos órganos en los grupos control y CMS+ATB ni tampoco en la sangre en ninguno de los grupos experimentales (Figura 50A).

Los animales con cultivos positivos representaron el 62% del grupo CMS y los géneros más prevalentes fueron *Actinomyces sp.* y *Enterococcus sp.* Además, en estos animales se detectaron UFCs en el 75% de los GLMs, el 25% de los bazos y el 50% de los hígados.

Los niveles de LPS en plasma mostraron una clara tendencia al aumento bajo condiciones de CMS comparando con los controles (CT) ($p=0,0595$, test t de dos colas no pareado). El tratamiento con antibióticos disminuyó dicho incremento (Figura 50B).

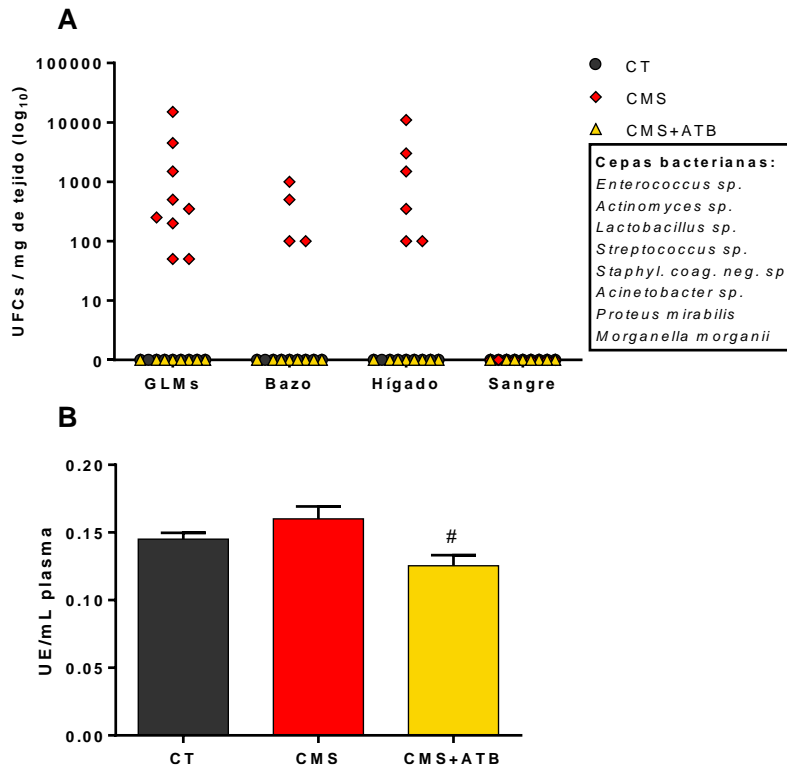


Figura 50. Efectos del CMS sobre la traslocación bacteriana y acciones del tratamiento con antibióticos. Unidades formadoras de colonias (UFCs) en ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs), bazo, hígado y sangre (A) y especies bacterianas (insertado en A). Niveles de lipopolisacárido (LPS) en unidades de endotoxina (UE) / mL de plasma (B). El grupo experimental tratado sólo con antibiótico (CT+ATB) no difirió del grupo control (CT) y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; # $p < 0.05$ vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls.

2.3. Efectos comportamentales del CMS y su modulación por el tratamiento con antibióticos

Se realizó una batería de test comportamentales para evaluar el posible fenotipo de tipo depresivo inducido por el CMS y los efectos del tratamiento con antibióticos.

El tiempo total de inmovilidad en el test de natación forzada modificado (mFST) aumentó tras el CMS, coincidiendo con el descenso en los tiempos de natación y escalada (Figura 51A). El tratamiento con antibióticos a lo largo de todo el CMS redujo la inmovilidad, aumentando la actividad de escalada (Figura 51A).

La anhedonia es una característica de la depresión y el test de preferencia por la sacarosa (SPT) en roedores representa una aproximación para medirla. La ingesta de sacarosa disminuyó al

finalizar el protocolo de CMS (Figura 51B). El grupo CMS+ATB no pudo incluirse en el ensayo porque al estar los antibióticos disueltos en el agua de bebida, el consumo de sacarosa podría verse afectado. El “*splash*” test (ST), otro test para medir el comportamiento anhedónico, se realizó para resolver este problema. Se detectó un descenso en el comportamiento de acicalamiento o *grooming* bajo condiciones de CMS que se mitigó en el grupo CMS+ATB (Figura 51C). El tiempo de latencia aumentó tras el protocolo de CMS y el tratamiento con antibióticos lo restauró hasta valores similares a los de los controles (CT) (Figura 51D).

En el laberinto en cruz elevada (EPM), el CMS disminuyó el tiempo en los brazos abiertos, situación que se dio también en el grupo tratado con antibióticos (Figura 51E). El porcentaje de entradas en los brazos abiertos no sufrió cambios entre los diferentes grupos (Figura 51F).

Como medida fisiológica para evaluar los efectos de la exposición al CMS, se registró la ganancia de peso. Desde el día 0 al 21, el grupo CT incrementó un 19,5% su peso, el grupo CMS un 13,69% (** $p < 0,01$ vs. control (CT); ANOVA de dos vías con *post hoc* de Tukey) y el grupo CMS+ATB un 15,16%.

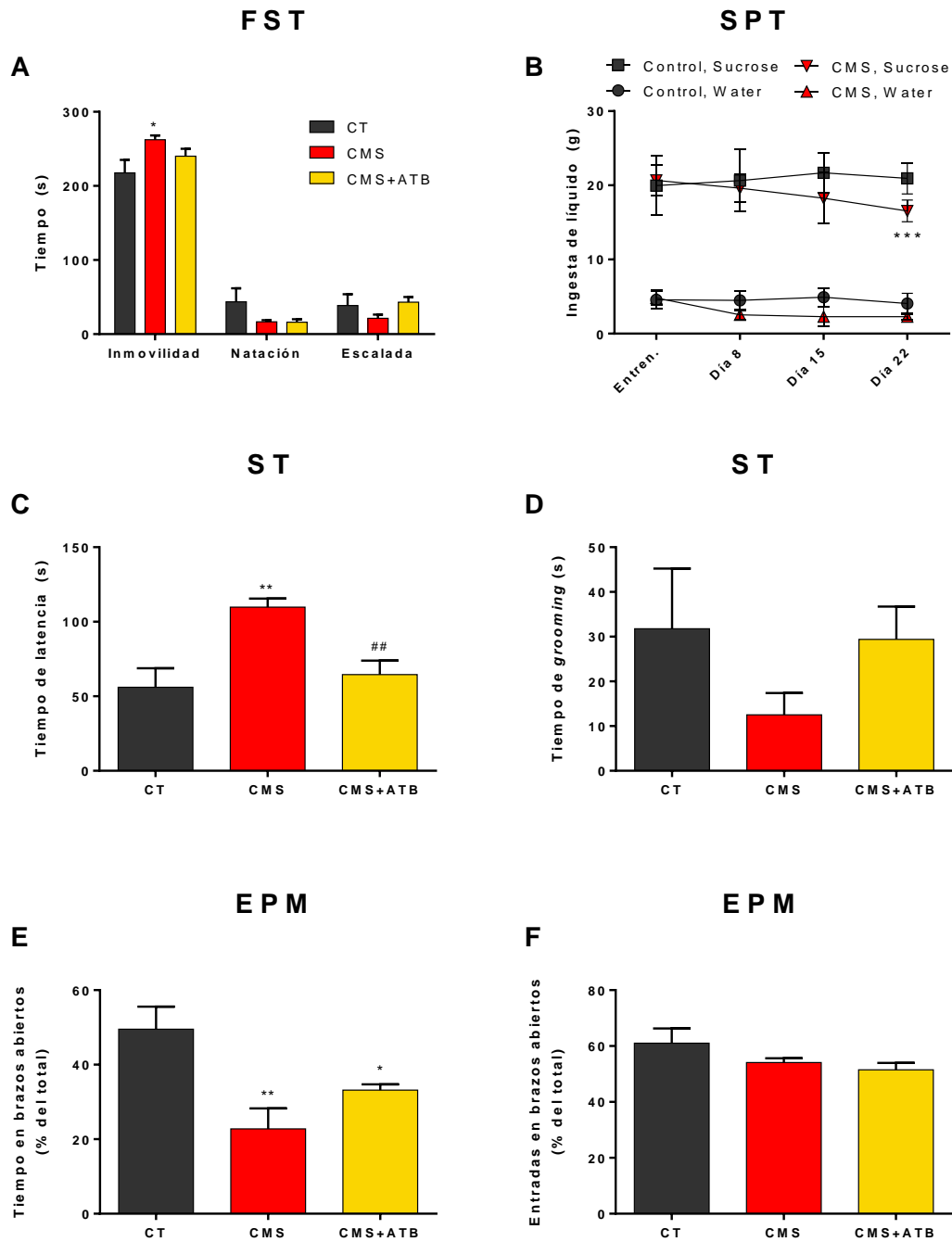


Figura 51. Efectos comportamentales del CMS y su modulación por el tratamiento con antibióticos. Resultados comportamentales del test de natación forzada modificado (mFST) (A), el test de preferencia por la sacarosa (SPT) B, el “splash” test (C,D) y el laberinto en cruz elevada (EPM) (E,F). El grupo experimental tratado sólo con antibiótico (CT+ATB) no difirió del grupo control (CT) y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control (CT); ## $p < 0.01$ vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls, excepto para el test de preferencia por la sacarosa (B) donde se realizó un test t de dos colas no pareado.

2.4. Efectos del CMS y el tratamiento con antibióticos sobre la activación de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en el PFC

Las MAPKs son reguladores clave en importantes procesos celulares como la inflamación, la supervivencia, la apoptosis o la diferenciación. Activadas por fosforilación, las fosfatasas duales específicas (DUSPs) catalizan su defosforilación y, por tanto, regulan su función.

La exposición al CMS aumentó la forma fosforilada (p-) de la MAPK proteína 38 (p-p38) y el tratamiento con antibióticos restauró su expresión (Figura 52A). Los niveles de la quinasa reguladora de la señal extracelular 1/2 (p-ERK1/2) no sufrieron cambios (Figura 51B) pero sí se detectó un descenso en la expresión de la quinasa NH₂-terminal de c-jun (p-JNK) en los grupos del CMS y CMS+ATB respecto a los controles (CT) (Figura 52C).

El tratamiento con antibióticos incrementó significativamente tras el CMS el mRNA de las DUSPs MKP-1 (Figura 52D) y MKP-3 (Figura 52E)

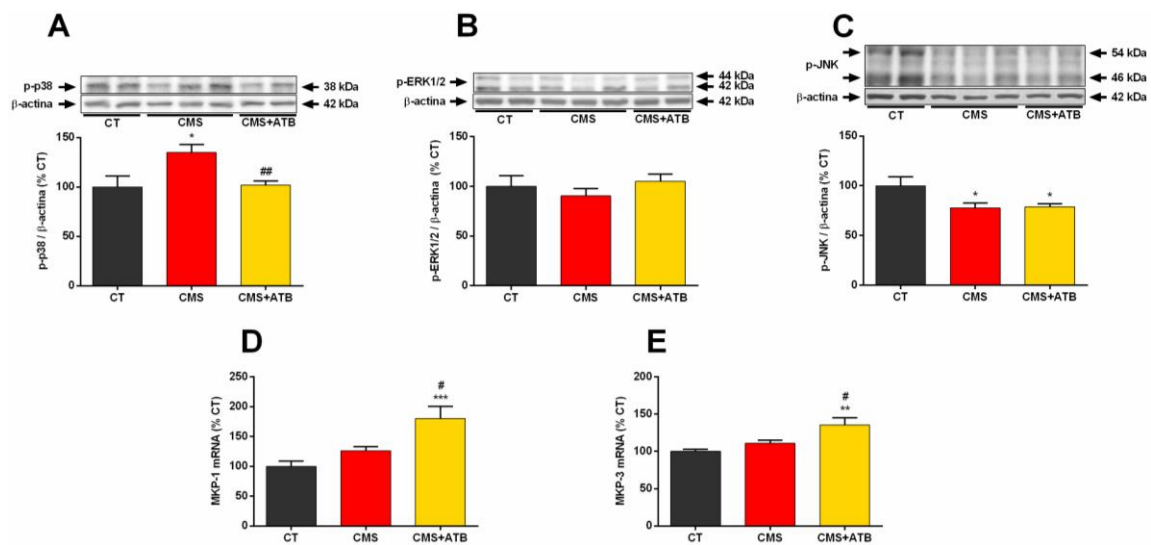


Figura 52. Efectos del CMS y el tratamiento con antibióticos sobre la activación de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en el córtex prefrontal (PFC). Expresión proteica de las formas activas (fosforiladas) de la proteína 38 (p-p38) (A), de la quinasa de la señal extracelular 1/2 (p-ERK1/2) (B) y de la quinasa NH₂-terminal de c-jun (p-JNK) (C) y niveles de expresión relativos de mRNA de las fosfatasas duales específicas (MKP-1) (D) y MKP-3 (E). El grupo experimental tratado sólo con antibiótico (CT+ATB) no difirió del grupo control (CT) y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media ± error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. control (CT); #p < 0.05; ###p < 0.01 vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls.

2.5. Expresión de las MAPKs en diferentes tipos celulares del PFC

Para distinguir los tipos celulares que muestran reactividad frente a las MAPK en el PFC se realizó una inmunohistoquímica doble (Figura 53).

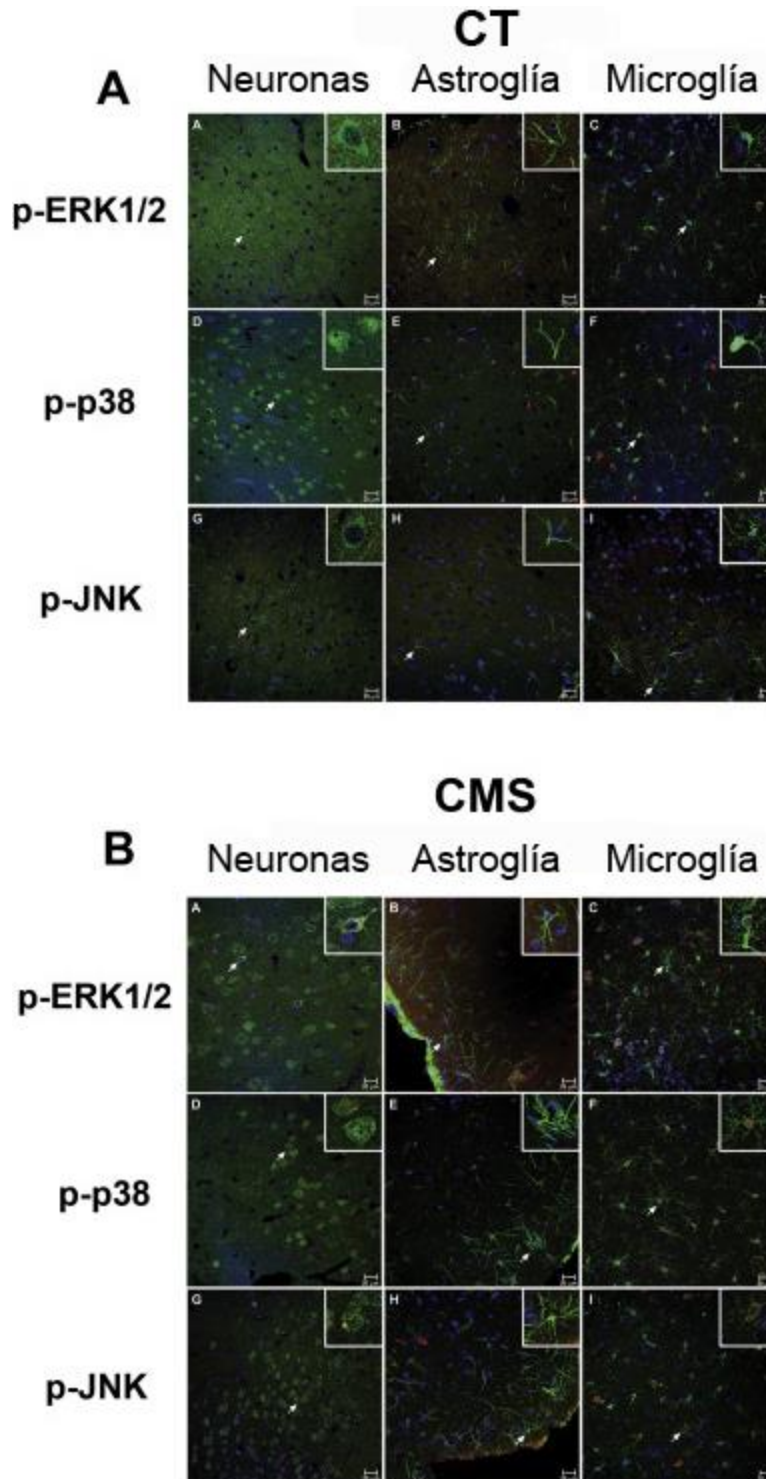


Figura 53. Expresión de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) activadas (fosforiladas) en diferentes tipos celulares del en el córtex prefrontal (PFC). Inmunorreactividad de las formas

fosforiladas de la proteína 38 (p-p38), de la quinasa de la señal extracelular 1/2 (p-ERK1/2) y de la quinasa NH₂-terminal de c-jun (p-JNK) en los controles (CT) (A) y tras el CMS (B). Los respectivos marcadores celulares aparecen en verde: las neuronas se identificaron con NeuN (A,D,G), la astrogía con GFAP (B,E,H) y la microglía con Iba-1 (C,F,I). En todos los casos, las p-MAPK aparecen en rojo. Las flechas blancas señalan las áreas amplificadas de las imágenes y la colocalización de las p-MAPKs con sus respectivos marcadores celulares implican la superposición de los colores, visualizándose en naranja.

Las neuronas y la microglía expresaron visiblemente la forma fosforilada de las MAPKs en el grupo sometido a CMS y en los controles (CT) (Figura 53A,B). Sin embargo, no fue posible detectar esta expresión en para la astrogía en ningún caso (Figura 53A,B).

Los efectos de la exposición al modelo CMS acerca de la activación de las MAPKs pudieron inferirse a nivel cualitativo (Figura 53B). No obstante, indiscutiblemente, son necesarios posteriores análisis más exhaustivos para correlacionar estos resultados con los obtenidos mediante el Western blot y llevar a cabo una caracterización adecuada desde el punto de vista cuantitativo.

2.6. Efectos del CMS sobre la expresión del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2), sus activadores proteína quinasa B (Akt) y fosfoinositol 2-quinasa (PI3K) y su producto glutatión peroxidasa 1 (GPx-1)

El factor antioxidante Nrf2 puede activarse por la acción de PI3K/Akt y ejerce algunas de sus propiedades neuroprotectoras a través de la transcripción de enzimas detoxificantes de fase II como la glutatión peroxidasa 1 (GPx-1).

La exposición al CMS produjo un descenso en los niveles de mRNA de PI3K y Akt (Figura 54A,B) y su expresión proteica, aunque para PI3K la diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 54C,D). El tratamiento con antibióticos no modificó los valores del grupo de CMS, pero mostró una tendencia hacia restaurar el mRNA de Akt ($p=0,057$; test t de dos colas no pareado) (Figura 54B).

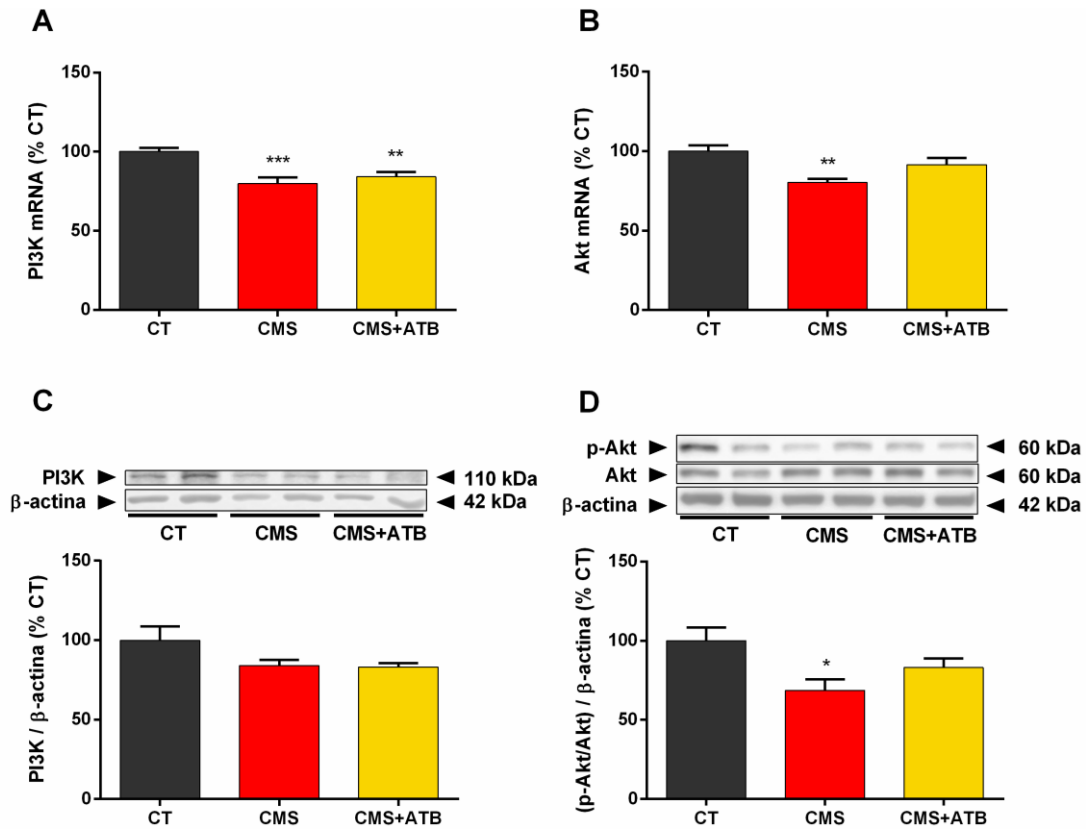


Figura 54. Efectos del CMS sobre la expresión de los activadores del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (*Nrf2*) proteína quinasa B (*Akt*) y fosfoinositol 2-quinasa (*PI3K*). Niveles de expresión relativos de mRNA de *PI3K* (A) y *Akt* (B) y expresión proteica de *PI3K* (C) y *Akt* (D). El grupo experimental tratado sólo con antibiótico (CT+ATB) no difirió del grupo control (CT) y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control (CT). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls.

Tanto la expresión del mRNA como de proteína en el núcleo de *Nrf2* ($p=0,09$) disminuyeron tras el CMS (Figura 55A,B). El CMS también redujo el mRNA de *GPx-1* y el tratamiento con antibióticos lo recuperó parcialmente (Figura 55C).

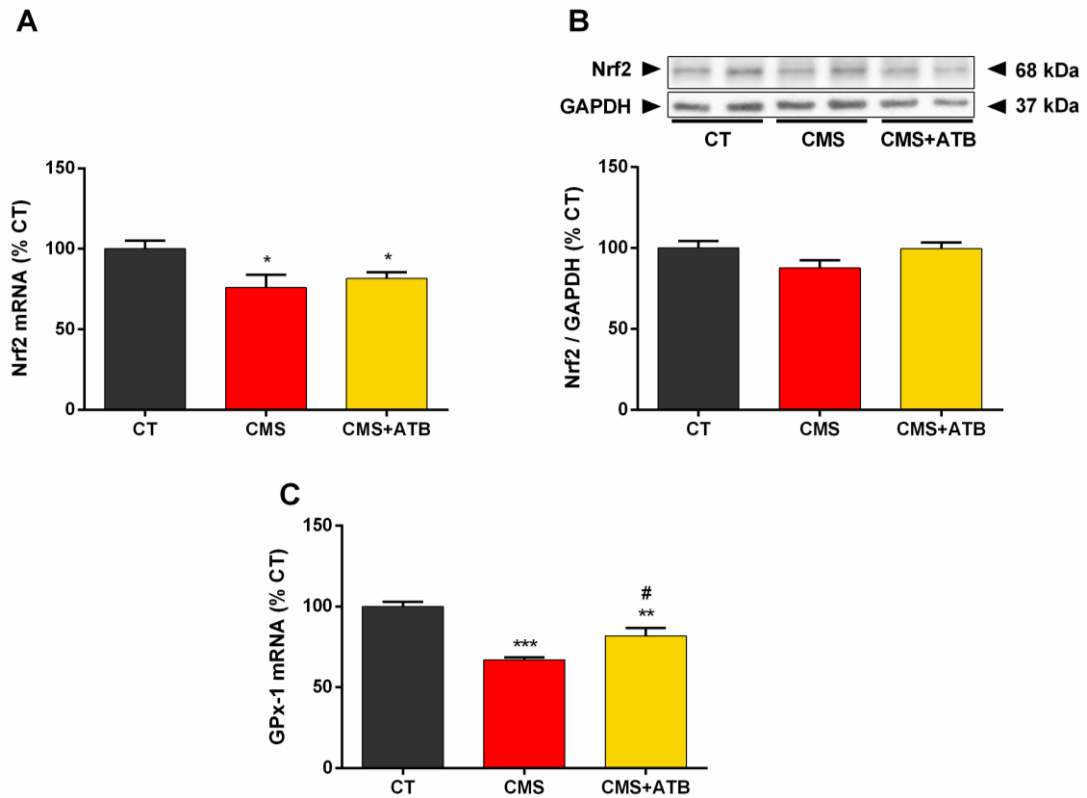


Figura 55. Efectos del CMS sobre la expresión del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2), y su producto la glutatión peroxidasa 1 (GPx-1). Niveles de expresión relativos de mRNA de Nrf2 (A) y GPx-1 (C) y expresión proteica nuclear de Nrf2 (B). El grupo experimental tratado sólo con antibiótico (CT+ATB) no difirió del grupo control (CT) y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control (CT); # $p < 0.05$ vs. CMS. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Newman-Keuls.

3. Conexión entre los efectos comportamentales y la inflamación a través del *sickness behavior* inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones

En este tercer apartado se probaron diferentes hipótesis farmacológicas en un modelo neuroinflamatorio de inyección de LPS en ratón con el fin de evaluar algunos efectos comportamentales relacionados con la depresión. Estos experimentos se realizaron durante una estancia de 3 meses en el MD Anderson Cancer Center en Houston (Texas, EEUU) bajo la dirección del profesor Robert Dantzer y gracias a la beca concedida por la Fundación Boehringer Ingelheim.

3.1. Implicación del bloqueo de la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) sobre los efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la administración de LPS.

La L-leucina (Leu) utiliza el transportador de aminoácidos grandes 1 (LAT-1) para atravesar la barrera hematoencefálica. La kinurenina y el triptófano acceden al cerebro utilizando estos transportadores por lo que la administración oral de L-leucina podría reducir su flujo al cerebro y, por lo tanto, disminuir la producción de metabolitos de la kinurenina por la actividad de la IDO-1.

La utilización de la herramienta farmacológica del bloqueo de dicho transportador en el modelo de LPS, nos llevó a analizar su expresión en el modelo de depresión en rata que se había utilizado en los estudios anteriores, el *chronic mild stress* (CMS) y su modulación por los tratamientos antidepressivos. Los niveles de mRNA de LAT-1 se redujeron tras la exposición al CMS ($p=0,0021$, test t de dos colas no pareado) al comparar únicamente frente al grupo control (CT). Los antidepressivos desipramina y duloxetina previnieron el descenso provocado por el CMS y que sí se registró en el grupo tratado con escitalopram (Figura 56)

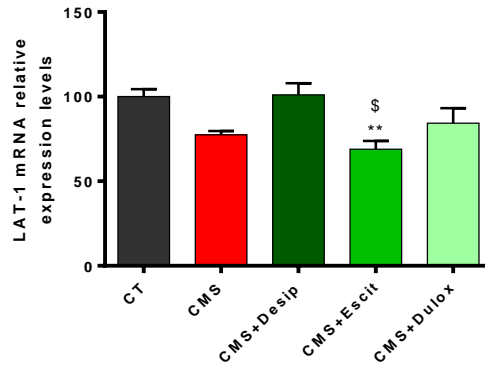


Figura 56. Efectos del chronic mild stress (CMS) y los antidepresivos evaluados sobre el transportador de aminoácido grande 1 (LAT-1). Niveles de expresión relativa de mRNA de LAT-1. Los grupos experimentales inyectados con vehículo no difirieron de los mismos grupos sin la inyección y sus valores se expresan conjuntamente en la figura. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 6-8 ratas por grupo; ** $p < 0.01$, vs. control (CT); § $p < 0.05$ vs. CMS+Desipramina. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Newman-Keuls.

En el modelo inflamatorio en ratón, a parte del ya conocido efecto temporal causado por el LPS en ambos test durante, al menos, las primeras 24 horas ($p < 0,001$), no se registraron diferencias en el SPT ni en el VWR entre los ratones tratados con L-Leucina (LPS+Leu) y el grupo de sólo LPS (LPS+H₂O) (Figura 57A,B). La monitorización del peso corporal y la ingesta de comida como medidas fisiológicas de enfermedad mostraron el descenso normal ($p < 0,001$) durante las primeras 24 horas tras la administración del LPS en ambos grupos, sin diferencias con el tratamiento (Figura 57C,D).

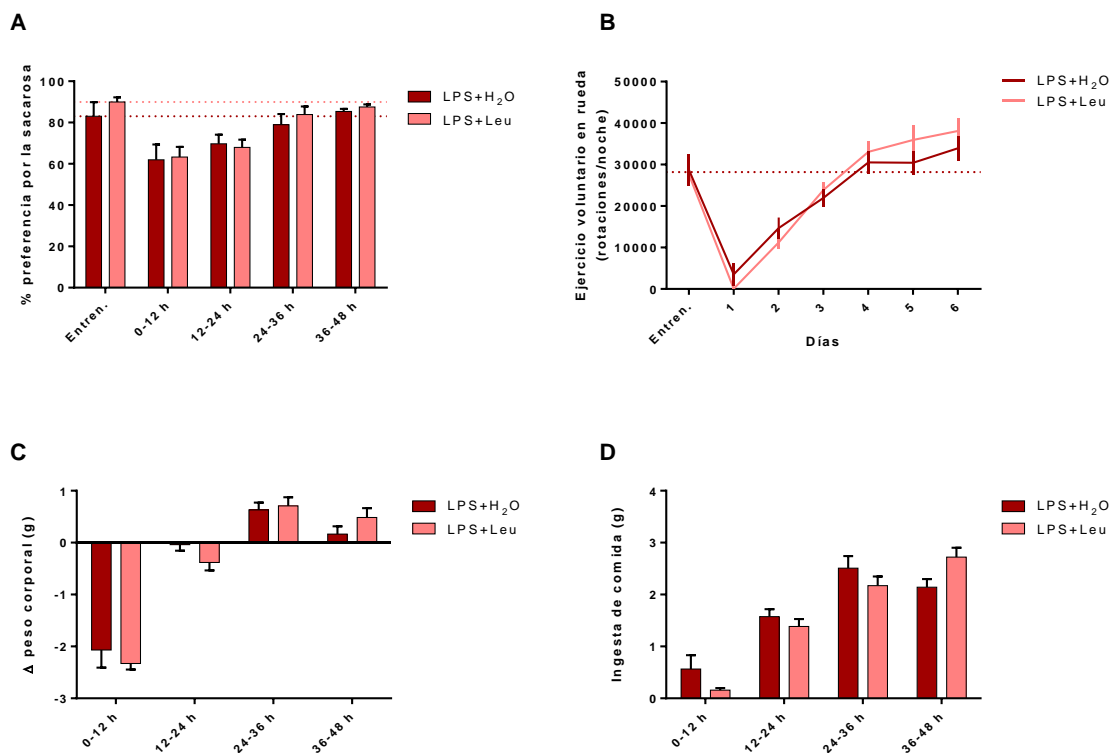


Figura 57. Efectos de la administración oral de L-leucina (Leu) sobre los efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la inyección de lipopolisacárido (LPS). Test de preferencia por la sacarosa (SPT)

(A) y de ejercicio voluntario en rueda (VWR) (B). Registro del incremento (Δ) en el peso corporal (C) y la ingesta de comida (D). Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 8 ratones por grupo; efecto temporal ($p < 0,001$) sin diferencias con el tratamiento en el SPT (A) y el VWR (B); efecto temporal ($p < 0,001$) en los signos fisiológicos de enfermedad (C,D) e interacción ($p = 0,0249$) detectada en la ingesta de comida (D) pero sin diferencias con el tratamiento en ambos casos. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de un *post hoc* de Sidak.

Los mismos estudios se realizaron en algunas hembras *knockout* para la IDO-1 (IDO1^{-/-}) disponibles para su uso y tomando como controles hembras *salvajes* o *wild type* (C57/Bl6), con el objetivo de asegurar la ausencia de la actividad de la IDO-1. Más allá del efecto temporal provocado por la administración del LPS ($p < 0,001$), no hubo diferencias entre los ratones *salvajes* y los transgénicos en el SPT (Figura 58A). Debido a que se registraron diferencias en la línea base conseguida para los IDO1^{-/-} durante el entrenamiento del VWR (Figura 58B), los resultados se normalizaron para cada ratón a su línea base, no mostrando diferencias comportamentales entre grupos (Figura 58C). El peso corporal y la ingesta de comida de los *knockout* IDO1^{-/-} fueron similares a los *salvajes* en cuanto al tratamiento, pero el consumo de comida aumentó en los transgénicos entre las 36-48h (Figura 58D,E)

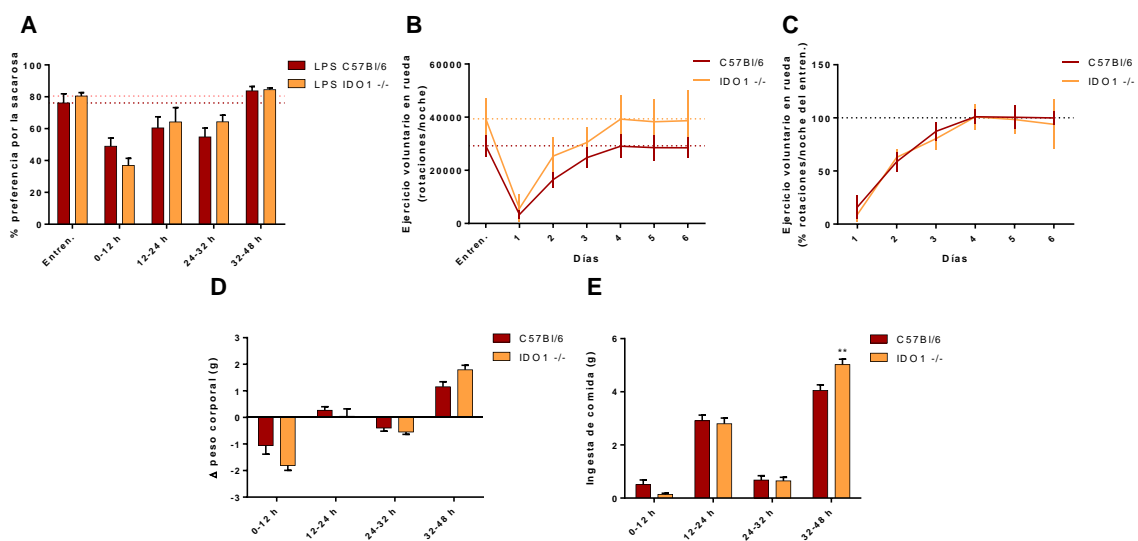


Figura 58. Efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la administración de lipopolisacárido (LPS) en ratones *knockout* para IDO-1 (IDO1^{-/-}) y *salvajes* (C57/Bl6). Test de preferencia por la sacarosa (SPT) (A) y de ejercicio voluntario en rueda (VWR) (B,C). Registro del incremento (Δ) en el peso corporal (D) y la ingesta de comida (E). Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 5-8 ratones por grupo; efecto temporal ($p < 0,001$) sin diferencias con el tratamiento en el SPT (A) y el VWR (B,C); efecto temporal ($p < 0,001$) en los signos fisiológicos de enfermedad (D,E) e interacción ($p = 0,0297$ para (D), $p = 0,076$ para (E)), ** $p < 0,01$ vs.C57Bl/6. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de un *post hoc* de Sidak.

3.2. Implicación del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) en los efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la administración de LPS

El FGF-21 se produce en la periferia y puede atravesar la barrera hematoencefálica actuando en el núcleo paraventricular del hipotálamo y resultando en la supresión de la ingesta de azúcares y soluciones dulces. La inflamación y el estrés pueden inducir su expresión y estudios previos demostraron un incremento en los niveles hepáticos de mRNA del FGF-21 a las 24 horas tras la administración de LPS (Laumet et. al, en preparación).

La neutralización de la señal periférica del FGF-21 restauró la preferencia por la sacarosa a las 12-24 horas tras la inyección de LPS (Figura 59A). No hubo diferencias entre los grupos que recibieron el LPS en el test de natación forzada de Porsolt (FST) (Figura 59B) ni en las medidas fisiológicas relacionadas con la enfermedad (Figura 59C,D).

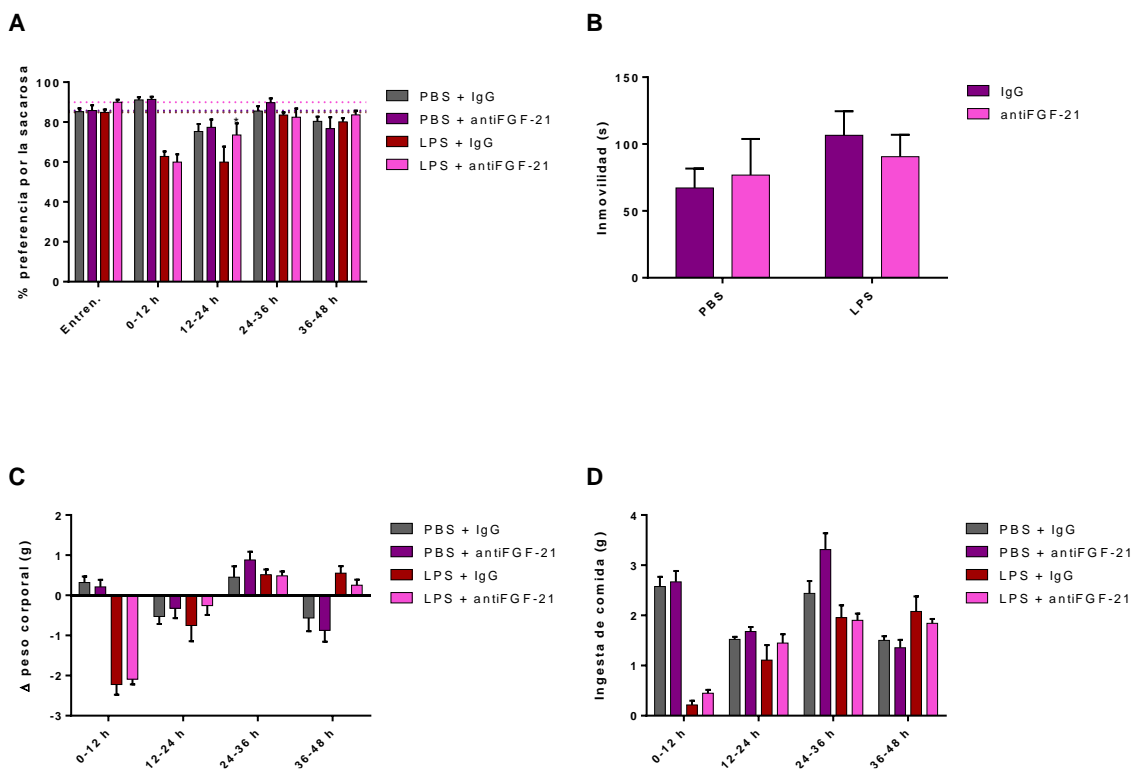


Figura 59. Implicación del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) en los efectos comportamentales y fisiológicos inducidos por la administración de lipopolisacárido (LPS). Test de preferencia por la sacarosa (SPT) (A) y de natación forzada de Porsolt (FST) (B). Registro del incremento (Δ) en el peso corporal (C) y la ingesta de comida (D). Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 4 ratones por grupo; efecto temporal ($p < 0,001$), de tratamiento ($p = 0,0321$) e interacción ($p < 0,001$), * $p < 0,05$ vs. LPS + IgG (A); sin efectos en el FST (B); efecto temporal ($p < 0,001$), de tratamiento ($p < 0,001$) e interacción ($p < 0,001$) en los signos fisiológicos de enfermedad (C,D). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de un *post hoc* de Sidak.

4. Activación neuroinflamatoria en depresión y resistencia al tratamiento: estudios en cerebros humanos *post-mortem*

Este último bloque de resultados trata sobre la inflamación en cerebros humanos *post-mortem* de pacientes depresivos que fallecieron por suicidio, su comparación con individuos control y la exploración de resistencias al tratamiento basadas en la presencia de trazas de antidepresivos en plasma. Las muestras se obtuvieron gracias a la colaboración con el grupo de Javier Meana de la Universidad del País Vasco y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (UPV/CIBERSAM).

4.1. Efectos del trastorno depresivo mayor (MDD) y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión del receptor *Toll-like 4* (TLR-4), sus ligandos endógenos las proteínas de choque térmico 60 (Hsp 60) y 70 (Hsp 70) y el factor nuclear *kappa B* (NF- κ B)

El TLR-4 es un receptor de inmunidad innata clave en los trastornos psiquiátricos y puede activarse por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como las proteínas de choque térmico (Hsp) 60 y 70. La activación del TLR-4 promueve la acción del factor nuclear *kappa B* (NF- κ B), uno de los principales protagonistas de la respuesta proinflamatoria en la célula.

No hubo diferencias en la expresión de TLR-4 entre pacientes con depresión mayor (MDD) y los controles (CT) (Figura 60A) pero, dentro de los MDD, el grupo que en el momento de la muerte estaba recibiendo antidepresivos mostró una tendencia hacia la reducción de los niveles de TLR-4 con respecto a sus controles pareados (Figura 60B).

Los niveles de Hsp 60 no se modificaron entre los diferentes grupos (Figura 60C,D). Para la Hsp 70, se registró un incremento en los pacientes con MDD respecto a sus controles pareados (Figura 60E), desapareciendo la significación estadística al separar entre tratados y no tratados (Figura 60F).

Respecto a la expresión nuclear de NF- κ B, se observó un descenso en los pacientes con MDD (Figura 60G). Sin embargo, al diferenciar entre pacientes sin y con tratamiento no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 60H).

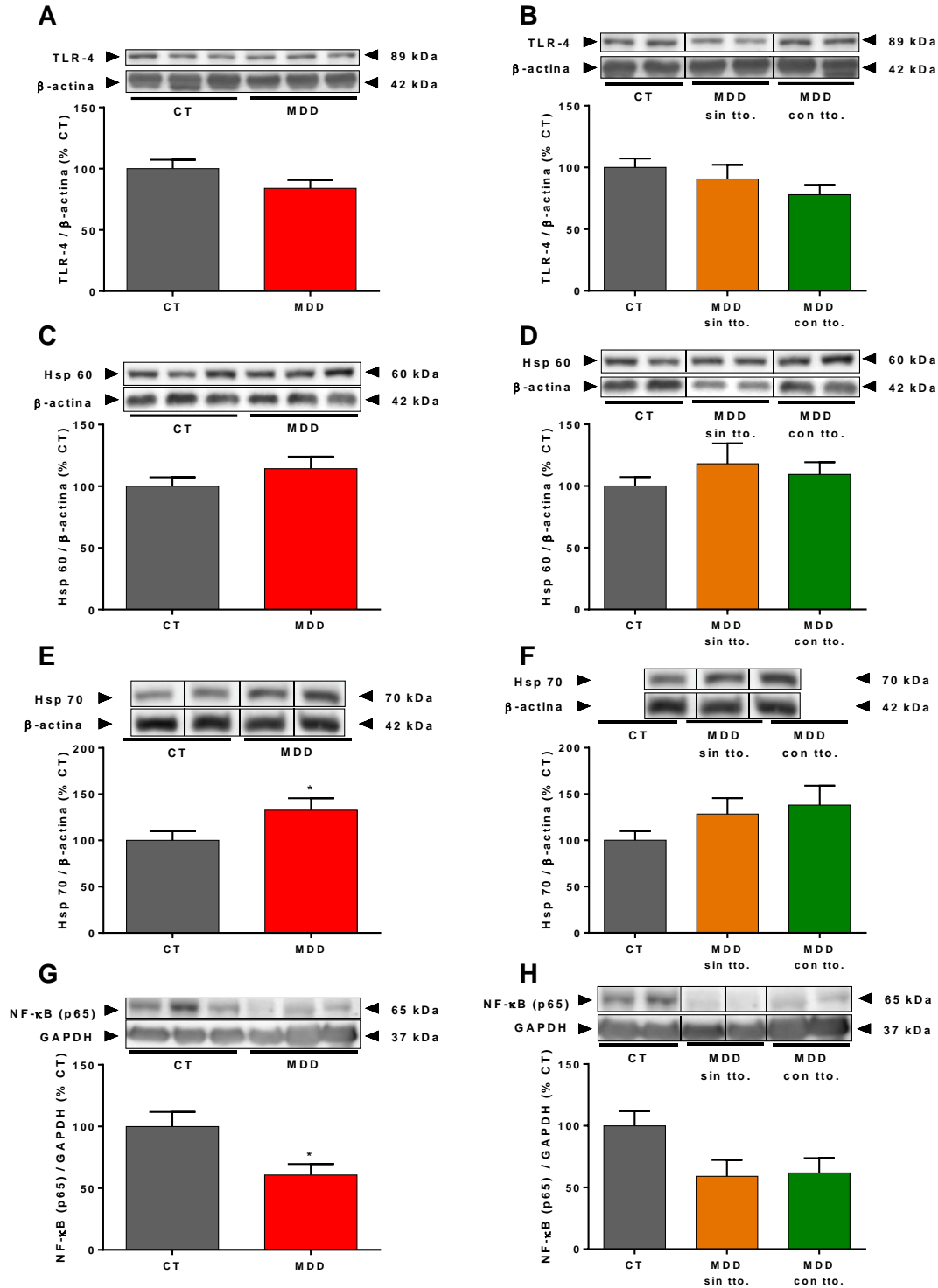


Figura 60. Efectos de la depresión mayor y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión del receptor Toll-like 4 (TLR-4, sus ligandos endógenos las proteínas de choque térmico 60 (Hsp 60) y 70 (Hsp 70) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B). Expresión proteica de TLR-4 (A,B), Hsp 60 (C,D), Hsp 70 y NF- κ B (E,F) en pacientes con trastorno depresivo mayor (MDD) frente a controles (CT) (A,C,E) y separando los

pacientes sin tratamiento (MDD sin tto.) y con tratamiento (MDD con tto.) (B,D,F). Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. La densitometría de cada proteína se normalizó con *beta* actina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como controles de carga según su localización celular. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 36 individuos CT y MDD por grupo, dividiéndose estos últimos en 18 sin tto. y 18 con tto.; * $p < 0,05$ vs. control (CT). Los datos se analizaron mediante un test t de Student no pareada (A,C,E) y una ANOVA de una vía seguidos de un post hoc de Dunnet vs CT (B,D,F).

4.2. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el regulador de su actividad fosfatasa dual específica 2 (DUSP2/PAC-1)

Las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son activadas por fosforilación y controlan importantes procesos celulares relacionados con la inflamación, la apoptosis y la supervivencia y diferenciación celulares. Su defosforilación es tarea de las fosfatasas duales específicas (DUSPs), entre las cuales la DUSP2 posee localización nuclear.

Las quinasas reguladoras de la señal extracelular (ERK) 1/2, la quinasa proteína 38 (p38) y las quinasas NH₂-terminales de c-jun (JNK) aumentaron en los pacientes con MDD (Figura 61A,C,E), específicamente en aquellos tratados hasta el fallecimiento (Figura 61B,D,F).

Los pacientes con MDD mostraron niveles menores de expresión nuclear de DUSP2 (Figura 61G). Este descenso fue significativo para el grupo tratado con antidepresivos, aunque los pacientes sin tratamiento mostraron una tendencia en esta misma dirección (Figura 61H).

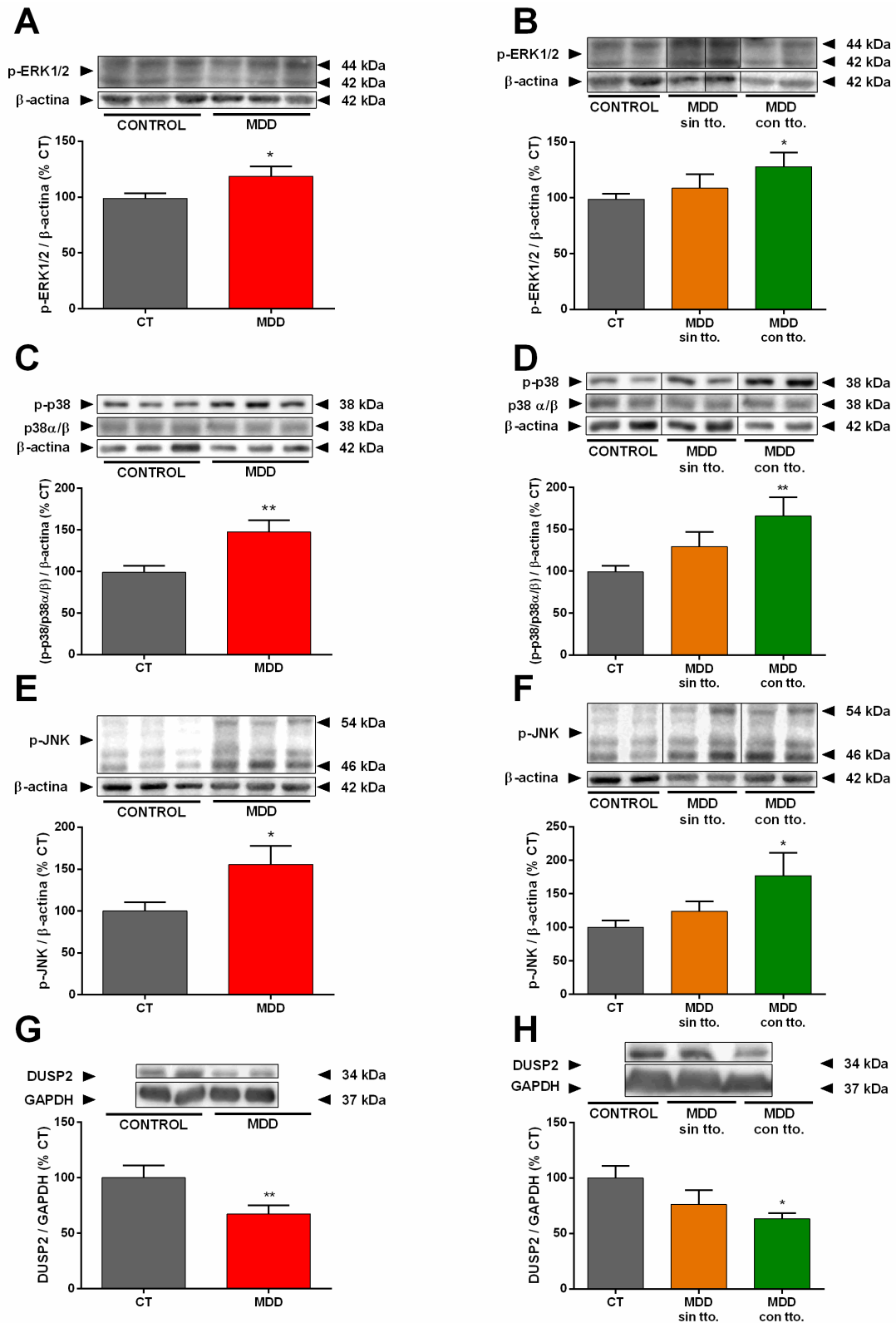


Figura 61. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el regulador de su actividad fosfatasa dual específica 2 (DUSP2/PAC-1). Expresión proteica del ratio fosfo-quinasa regulatoria de la señal extracelular 1/2 (p-ERK1/2) (A,B), fosfo-proteína 38/proteína 38 (p-p38/p38 α / β) (C,D), fosfo-quinasa NH2-terminal de c-jun (p-JNK) (E,F) y fosfatasa dual específica 2 (DUSP2) (G,H) en pacientes con trastorno depresivo mayor (MDD) frente a controles (CT) (A,C,E,G) y separando los pacientes sin tratamiento (MDD sin tto.) y con tratamiento (MDD con tto.)

con tto.) (B,D,F,H). Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. La densitometría de cada proteína se normalizó con beta actina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como controles de carga según su localización celular. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 36 individuos CT y MDD por grupo, dividiéndose estos últimos en 18 sin tto. y 18 con tto.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control (CT). Los datos se analizaron mediante un test t de Student no pareada (A,C,E,G) y una ANOVA de una vía seguidos de un post hoc de Dunnet vs CT (B,D,F,H).

4.3. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2)

El sistema antioxidante del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) puede activarse por la acción de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y su principal inhibidor directo es la proteína asociada a ECH tipo Kelch 1 (Keap-1).

Los pacientes con MDD tuvieron niveles de expresión más bajos de PI3K (Figura 62A), siendo los del grupo con tratamiento antidepresivo inferiores a los del grupo sin tratamiento (Figura 62B).

Se detectó una tendencia al aumento de la expresión de Keap-1 en los individuos con MDD sin influencia del tratamiento (Figura 62C,D).

En el área 9 de Brodmann (BA9) del PFC, los pacientes con MDD mostraron una expresión más reducida de Nrf2 en el núcleo (Figura 62E), manteniendo la significación estadística únicamente en el grupo tratado con antidepresivos al separar los MDD en función de la presencia o ausencia del tratamiento (Figura 62F).

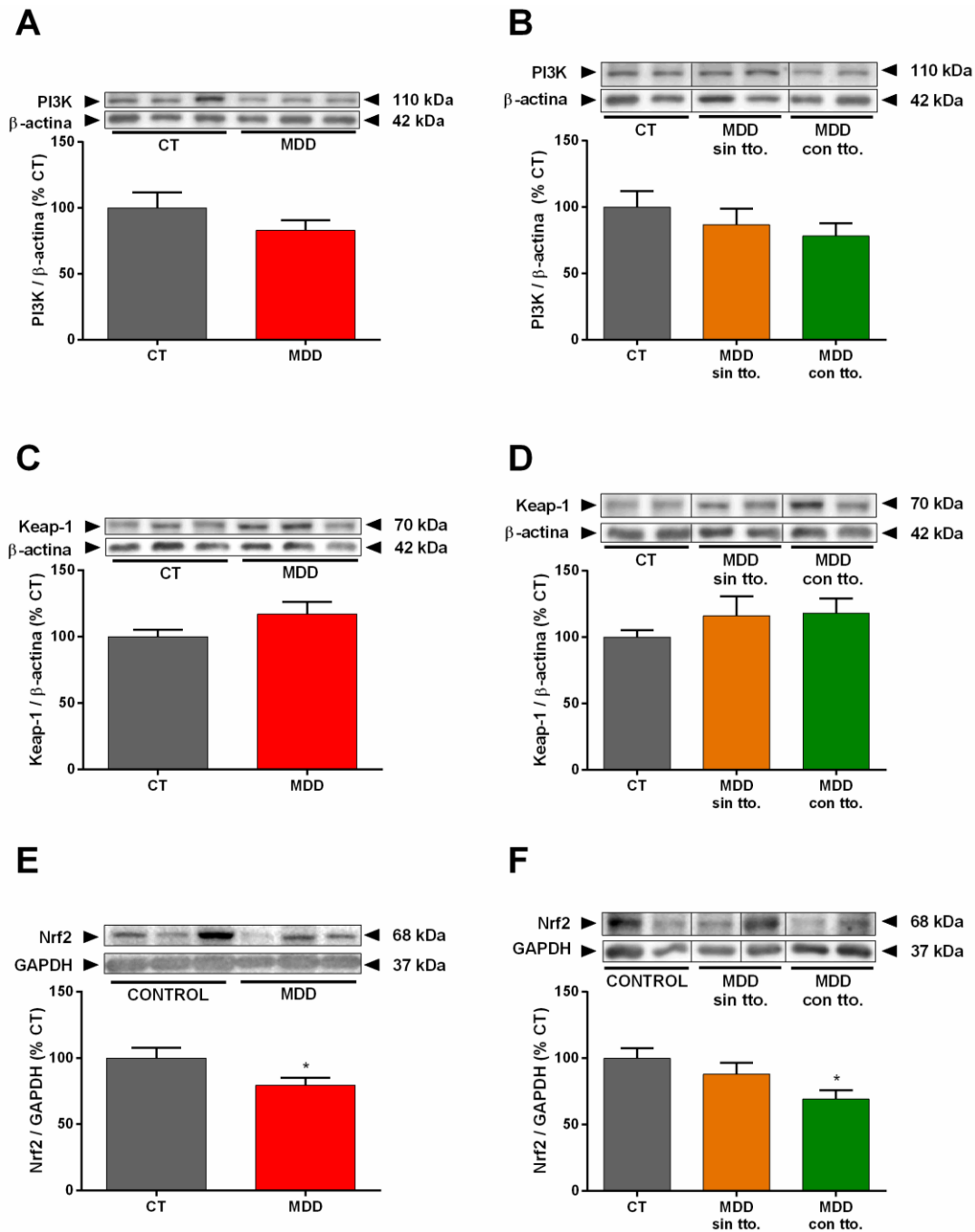


Figura 62. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2). Expresión proteica de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (A,B), la proteína asociada a ECH tipo Kelch 1 (Keap-1) (C,D) y el Nrf2 (E,F) en pacientes con trastorno depresivo mayor (MDD) frente a controles (CT) (A,C,E) y separando los pacientes sin tratamiento (MDD sin tto.) y con tratamiento (MDD con tto.) (B,D,F). Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. La densitometría de cada proteína se normalizó con beta actina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como controles de carga según su localización celular. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 36 individuos CT y MDD por grupo, dividiéndose estos últimos en 18 sin tto. y 18 con tto.; * $p < 0,05$ vs. control (CT). Los datos se analizaron mediante un test t de Student no pareada (A,C,E) y una ANOVA de una vía seguidos de un post hoc de Dunnet vs CT (B,D,F).

4.4. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de la proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10) y la proteína extra grande del linfoma de células B (Bcl-xL)

La proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10), también conocida como proteína 11 (p11), juega un papel en la disposición de los receptores de serotonina (5-HT) en la membrana plasmática. No se detectaron diferencias en su expresión entre los pacientes con MDD y los controles (Figura 63A), pero en el grupo tratado con antidepresivos aumentó respecto a sus controles pareados (Figura 63B).

Uno de los posibles productos de la activación de las MAPKs es la proteína extra grande del linfoma de células B (Bcl-xL), de características anti-apoptóticas. Sus niveles aparecieron aumentados en tejido cerebral de pacientes con MDD sin diferencias entre los tratados o no tratados con antidepresivos (Figura 63C,D).

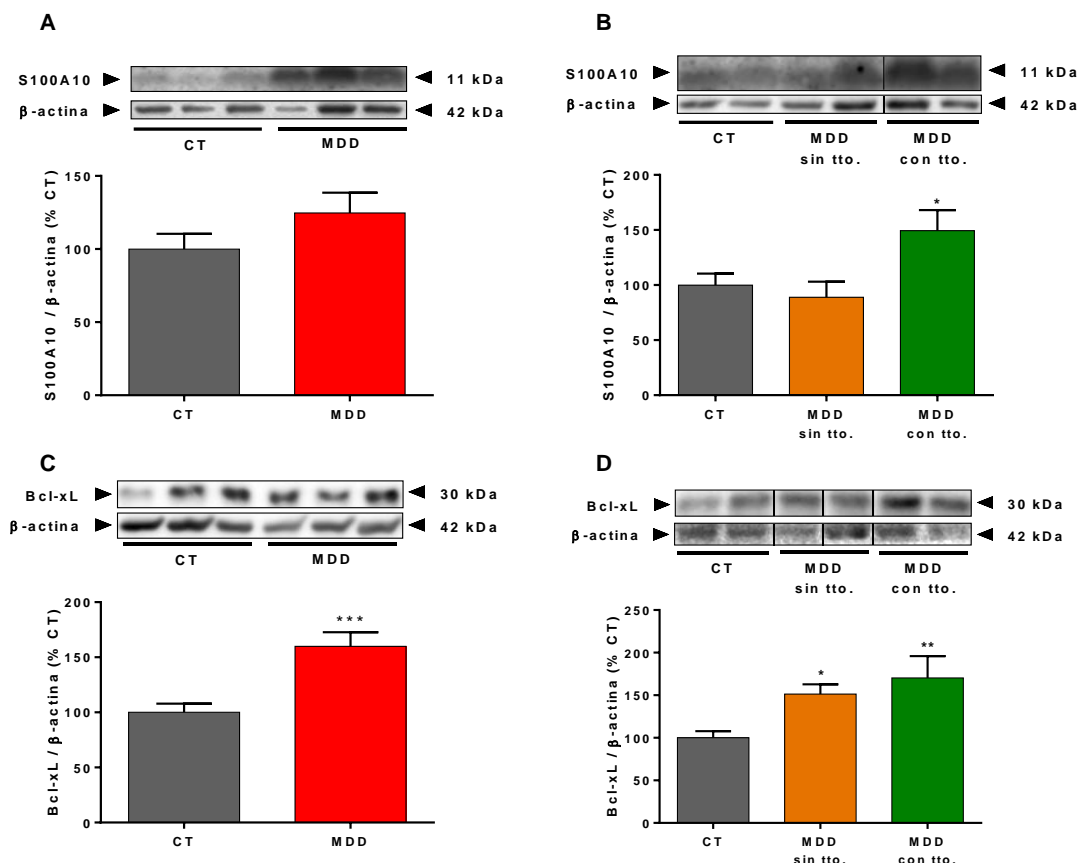


Figura 63. Efectos del MDD y el tratamiento con antidepresivos sobre la expresión de la proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10) y la proteína extra grande del linfoma de células B (Bcl-xL). Expresión proteica de S100A10 (A,B) y Bcl-xL (C,D) en pacientes con trastorno depresivo mayor (MDD) frente a controles (CT) (A,C) y separando los pacientes sin tratamiento (MDD sin tto.) y con tratamiento (MDD con tto.) (B,D). Las imágenes del Western blot se recortaron (bandas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. La densitometría de cada proteína se normalizó con beta actina como

control de carga. Los datos son la media \pm error estándar de la media (SEM) de 36 individuos CT y MDD por grupo, dividiéndose estos últimos en 18 sin tto. y 18 con tto.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control (CT). Los datos se analizaron mediante un test t de Student no pareada (A,C) y una ANOVA de una vía seguidos de un post hoc de Dunnet vs CT (B,D).

V) Discusión

1. *Efectos de los antidepresivos sobre la neuroinflamación inducida por el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)*
2. *Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión chronic mild stress (CMS)*
3. *Conexión entre los efectos comportamentales y la inflamación a través del sickness behavior inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones*
4. *Activación neuroinflamatoria en depresión y resistencia al tratamiento: estudios en cerebros humanos post-mortem*

1. Efectos de los antidepresivos sobre la neuroinflamación inducida por el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS)

En la primera sección de la discusión que comprende los puntos 1.1 y 1.2 se discuten los efectos de los antidepresivos sobre el CMS. Dichos efectos se infieren como terapéuticos, ya que la administración de los fármacos se realizó a lo largo de la última semana del protocolo de CMS, cuando los animales llevaban sometidos al estrés 14 días. Si bien es cierto que no se realizaron test comportamentales justo antes del comienzo del tratamiento (en el día 14), la exposición crónica al estrés durante 14 días parece suficiente para pensar que, al menos, algunos síntomas comportamentales o cambios bioquímicos podrían estar ya manifestándose. De hecho, en los análisis del curso temporal que realizamos y del que no mostramos resultados por tratarse de un experimento piloto con un tamaño muestral muy bajo que dificulta el análisis estadístico, algunas de estas alteraciones bioquímicas comenzaban a registrarse ya el día 14 del CMS. Es por este motivo por el que nos referiremos a los efectos de los antidepresivos como terapéuticos.

1.1. Efectos del CMS y los antidepresivos sobre la ruta del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) en el PFC y el hipocampo

El primer bloque de resultados derivados del estudio sobre los efectos de los antidepresivos mostró que la exposición a un modelo experimental de depresión, el CMS, disminuye la expresión de la ruta antioxidante del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) y podría estar involucrado en el aumento de los niveles de estrés oxidativo/nitrosativo detectado en el córtex prefrontal (PFC) de rata. Curiosamente, este descenso puede estar modulado por el tratamiento con antidepresivos a dosis previamente reportadas como eficaces en la reversión del fenotipo de tipo depresivo provocado por el CMS. La situación en el hipocampo es diferente y no se observaron cambios en la ruta de Nrf2, sugiriendo que el escenario neuroinflamatorio que se produce en el CMS posee mecanismos de acción diferenciales en función del área cerebral.

Se ha demostrado que los ratones *knockout* de Nrf2 desarrollan un fenotipo de tipo depresivo (Martin-de-Saavedra et al., 2013) y algunas investigaciones señalan un rol potencial de Nrf2 en

el modelo de estrés de aislamiento social crónico en rata (Djordjevic et al., 2015). Por ello, la ruta de Nrf2, incluyendo sus activadores y productos, se ha postulado como una de las nuevas potenciales dianas farmacológicas en depresión (Maes et al., 2012a).

La fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (Akt) son activadores del factor antioxidante Nrf2 por lo que pueden incrementar su transcripción (Sun et al., 2007). Nuestro estudio reveló una disminución en la expresión de PI3K/Akt en el PFC y el hipocampo tras la exposición al CMS. El tratamiento con antidepresivos mostró una tendencia hacia el aumento del complejo PI3K/Akt, concretamente, la desipramina y la duloxetina en el PFC, y el escitalopram y la duloxetina en el hipocampo.

En condiciones basales, la proteína asociada a ECH tipo Kelch (Keap-1) impide la actividad de Nrf2 al retenerlo en el citoplasma y lo marca para su degradación por el proteasoma mediante la interacción con una ubiquitina ligasa (Rojo et al., 2008a). La glucógeno sintasa quinasa 3 *beta* (GSK-3 β), al activarse, es otro inhibidor de la actividad de Nrf2 al expulsarlo del núcleo e impedir que desarrolle la producción de enzimas antioxidantes (Rojo et al., 2008b).

Algunos estímulos, entre los que se encuentra el estrés oxidativo, inducen la disrupción del complejo Nrf2/Keap-1 liberando a Nrf2 y permitiendo su translocación al núcleo para ejercer su actividad antioxidante (He y Ma, 2009). En nuestros resultados se apreció un incremento en los niveles de Keap-1 tras el CMS que podría estar relacionado con la disminución de la expresión nuclear de Nrf2 en el PFC.

Además, en esta misma dirección podría estar involucrado el aumento en el ratio de la forma activa de GSK-3 β (p-GSK-3 β /GSK-3 β). Estudios previos han demostrado que la activación de la vía de PI3K/Akt inhibe a GSK-3 β (Rojo et al., 2008a, Rojo et al., 2008b) por lo que una posible explicación al incremento descrito para GSK-3 β sería el descenso observado en la expresión de PI3K/Akt. Además, los antidepresivos desipramina y duloxetina, pero no escitalopram, aumentaron la expresión proteica de Nrf2 en el núcleo, disminuyeron los niveles de Keap-1 y mostraron una clara tendencia en la misma dirección para los niveles de GSK-3 β . Teniendo en cuenta las acciones descritas y la administración de antidepresivos una vez iniciado el protocolo de estrés, estos fármacos podrían tener un efecto terapéutico y proteger del daño oxidativo en el PFC a través de Nrf2.

En contraste, en el hipocampo no se registraron cambios en Nrf2, Keap-1 ni GSK-3 β tras el CMS. No obstante, teniendo en cuenta que el CMS redujo los niveles de PI3K/Akt en esta área cerebral, los resultados aparentemente discrepantes con Nrf2 y sus inhibidores podrían estar

relacionados con el momento de la toma de muestras, donde el escenario neuroinflamatorio no se encontraba en su pico. Otra posibilidad hace referencia a que en el hipocampo los mecanismos afectados por el CMS podrían estar más relacionados con la hipótesis neurotrófica de la depresión, tal y como plantea la posible modulación por parte de PI3K/Akt de las proteínas neurotróficas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en la fisiopatología de la depresión (Wang et al., 2015). Indudablemente, para confirmar estas o explorar nuevas posibilidades, se hacen necesarias futuras investigaciones.

El tratamiento con antidepresivos no es tan efectivo a este nivel en el hipocampo como sí lo es en el PFC. A pesar de ello, existen resultados discrepantes con esta afirmación como la inducción de Nrf2 con la duloxetina y el aparente incremento con la desipramina de los niveles de GSK-3 β sin correlación con la expresión de Nrf2 que requieren mayor profundización de los análisis.

Se ha señalado anteriormente que Nrf2 induce la expresión de genes codificantes de enzimas antioxidantes y de detoxificación (Wasserman y Fahl, 1997) por lo que se analizó la expresión génica de la hemoxigenasa 1 (HO-1), la NAD(P)H quinona deshidrogenasa (NQO-1), la superóxido dismutasa 1(SOD-1), la glutatión peroxidasa 1(GPx-1) y la catalasa. La exposición al CMS disminuyó los niveles de mRNA de GPx-1 y de catalasa, mostrando una tendencia en esta misma dirección la HO-1 y la NQO-1. Referente a la acción de los antidepresivos, los tres utilizados recuperaron los niveles de GPx-1 y produjeron una clara restauración de los de catalasa (aunque la duloxetina es el único con significación estadística). Además, la desipramina aumentó HO-1 y alcanzó un nivel de significación próximo a resultar estadísticamente significativo en el aumento de NQO-1 respecto al grupo CMS.

Sin embargo, en el hipocampo el CMS no modificó los niveles de las enzimas antioxidantes analizadas y los antidepresivos no ejercieron ninguna acción, con la excepción de la inducción de HO-1 por parte de la desipramina. Las dos explicaciones previas acerca del escenario neuroinflamatorio detectado en el hipocampo podrían resultar válidas para esta situación.

Para verificar si todas estas rutas, enzimas y factores poseen efectos biológicos sobre el estrés oxidativo, se determinaron los niveles de peroxidación lipídica a través del análisis de los niveles de malonildialdehído (MDA). Se corroboraron los indicios detectados hasta el momento en el PFC, donde se incrementaron los niveles de MDA. Incluso los tres tratamientos antidepresivos consiguieron reducir la peroxidación lipídica provocada por el CMS. El análisis de la peroxidación lipídica a través del MDA en el hipocampo reveló la ausencia de niveles medibles. Esta situación puede deberse a la mínima producción de MDA en las diferentes muestras sin diferencias entre los grupos, posibilidad que podría inferirse a partir de los datos obtenidos hasta este punto y

que concuerdan con publicaciones previas que no mostraron diferencias a nivel de peroxidación lipídica en el hipocampo (Lucca et al., 2009a, Wang et al., 2012).

Nuestros resultados también reflejaron un aumento en los niveles de nitritos tanto en el PFC como en el hipocampo tras la exposición al CMS, apuntando de nuevo hacia un papel potencial en los modelos experimentales de depresión basados en el estrés. Numerosos factores modifican los niveles de nitritos en diferentes tejidos (Tsikas et al., 1997) y esto podría constituir una explicación a la ausencia de efectos de los tratamientos antidepresivos sobre ellos.

Por otro lado, los productos aldehídos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) se han asociado a la etiología de cambios patológicos bajo estrés oxidativo como mediadores clave en la muerte celular inducida por dicho estrés. En este sentido, el 4-HNE es uno de los principales productos de la peroxidación lipídica y puede a su vez contribuir en los efectos citotóxicos del estrés oxidativo (Esterbauer et al., 1991, Uchida, 2003). Nuestros resultados también indicaron que, en el PFC, la exposición al CMS provoca un aumento de los niveles de 4-HNE y que los diferentes tratamientos antidepresivos intentan restaurarlos hasta los niveles basales. Respecto a la situación en el hipocampo, no se registraron cambios en los niveles de 4-HNE, concordando de nuevo con las publicaciones ya mencionadas (Lucca et al., 2009a, Wang et al., 2012) y con los datos aquí reflejados hasta el momento.

Con el objetivo de estudiar las posibles interacciones de la ruta de Nrf2 con otros mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios, se decidió determinar los niveles de la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15-dPGJ₂), de la que se había reportado una disminución tras este mismo protocolo de CMS (Gárate et al., 2011a). Curiosamente, uno de los sistemas potencialmente activados por la 15-dPGJ₂ es el integrado por Keap-1/Nrf2/ARE (Kansanen et al., 2009) pero no es el único, ya que la 15-dPGJ₂ es un ligando endógeno del receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma* (PPAR- γ) y, por lo tanto, PPAR- γ y Nrf2 constituyen las principales rutas activadas por la 15-dPGJ₂ (Surh et al., 2011). Además, respecto a su potencial antidepresivo, un reciente estudio ha propuesto a un agonista del PPAR- γ , la pioglitazona, como un tratamiento adyuvante de corta duración seguro y efectivo para el tratamiento de la depresión mayor moderada o grave (Sepanjnia et al., 2012).

Nuestros resultados mostraron que el CMS provoca un descenso en la expresión de PPAR- γ en el PFC y que la duloxetina fue capaz de restaurarla. Los otros antidepresivos, a pesar de no alcanzar significación estadística, también revelaron una clara tendencia en la misma dirección. En el hipocampo, ante un descenso similar al registrado en el PFC, los tres tratamientos

administrados recuperaron la expresión de PPAR- γ . Teniendo en cuenta la ausencia de efectos de los antidepresivos sobre los cambios producidos por el CMS en la vía de Nrf2 en esta área cerebral, se plantea como posibilidad que la inflamación posea un papel predominante sobre el daño oxidativo en el hipocampo, aunque se requerirán nuevos estudios para contrastar esta hipótesis.

Tomando todo el estudio en su conjunto, nuestros resultados indican que la ruta del factor antioxidante Nrf2 podría ser considerada como una potencial diana terapéutica, al menos a nivel del PFC. Esta afirmación, como ya se ha discutido, está basada en que, de entre las enzimas que se inducen para restaurar la homeostasis oxidativa, una de las principales respuestas adaptativas que se producen en el SNC es la activación de la ruta de Nrf2 (Innamorato et al., 2008, Johnson et al., 2008). A pesar de estas evidencias, indudablemente se necesita más investigación y aproximaciones farmacológicas con test comportamentales para afirmar que Nrf2 puede considerarse una diana terapéutica útil para tratar patologías psiquiátricas como la depresión.

Como ya se ha comentado previamente, el motivo para la aparente ausencia de relevancia de esta ruta en el hipocampo podría ser que los mecanismos involucrados en esta área estén más relacionados con la hipótesis neurotrófica de la depresión. Refrendando esta afirmación, se ha propuesto que el BDNF puede ser un importante actor en la neurodegeneración y la reducción del volumen total y la pérdida neuronal que se dan ante situaciones estresantes y patología depresiva en el hipocampo adulto (Murakami et al., 2005, Duman y Aghajanian, 2012). Existen numerosos estudios que describen una reducción en la expresión de BDNF tras la exposición a modelos preclínicos y en pacientes con trastorno depresivo mayor y, además, parece que los tratamientos con antidepresivos son capaces de restaurar sus niveles en ambas situaciones (Duman y Monteggia, 2006).

En resumen, hemos demostrado que la ruta de Nrf2 se modula diferencialmente por los antidepresivos en el PFC y el hipocampo. Nuestros datos indican que, en un modelo de depresión en rata, el CMS, la ruta de Nrf2 está involucrada en el daño oxidativo/nitrosativo registrado en el PFC. Estos efectos pueden explicarse debido a que en el PFC existen niveles elevados de mediadores proinflamatorios, a su susceptibilidad frente a los procesos neuroinflamatorios provocados por el estrés y, finalmente, a constituir un importante sustrato neuronal en la regulación de la respuesta a estrés orquestada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (García-Bueno et al., 2008a). El estudio realizado también indica que las diferentes clases de antidepresivos pueden regular aspectos relacionados con Nrf2 y moléculas antiinflamatorias de diferente manera, resultando la desipramina (antidepresivo tricíclico) y la

duloxetine (inhibidor selectivo dual de la recaptación de noradrenalina y serotonina) los que actúan principalmente sobre la ruta de Nrf2 (Figura 64). Particularmente, estos resultados podrían otorgar a la noradrenalina mayor importancia en estas vías, aspecto interesante a desarrollar en futuras investigaciones. Teniendo en cuenta que el tratamiento antidepresivo comienza una vez iniciado el protocolo de estrés, es importante señalar que los efectos que aquí se muestran tendrían propiedades terapéuticas.

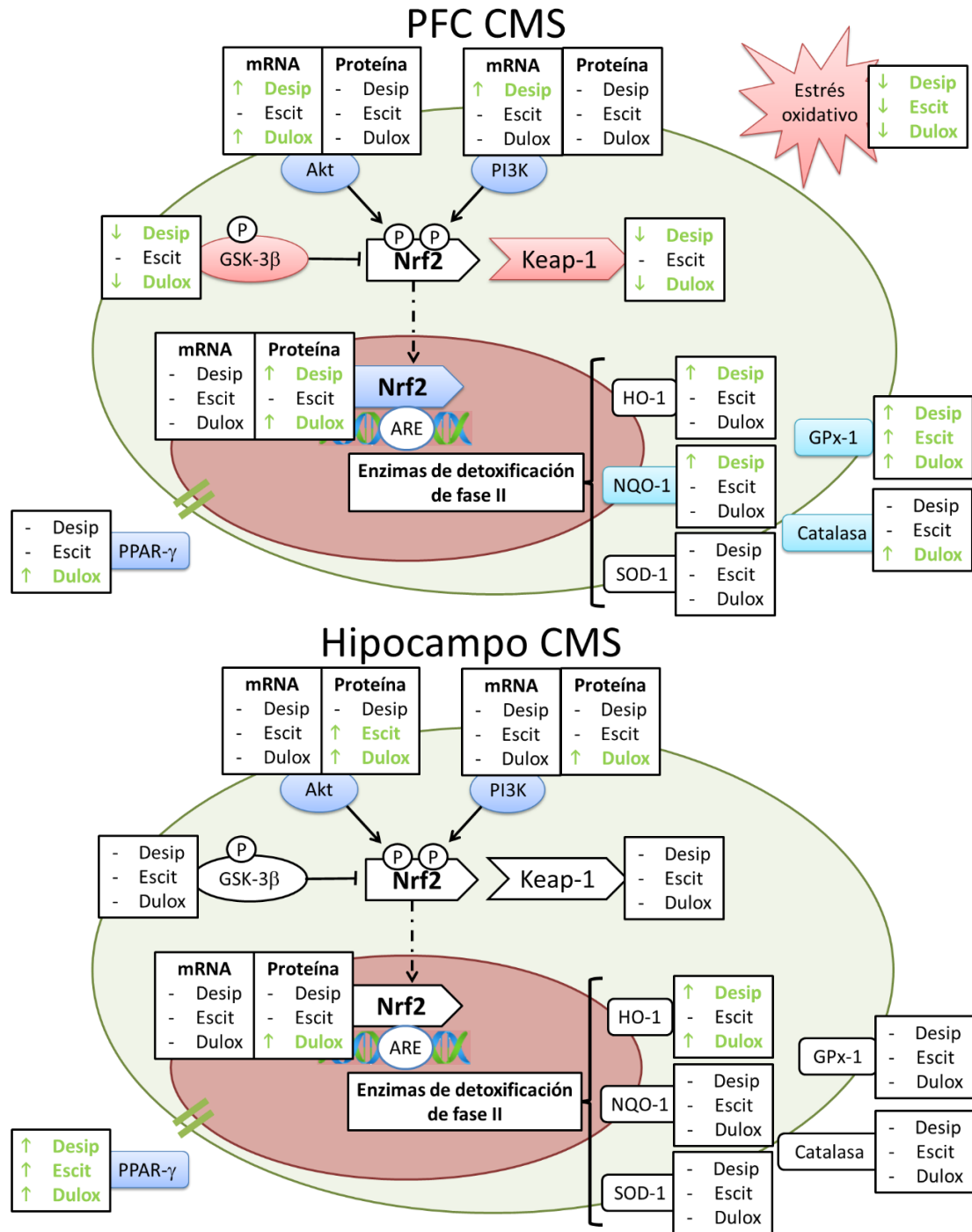


Figura 64. Efectos diferenciales de los antidepresivos evaluados sobre la ruta del factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 en córtex prefrontal (PFC) e hipocampo. desip: desipramina; escit: escitalopram;

dulox: duloxetine; P: fósforo; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa; Akt: proteína quinasa B; GSK-3 β : glucógeno sintasa quinasa 3-*beta*; Keap-1: proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1; ARE: elementos de respuesta antioxidante; HO-1: hemoxigenasa-1; NQO-1: NAD(P)H quinona deshidrogenasa-1; SOD-1: superóxido dismutasa-1; GPx-1: glutatión peroxidasa-1; PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma*.

Los nuevos descubrimientos acerca de las dianas moleculares comunes y los mecanismos divergentes controlados por los antidepresivos ayudarían al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que explotasen las propiedades específicas de cada fármaco en particular (Patricio et al., 2015). Por tanto, la caracterización de las potenciales dianas farmacológicas basadas en las hipótesis emergentes de la fisiopatología de la depresión, así como el estudio de los efectos moleculares de los antidepresivos típicos son muy necesarios, siendo los principales objetivos de este estudio.

1.2. Efectos de los antidepresivos sobre los receptores de serotonina (5-HT) y la posible conexión con la activación inflamatoria de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y los metabolitos de la kinurenina en el PFC

El segundo bloque de resultados derivado de la administración de antidepresivos sobre un modelo de depresión en rata ampliamente caracterizado, el CMS, refleja el impacto del protocolo de estrés sobre la transmisión monoaminérgica en el córtex prefrontal (PFC) a través de la modificación de la expresión de los receptores de serotonina (5-HT) y los transportadores de recaptación de 5-HT (SERT) y de noradrenalina (NET). Además, nuestros resultados indicaron la activación de las enzimas indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) tras la exposición al CMS, activando la vía de las kinureninas en el sistema nervioso central (SNC), produciendo un aumento del compuesto potencialmente excitotóxico conocido como ácido quinolínico (Dantzer et al., 2011). Los antidepresivos evaluados parecen mejorar las transmisiones serotoninérgica y noradrenérgica y, a su vez, parecen evitar la activación de la vía de las kinureninas ocasionada por el CMS. Dichos efectos sobre la vía de las kinureninas podrían proteger potencialmente el PFC de los daños por excitotoxicidad y evitar el descenso en la síntesis de 5-HT como posible consecuencia de la activación de la IDO-1 y de la TDO (Capuron et al., 2002).

En los resultados que de aquí en adelante configuran la presente Tesis Doctoral, el área de estudio es únicamente el córtex prefrontal (PFC), a diferencia de los discutidos en el apartado 1.1 que incluyen también el hipocampo. El escenario de menor influencia del estrés oxidativo descrito en dicho apartado para el hipocampo representó uno de los motivos a la hora de excluir a esta estructura cerebral de los análisis posteriores, a pesar del potencial interés que podría

suscitar. Además, la mayoría de la investigación en depresión ha estado tradicionalmente vinculada al hipocampo debido a la asociación de la reducción de su volumen con la depresión, su conexión con el estrés y al procesamiento emocional y memoria susceptibles de ser afectadas en la patología depresiva (MacQueen y Frodl, 2011b). Por ello, representa un campo más estudiado y sobre el que se poseen más datos que para otras áreas donde también se han registrado diferencias morfológicas (Otte et al., 2016). El PFC se encuentra entre ellas y ha acaparado a su vez una importante parte de la investigación en depresión tanto por estudios funcionales que revelan alteraciones en depresión en distintas zonas de la misma (Koenigs y Grafman, 2009) como por sus implicaciones motivacionales y socioemocionales a través posiblemente de la modulación de sistemas serotoninérgicos (Challis y Berton, 2015). Además, en el campo de la neuroinflamación en el que se ubica nuestra investigación, el PFC ha mostrado una elevada sensibilidad ante la producción de mediadores proinflamatorios ante situaciones de estrés, postulando que los procesos de esta índole adquieren mayor relevancia en esta estructura (García-Bueno et al., 2008a).

La relación entre las monoaminas y los comportamientos de tipo depresivo descrita en la literatura ha situado al déficit de serotonina como una de las principales dianas en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo (Olivier, 2015). De esta manera, las actuales aproximaciones terapéuticas en depresión mayor están enfocadas a aumentar los niveles de monoaminas en las sinapsis en el SNC. Los mecanismos moleculares en pos de ello son el bloqueo de los recaptadores de monoaminas (ISRSs, IRSNs, TCAs) y la inhibición de la enzima de degradación monoaminoxidasa (IMAOs). Aunque se han desarrollado otras metodologías, la inhibición de la recaptación de monoaminas aún acapara la primera línea en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo (Korte et al., 2015).

Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} despliegan su función potencial como autorreceptores en el PFC y su inhibición o desensibilización evoca efectos antidepresivos (Hughes et al., 2007, Bortolozzi et al., 2012, Albert et al., 2014). Nuestros resultados muestran que la exposición al CMS aumentó la expresión génica de 5-HT_{1A} y que el tratamiento con antidepresivos lo impidió, reforzando la idea de los efectos antidepresivos a través del bloqueo del 5-HT_{1A}.

Los hallazgos acerca del 5-HT_{1B} han de interpretarse con cautela ya que el estudio de la población de autorreceptores 5-HT_{1B} es compleja de estudiar debido a su localización difusa que se solapa con la de los heterorreceptores del mismo subtipo. En este diseño experimental en particular, la desipramina y el escitalopram incrementaron el 5-HT_{1B} en el PFC de ratas expuestas al CMS, sin que el protocolo provocase ningún cambio por sí mismo. Esta dualidad auto/heterorreceptor

vincula tanto a agonistas como antagonistas del 5-HT_{1B} con propiedades antidepresivas (Tatarczynska et al., 2005, Dawson et al., 2006). La implementación de estrategias experimentales que hagan posible el estudio de ambas poblaciones por separado se antoja crucial para alcanzar hallazgos fiables sobre el 5-HT_{1B} y su potencial terapéutico (Nautiyal et al., 2016).

Por otra parte, los receptores postsinápticos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} parecen ser necesarios para la acción de los antidepresivos (Sato et al., 2010a, Diaz et al., 2016). Nuestro estudio reveló que el CMS no ejerce efectos sobre los niveles de mRNA del 5-HT_{2A} y que la desipramina y la duloxetina los inducen. Además, la exposición al CMS incrementó el mRNA del 5-HT_{2B} y los tratamientos no lo modificaron. Teniendo en cuenta que la regulación al alza de un receptor post-sináptico potencia la neurotransmisión, esta circunstancia observada tras el CMS podría ser consecuencia de un mecanismo compensatorio destinado a mantener un mínimo de serotonina en la hendidura sináptica. Indudablemente, se requieren futuras investigaciones para confirmar el papel que juega el receptor 5-HT_{2B} en el CMS. Los efectos observados sobre estos dos miembros de la familia 5-HT₂ son consistentes con otros estudios que describen su necesidad para la consecución de los efectos de los antidepresivos (Sato et al., 2010a, Diaz et al., 2016).

El receptor de serotonina descubierto más recientemente es el 5-HT₇ y se ha relacionado con los comportamientos de tipo depresivo en modelos de roedor y en pacientes sugiriendo que su bloqueo media eficacia antidepresiva (Nikiforuk, 2015, Stroth y Svenningsson, 2015a, Canale et al., 2016a). La expresión génica del 5-HT₇ no arrojó diferencias al comparar entre los diferentes grupos experimentales de este estudio. Sin embargo, al comparar únicamente el grupo sometido al CMS frente al grupo control, se reveló un incremento en los niveles de mRNA de 5-HT₇ ($p = 0,005$). Dicho aumento tras el CMS se ha reportado en otras áreas cerebrales como el hipocampo y el hipotálamo (Li et al., 2009). Como ya se ha señalado, el antagonismo de 5-HT₇ facilita la eficacia antidepresiva y el hecho de que este receptor se encuentre aumentado bajo condiciones de CMS lo posiciona como candidato a diana terapéutica para el tratamiento de los trastornos depresivos.

Dado que los transportadores de recaptación de monoaminas constituyen las principales dianas farmacológicas para el tratamiento de la depresión mayor en la actualidad (Berton y Nestler, 2006), el análisis de su expresión en nuestro modelo y de las eventuales acciones de los antidepresivos sobre ellos puede aportar valiosa información.

Nuestro estudio mostró que el recaptador de noradrenalina (NET) incrementa su expresión tras el CMS y que los tratamientos antidepresivos son capaces de prevenir este aumento. Estos

resultados son consistentes con estudios previos que describieron a su vez un incremento de los niveles de mRNA y proteína de NET tras un protocolo de estrés crónico por derrota social (Chen et al., 2012, Fan et al., 2015). Además, se ha reportado en la literatura la capacidad de algunos antidepresivos para restaurar la expresión normal de NET. En este sentido, estudios previos demostraron que los fármacos que antagonizan a NET provocan una disminución de sus niveles a largo plazo (Benmansour et al., 2004, Zhao et al., 2009) a través de un mecanismo aún desconocido, barajando la hipótesis de que la adaptación neuronal tiene como consecuencia la potenciación de la transmisión monoaminérgica (Zhao et al., 2009).

No se registraron diferencias en la expresión del transportador de serotonina (SERT) a excepción de una inducción de sus niveles por parte de la duloxetina. Una posible explicación se basa en la duración y dosis empleadas por cada antidepresivo, con capacidad para ejercer efectos antidepresivos, pero quizá no suficientes para afectar a la expresión de SERT. De hecho, resultados obtenidos por otros grupos de investigación señalan que el descenso en la expresión de NET y SERT parece no ser el único mecanismo que contribuye al efecto antidepresivo al existir fármacos que lo poseen sin alterar la expresión de NET o SERT (Zhao et al., 2009). De nuevo, estos resultados sugieren la necesidad de investigaciones futuras que viertan luz acerca de los mecanismos moleculares que regulan a NET y SERT *in vivo* para intervenciones terapéuticas en el tratamiento del trastorno depresivo mayor.

La conexión entre la inflamación, las monoaminas y el comportamiento depresivo representa una prometedora línea de investigación. Los mediadores inflamatorios y las especies reactivas de oxígeno son capaces de activar a las enzimas indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). Una vez activas, desvían el triptófano hacia la vía de las kinureninas, disminuyendo su biodisponibilidad para sintetizar serotonina (Dantzer et al., 2008).

Nuestros resultados indicaron que la exposición al CMS provoca un incremento en la expresión de IDO-1 y TDO. Curiosamente, el tratamiento con antidepresivos restauró los niveles proteicos de IDO-1 a situación control. Este efecto podría estar relacionado con las propiedades antiinflamatorias de los antidepresivos inactivando la IDO-1 a través de mecanismos post-traduccionales (Liu et al., 2015c) o con la influencia de los mecanismos de transporte a través de la barrera hematoencefálica que pueden prevenir la activación de la IDO-1 (Fukui et al., 1991b, Ruddick et al., 2006, Sekine et al., 2016).

Además, el CMS también aumentó la expresión de mediadores proinflamatorios con capacidad para activar a las enzimas IDO-1 y TDO, como el factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α) y la

interleuquina 1 *beta* (IL-1 β) (Babcock y Carlin, 2000, O' Connor et al., 2009). Los tratamientos antidepresivos revirtieron el incremento en TNF- α e IL-1 β tras el CMS y, como consecuencia, su perfil de expresión se correlaciona directamente con el de laIDO-1, tal y como cabría esperar. Para dilucidar completamente los mecanismos por los que los antidepresivos modifican la expresión de laIDO-1 se requieren posteriores investigaciones, aunque la explicación acerca de sus propiedades antiinflamatorias resulta plausible.

Los dos metabolitos principales de la vía de las kinureninas son el ácido kinurénico (KYNA) y el ácido quinolínico (QUINA) en base a sus acciones sobre el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA). El KYNA actúa como antagonista de dicho receptor y el QUINA lo hace como agonista, por lo que se les ha atribuido potencial neuroprotector (para el KYNA) y neurotóxico (para el QUINA) en situaciones de excitotoxicidad (Dantzer et al., 2011).

En nuestro estudio, el QUINA aumentó tras el protocolo de CMS y los tratamientos antidepresivos restauraron su expresión a niveles control. Además, la enzima hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa (Haa) que cataliza el último paso enzimático de la ruta hacia la producción de ácido quinolínico se encontró incrementada en el grupo de CMS, pero no en los tratados.

Los niveles de KYNA mostraron una tendencia al aumento únicamente en el CMS, así como sus enzimas de síntesis, las kinurenina aminotransferasas (KAT-1, KAT-2 y KAT-3). En este caso, los grupos tratados con antidepresivos sobreexpresaron la KAT-2 y, particularmente, la desipramina aumentó los niveles de mRNA de las tres isoformas con respecto al grupo control.

Evidencias recientes junto con los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la depresión infieren un papel de la vía de las kinureninas en la etiología de esta enfermedad, basándose en el establecimiento de un nexo entre la inflamación y el déficit de monoaminas en los trastornos depresivos (Dantzer et al., 2011, Maes et al., 2011). En esta línea, los antidepresivos restringieron la inducción de la vía de las kinureninas, especialmente la producción de QUINA. Con estos datos, decidimos estudiar como posible indicador del riesgo de excitotoxicidad el ratio QUINA/KYNA. Este ratio resultó incrementado tras la exposición a CMS, restaurándolo a niveles control los tratamientos con antidepresivos.

Según estos datos, se deriva una activación de la vía de las kinureninas bajo condiciones de CMS, bloqueando los antidepresivos esta inducción y el potencial daño subsecuente. Además, los antidepresivos consiguieron también disminuir el ratio de excitotoxicidad mediante la inducción de las KATs para producir más KYNA y la reducción del QUINA y la Haa. La excitotoxicidad representa una situación peligrosa para el tejido nervioso y está muy relacionada con el estrés

oxidativo. En el apartado previo de esta discusión demostramos un incremento del estrés oxidativo/nitrosativo en el PFC de las ratas expuestas al CMS con elevados niveles de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE). Incluso los mismos antidepresivos empleados en el presente estudio fueron capaces de restaurar el MDA y el 4-HNE a situación control. Estos resultados son consistentes con los aquí descritos acerca de la vía de las kinureninas, sus implicaciones en excitotoxicidad y cómo los antidepresivos pueden prevenir estas situaciones de riesgo.

Sintetizando los hallazgos descritos en este apartado, nuestros datos indican que el modelo experimental de depresión en roedores, el CMS, afecta a la transmisión monoaminérgica en el PFC mediante la modulación de los receptores de serotonina y los transportadores de recaptación SERT y NET. Asimismo, se produce una activación mediada por factores inflamatorios de las enzimas IDO-1 y TDO que provocan la activación de la vía de las kinureninas en el PFC, con un aumento del ácido quinolínico que podría resultar en un mayor riesgo de excitotoxicidad (Figura 65).

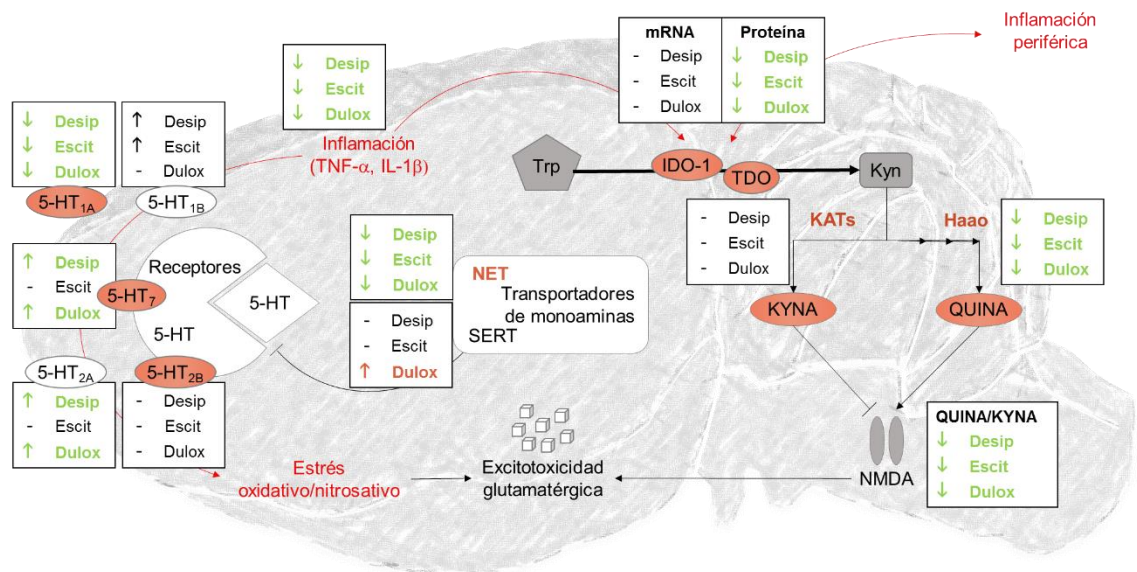


Figura 65. Efectos de los antidepresivos evaluados sobre los receptores de serotonina (5-HT) y la posible conexión con la activación inflamatoria de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) y los metabolitos de la kinurenina en el córtex prefrontal (PFC). desip: desipramina; escit: escitalopram; dulox: duloxetina; 5-HT_x: receptor de serotonina "x"; NET: transportador de noradrenalina; SERT: transportador de serotonina; TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleuquina; Trp: triptófano; TDO: triptófano 2,3-dioxigenasa; Kyn: kinurenina; KAT: kinurenina aminotransferasa; Haao: 3-hidroxiantranilato 2,3-dioxigenasa; KYNA: ácido kinurénico; QUINA: ácido quinolínico; NMDA: N-metil-D-aspartato.

El tratamiento con antidepresivos parece impedir la activación de la vía de las kinureninas en el PFC inducida por el CMS (Figura 65), lo que en teoría protegería a esta estructura cerebral de la excitotoxicidad y prevendría un eventual descenso en la síntesis de serotonina por la disminución en la biodisponibilidad de triptófano que puede provocar la activación de la IDO-1

y la TDO. Es relevante señalar que, ya que los antidepresivos se administran una vez iniciado el protocolo de estrés, nuestros datos sugieren que parte de su acción terapéutica en este modelo se produce a través de acciones sobre las rutas de transducción analizadas.

Existe una urgente necesidad en la identificación de nuevas dianas moleculares en el tratamiento de la depresión con el objetivo de diseñar fármacos más efectivos y clarificar el conocimiento de su fisiopatología. El entendimiento de la transmisión monoaminérgica y su nexos con la inflamación representa un extenso campo que aún es desconocido. En este sentido, nuestra investigación proporciona nuevas perspectivas sobre la activación inflamatoria de la vía de las kinureninas, la transmisión monoaminérgica y la capacidad de los antidepresivos para prevenir frente a situaciones potenciales de riesgo relacionadas con estos desequilibrios. Pensamos que la profundización en esta aproximación podría resultar en interesantes avances para la investigación en patologías psiquiátricas.

2. Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS)

Los resultados del estudio que aplicaba un tratamiento con antibióticos sobre el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS) demostró la existencia tras el mismo de una disfunción intestinal (intestino permeable o *leaky gut*) acompañada del fenómeno de traslocación bacteriana que podría contribuir a la neuroinflamación detectada a través de la activación del receptor *Toll-like 4* (TLR-4) por su ligando, el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Dicha activación sería responsable del incremento detectado en los niveles de la forma fosforilada de la proteína/quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38, revertida por el tratamiento con antibióticos mediante la inducción de las fosfatasaes duales específicas (DUSPs) MKP-1 y MKP-3. Se encontró también afectado por el CMS el mecanismo antioxidante Nrf2, recuperado parcialmente en el grupo tratado con antibióticos que, además, demostró ser capaz de evitar el desarrollo del fenotipo de tipo depresivo. Sin embargo, la administración de antibióticos como herramienta farmacológica utilizada para evaluar la influencia de la traslocación bacteriana podría estar afectando a la señalización normal de la microbiota a través del nervio vago debido a la eliminación de flora bacteriana, por lo que serán necesarias investigaciones posteriores para confirmar estos hallazgos.

A pesar de esta limitación, el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral ya demostró que el protocolo de administración de antibióticos utilizado no modificaba la función inmune en ratas control (Gárate et al., 2011b) ni poseía efectos neuroprotectores o antiinflamatorios sobre el sistema nervioso central (SNC) (Caso et al., 2009, Gárate et al., 2011b).

El tratamiento con antibióticos disminuyó el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada modificado (mFST) y el tiempo de latencia en el “*splash*” test (ST), mostrando una tendencia al aumento en el tiempo de acicalamiento o *grooming* también en este último test. Estos efectos podrían indicar que las bacterias o sus componentes traslocados desde el colon pueden tener influencia en el comportamiento de tipo depresivo. En estudios previos (Gárate et al., 2011a), se señaló la ausencia de efectos del tratamiento antibiótico sobre el CMS en ratas Sprague Dawley en el mFST. Sin embargo, en este estudio donde se han utilizado ratas Wistar,

el tratamiento con antibióticos consiguió corregir tanto las alteraciones del mFST como del ST y del laberinto en cruz elevada. Estos resultados corroboraron las acciones del tratamiento antibiótico sobre el comportamiento de tipo depresivo inducido por el CMS.

Se detectó una posible desestabilización de las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions* del colon, así como una disminución en los niveles de inmunoglobulina A (IgA) y un incremento en la expresión proteica de la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa 2 (COX-2) y de la quimioquina asociada a la mucosa epitelial 28 (CCL28), que puede inducirse por presencia bacteriana (Ogawa et al., 2004). Los cambios producidos en estos marcadores son indicadores de una pérdida de la integridad de la barrera intestinal o *leaky gut* que permite el paso a su través de bacterias y/o sus componentes con capacidad para suscitar o modular una respuesta inflamatoria (Collins, 2001, Ponferrada et al., 2007). Nuestros resultados no mostraron influencia del tratamiento con antibióticos sobre los cambios producidos por el CMS en estos parámetros. Esto implica que los efectos de los antibióticos sobre la traslocación bacteriana no se desarrollan mediante su acción sobre la barrera intestinal. El único cambio observado fue la restauración de los niveles de IgA a la situación control. Una posible explicación a este fenómeno es que la reducción en la carga bacteriana intestinal consecuencia del tratamiento puede permitir que la expresión de IgA vuelva a su nivel basal al ser la primera línea de defensa frente a patógenos en el intestino.

Nuestro experimento registró la presencia de unidades formadoras de colonias bacterianas de la flora intestinal normal en distintos órganos tras el CMS, situación que no se produjo en los grupos control (CT) y tratado con antibióticos (CMS+ATB). Los niveles plasmáticos de LPS fueron más elevados en el grupo CMS ($p=0,0595$) y se redujeron con el tratamiento antibiótico, tal y como había sido descrito en estudios previos (Gárate et al., 2011a). Aunque resultaría muy interesante, el objetivo de este experimento no fue caracterizar la microbiota intestinal sino la traslocación bacteriana mediante su presencia en sangre, hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs), anormal debido a ser órganos estériles. Además, el grupo CMS+ATB no presentó ninguna unidad formadora de colonias (CFU), con lo que podemos descartar la existencia de bacterias resistentes al tratamiento.

Se han propuesto multitud de mecanismos actuando en paralelo para explicar cómo el cerebro monitoriza la respuesta inmune periférica y cómo la presencia de bacterias en otros órganos puede afectar al sistema nervioso central (SNC). Entre ellos, se incluye la producción local de citoquinas que activa nervios primarios aferentes, los receptores *Toll-like* expresados en el endotelio y las células tipo macrófago residentes en los órganos circunventriculares y el plexo

coroideo, los transportadores de citoquinas proinflamatorias en la barrera hematoencefálica y los receptores de citoquinas ubicados en los macrófagos perivasculares y las células endoteliales de las vénulas cerebrales (Dantzer et al., 2008).

Investigaciones previas han demostrado que el CMS provoca un aumento de la expresión de TLR-4 en el córtex prefrontal (PFC) y que el tratamiento con antibióticos bloquea este efecto (Gárate et al., 2011a), indicando que las bacterias traslocadas o sus componentes son capaces de alcanzar y activar los TLR-4 del PFC. No obstante, la utilización de otras herramientas farmacológicas para bloquear la señalización, como antagonistas o modelos *knockout*, podrían proporcionar evidencias adicionales.

El reconocimiento del LPS bacteriano por parte del receptor TLR-4 desemboca en la activación del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) pero también en la de las MAPKs (Guha y Mackman, 2001), lo que supone un factor a tener en cuenta ya que, tradicionalmente, la investigación se ha centrado en la vía del NF- κ B. No obstante, las MAPKs están involucradas en múltiples cascadas de señalización que incluyen la inducción inflamatoria por estímulos extracelulares así como la propia regulación del NF- κ B. Prueba de ello es que la inhibición de la actividad de la MAPK p38 inhibe la expresión génica dependiente de NF- κ B sin alterar su translocación al núcleo (Schmitz et al., 2001).

De manera relevante para el estudio de las enfermedades psiquiátricas en particular y del SNC en general, las citoquinas proinflamatorias son capaces de incrementar la expresión y actividad de los transportadores de recaptación de monoaminas a través de rutas de señalización que incluyen a las MAPKs (Moron et al., 2003, Zhu et al., 2006). Incluso la inhibición de p38 ha revertido el desarrollo de los cambios comportamentales inducidos por el LPS en roedores, en parte, mediante la reversión de los efectos de p38 sobre el transportador de serotonina (Zhu et al., 2010). En base a estas evidencias, las MAPKs pueden influir en el metabolismo de las monoaminas, posicionándose como dianas terapéuticas para la depresión. De hecho, un inhibidor selectivo de p38 (GW-856553X) ha completado la fase II de ensayos clínicos en pacientes con trastorno depresivo mayor (ClinicalTrials.gov National Institutes of Health, 2016; NCT00976560) aunque, lamentablemente, no se han publicado resultados del mismo aún (Febrero 2017). En cualquier caso, estos estudios refuerzan el potencial terapéutico de la modulación farmacológica de las MAPKs y, específicamente, de p38, alentando el desarrollo de sus inhibidores como posibles adyuvantes a los antidepresivos para el tratamiento de la depresión (Leonard y Maes, 2012).

En esta misma línea, el CMS aumentó la expresión de la forma fosforilada (activa) de p38 (p-p38) en nuestro estudio. Los análisis de inmunohistoquímica de fluorescencia mostraron un incremento de p-p38 tanto en neuronas como microglía, siendo en estos tipos celulares donde se registró expresión de las formas fosforiladas de las MAPKs, no en astroglía. El tratamiento con antibióticos lo restauró a niveles control, indicando que la activación de p38 podría estar mediada, al menos en parte, por la traslocación bacteriana. No se detectaron cambios en la expresión de la forma fosforilada de las quinasas de señalización extracelular 1/2 (p-ERK1/2) para ningún grupo experimental pero sí se observó un descenso en los niveles de la forma fosforilada de las quinasas NH₂ terminal de c-jun (p-JNK) tanto en el CMS como en el tratamiento con antibióticos. A pesar de dicho descenso, la expresión de c-jun en el núcleo aumentó tras el CMS (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que los componentes de una ruta de señalización se regulan temporalmente, una posible explicación a estos resultados podría ser el momento de sacrificio del animal donde la disminución en p-JNK podría ser consecuencia de un agotamiento de la vía tras su inducción. En este sentido, el curso temporal del CMS que se realizó aporta información valiosa ya que se aprecia en él un incremento para p-JNK a los 7 y 14 días del protocolo (datos no mostrados), siendo consistente con esta teoría. A pesar de ello, se requieren indudablemente experimentos adicionales para aclarar estos resultados.

Las fosfatasas duales específicas (DUSPs), también conocidas como fosfatasas de las MAPKs (MKPs), controlan la intensidad y duración de la activación de las MAPKs defosforilando residuos de treonina y tirosina y determinan el tipo de respuesta fisiológica en los diferentes tejidos (Jeffrey et al., 2007, Patterson et al., 2009). MKP-1 posee localización nuclear y una elevada especificidad de sustrato por p38 y JNK. Su activación tras la estimulación de los TLRs actúa como un mecanismo de *feedback* negativo para atenuar la actividad de p38 y disminuir la respuesta inmune innata. Concretamente, MKP-1 es un importante regulador negativo de la actividad de los macrófagos y de la respuesta inflamatoria a la señalización de los TLRs, con un rol crucial tanto en la respuesta innata inmune como adaptativa mediante la inactivación de p38 y JNK (Patterson et al., 2009). En nuestros resultados no se modificaron los niveles de mRNA de MKP-1 pero el tratamiento con antibióticos los incrementó, constituyendo una posible explicación al descenso registrado para p-p38 y a la ausencia de efectos sobre la p-JNK.

Por otro lado, la MKP-3 (también conocida como DUSP6) es una DUSP citosólica con especificidad de sustrato por ERK1/2 pero también ejerce efectos en JNK y p38 (Patterson et al., 2009). Al igual que ocurría con MKP-1, el CMS no modificó su expresión de mRNA, pero el tratamiento con antibióticos los incrementó, pudiendo ser uno de los motivos para las

modificaciones descritas en p-p38 y p-JNK. Hasta la fecha, se han descrito más de 20 DUSPs (Patterson et al., 2009) y se postulan como dianas terapéuticas prometedoras para modular la actividad de las MAPKs debido a su especificidad de sustrato y localización tisular diferencial, motivo por el que la investigación en ellas resulta especialmente interesante.

La liberación de la corticosterona consecuencia de la exposición al estrés podría influenciar la activación de las MAPKs (Lee et al., 2006). Sin embargo, los cambios detectados en los parámetros intestinales sumados a la existencia de estudios que correlacionan la permeabilidad intestinal con el incremento de la concentración plasmática de corticosterona (Meddings y Swain, 2000) atribuyen a las bacterias la capacidad de actuar como responsables de la activación de las MAPKs. Además, estudios previos han demostrado que el LPS y antígenos de la pared celular de las bacterias Gram positivas, ligandos para TLR-4 y TLR-2 respectivamente, activan a p38 en el SNC (Schumann et al., 1998).

Numerosas investigaciones han mostrado que en la depresión se produce la inducción de múltiples rutas oxidativo/nitrosativas que ocasionan daño por peroxidación lipídica (Moylean et al., 2014). El elemento central en la coordinación de la respuesta antioxidante es el factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2), que reconoce los elementos de respuesta antioxidante del genoma (ARE) (Wasserman y Fahl, 1997) presentes en las regiones promotoras de multitud de genes que codifican para enzimas de detoxificación de fase II. Curiosamente, se ha propuesto una conexión entre la activación de Nrf2 y las MAPKs, aunque aún existe controversia acerca de si regulan la actividad de Nrf2 por mecanismos directos o indirectos (Sun et al., 2009b).

Nuestro estudio reveló un descenso en los niveles de Nrf2 y sus activadores fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (Akt) en el PFC tras la exposición al CMS. Estos resultados podrían explicar, al menos parcialmente, el daño oxidativo/nitrosativo detectado en el modelo de depresión CMS (Gárate et al., 2011a). El tratamiento con antibióticos no consiguió evitar la disminución en los activadores de Nrf2 provocada por el CMS, aunque se observó una tendencia a recuperar los niveles de mRNA y proteína de Akt, así como la propia expresión de Nrf2 en el núcleo.

La glutatión peroxidasa 1 (GPx-1) es una de las enzimas detoxificantes de fase II inducidas por Nrf2 cuya función biológica primordial es proteger al organismo del daño oxidativo (Lee et al., 2003a). Además, se ha observado que los niveles de GPx están alterados en depresión y que el tratamiento con antidepresivos restaura su expresión en los pacientes (Ozcan et al., 2004). Nuestro estudio reflejó una reducción en la expresión génica de GPx-1 que podría ser

consecuencia de la disminución detectada en Nrf2 tras la exposición al CMS. Significativamente, la prevención de la traslocación bacteriana utilizando antibióticos recuperó parcialmente los niveles de mRNA de GPx-1, lo que sugiere un posible rescate de las acciones protectoras de la vía de Nrf2.

Se ha demostrado que la activación farmacológica de Nrf2 atenúa la inflamación inducida por el LPS y puede resultar una potencial diana terapéutica frente a la neuroinflamación (Innamorato et al., 2008). En este sentido, los ratones *knockout* para Nrf2 presentan células microgliales hiperinflamatorias (Hubbs et al., 2007) y desarrollan un fenotipo de tipo depresivo (Martin-de-Saavedra et al., 2013). Por tanto, los reguladores de las MAPKs y los activadores de Nrf2 (como la vía de supervivencia celular PI3K/Akt) se han propuesto como nuevos candidatos a fármacos para el tratamiento de la depresión (Maes et al., 2012a), estando nuestro estudio de acuerdo con esta percepción.

Los resultados presentados, junto con otros estudios de otros autores valiéndose de antidepresivos, muestran que la habilidad de algunos de estos fármacos para moderar la respuesta inflamatoria asociada a su efecto antidepresivo está relacionada con la modulación de las MAPKs (Wefers et al., 2012, Di Benedetto et al., 2013). Nuestra investigación apunta hacia la consideración de las MAPKs como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la depresión mayor.

En conclusión, la microbiota intestinal es capaz de tener implicaciones comportamentales y es un neuromodulador clave en la señalización del eje microbiota-intestino-cerebro durante la edad adulta. Incluso recientes estudios muestran que existe una flora intestinal alterada en su composición, diversidad y riqueza en la depresión (Cryan y Dinan, 2012). Así, recientes investigaciones apuntan hacia un papel causal de la microbiota en el desarrollo de las características neurológicas y de comportamiento presentes en la depresión y puede proporcionar una diana factible para el tratamiento y prevención de patologías psiquiátricas.

En esta dirección, nuestro estudio sugiere que la traslocación bacteriana de la microbiota normal puede tener un papel en la fisiopatología de la depresión mediante la MAPK p38, lo que está en sintonía con resultados previos que muestran que los estresores podrían activar receptores de inmunidad innata, agravando la neuroinflamación y el daño por estrés oxidativo/nitrosativo. Además, los resultados obtenidos indican que la ruta de Nrf2 podría estar implicada en las acciones del CMS en el cerebro (Figura 66).

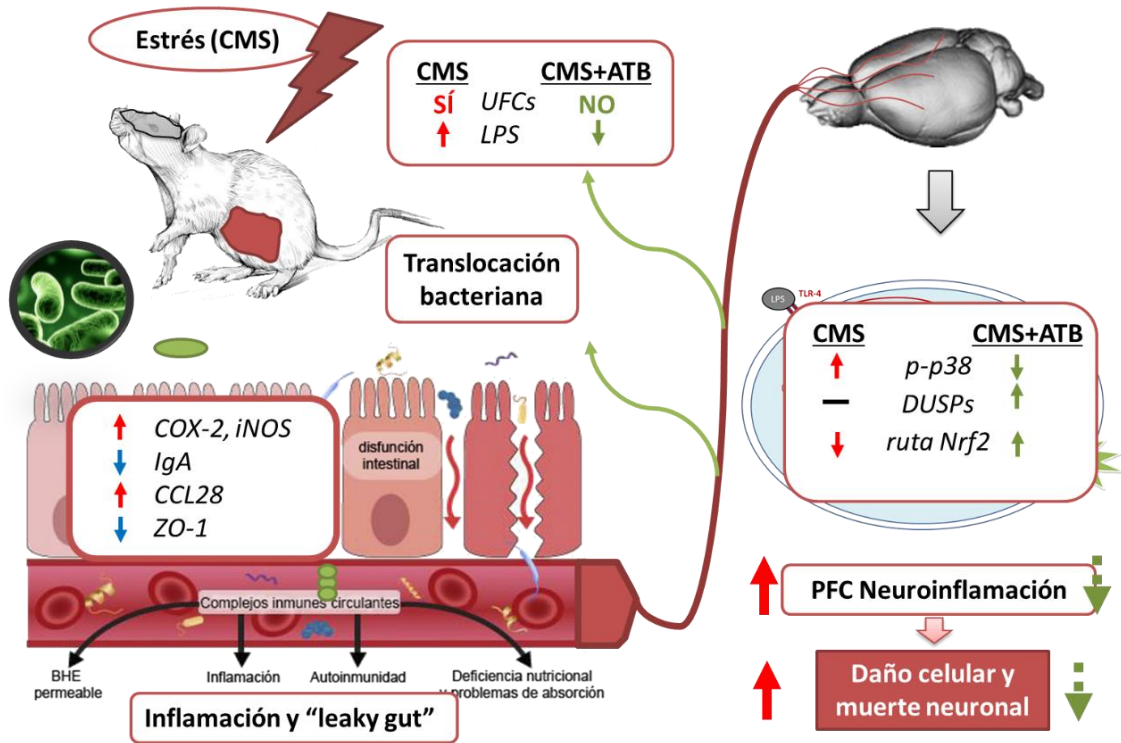


Figura 66. Papel de la traslocación bacteriana en las rutas inflamatorias intracelulares tras el modelo de depresión *chronic mild stress* (CMS). ATB: antibióticos; UFC: unidad formadora de colonias; LPS: lipopolisacárido; COX-2: ciclooxigenasa 2; IgA: inmunoglobulina A; CCL28: quimioquina asociada a la mucosa epitelial 28; ZO-1: proteína *zona occludens* 1; p-p38: fosfo-proteína 38; DUSP: fosfatasa dual específica; Nrf2: factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2); PFC: córtex prefrontal.

La idea de que la traslocación bacteriana está implicada en patologías relacionadas con el estrés, tales como la depresión, necesita confirmación. Tomar a las bacterias o a la integridad intestinal como dianas pueden representar nuevas posibilidades terapéuticas, abriendo la oportunidad de estudios traslacionales en psicopatologías.

3. Conexión entre los efectos comportamentales y la inflamación a través del *sickness behavior* inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones

Este capítulo describe la falta de efectividad del bloqueo de la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1) en la mejora de determinados comportamientos relacionados con la depresión. Además, el incremento producido por el LPS en los niveles del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) parece estar involucrado en la disminución del consumo de sacarosa sin ser responsable de los efectos fisiológicos deletéreos derivados de la administración del LPS (Figura 67).

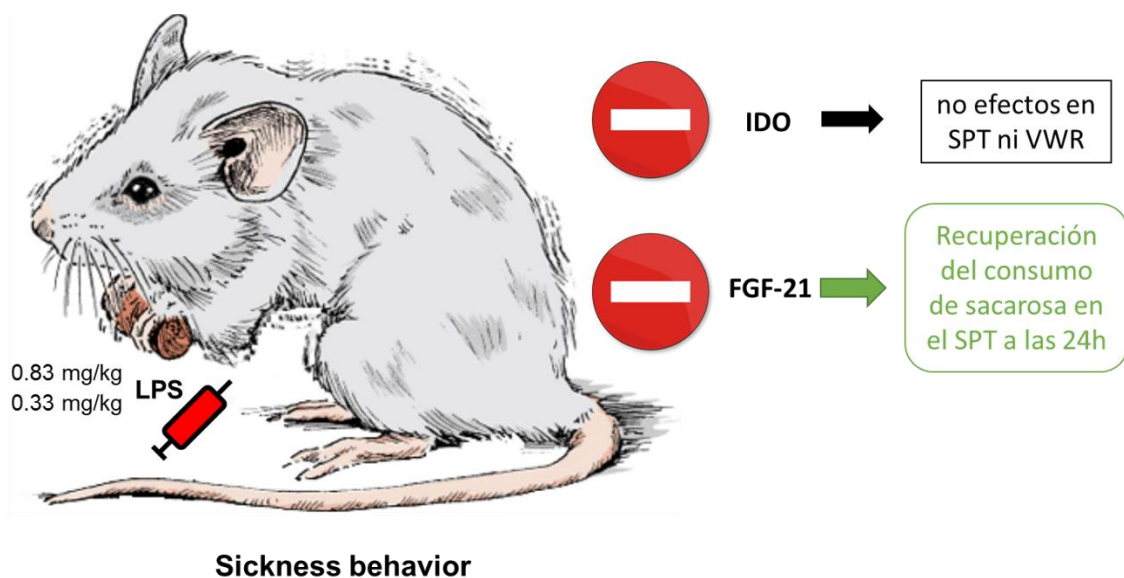


Figura 67. Efectos comportamentales del bloqueo de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) sobre el *sickness behavior* inducido por la administración de lipopolisacárido (LPS) en ratón. SPT: test de preferencia por la sacarosa; VWR: ejercicio espontáneo en rueda giratoria.

En la literatura se ha reportado una posible implicación de la activación de la indolamina 2,3-dioxigenasa en el desarrollo de comportamientos de tipo depresivo mediante la producción de los metabolitos derivados de la kinurenina (Dantzer et al., 2011). Además, nuestros resultados, discutidos en profundidad en la sección 1.2, muestran que la inducción de la vía de las kinureninas en un modelo de depresión bien caracterizado, el *chronic mild stress*. Por ello, se

administró L-leucina oralmente para tratar de bloquear el transporte de kinurenina (producida periféricamente por activación de la IDO-1 tras la administración de LPS) a través de la barrera hematoencefálica por el transportador de aminoácidos grandes 1 (LAT-1) (Fukui et al., 1991a, Kanai et al., 1998).

La realización de estos estudios nos llevó a determinar la expresión de LAT-1 en nuestro modelo de depresión en rata, el CMS, y los efectos de los diferentes antidepresivos. Sorprendentemente, registramos un descenso en la expresión del mRNA de LAT-1 tras la exposición al CMS. No existen demasiados resultados en la literatura acerca de la expresión de LAT-1 y su conexión con la inflamación y el estrés, pero se ha descrito que mediadores proinflamatorios como TNF- α no inducen cambios en su expresión (Aye et al., 2015). En cualquier caso, debemos tener en cuenta que este transportador lo utilizan para atravesar la barrera hematoencefálica tanto el triptófano como la kinurenina, por lo que modificaciones en su expresión pueden afectar tanto a la síntesis de serotonina a partir de triptófano como a la vía de las kinureninas. La recuperación en los niveles de LAT-1 tras el tratamiento con desipramina y duloxetina podría postularse en la dirección de mejorar la síntesis de serotonina al aumentar la biodisponibilidad de triptófano, aunque indudablemente para ello habría que determinar los niveles de triptófano y kinurenina y relacionarlos con los de LAT-1, tal y como realizan otros estudios (Joyce et al., 2005). A pesar de ello y de la necesidad de una mayor investigación que profundice sobre el papel de LAT-1 en el CMS, nuestra hipótesis acerca de su bloqueo con el fin de reducir la producción de metabolitos de la kinurenina ha sido demostrada utilizando inhibidores específicos (Sekine et al., 2016), por lo que el estudio planteado en ratón queda plenamente justificado.

Nuestros resultados en el modelo de LPS en ratón no registraron ningún efecto comportamental tras la administración de L-leucina en los test de preferencia por la sacarosa (SPT) ni en el ejercicio espontáneo en rueda giratoria (VWR), habiendo asegurado el desarrollo del *sickness behavior* mediante las medidas fisiológicas del peso corporal y la ingesta de comida. Ante la posibilidad de que el diseño experimental no produjese un bloqueo completo o suficiente del flujo de kinurenina al cerebro, se realizó un experimento adicional de inyección de LPS sobre hembras *knockout* para IDO-1, obteniendo idénticos resultados que con la L-leucina.

Estudios previos en pacientes han correlacionado los niveles de actividad de IDO-1 con la gravedad de los síntomas depresivos, pero sin conseguir demostrar una relación directamente causal entre ambos (Capuron et al., 2004, Wichers et al., 2005). Sin embargo, modelos con un fundamento similar al empleado sí han atribuido a la activación de IDO responsabilidad en el

desarrollo del fenotipo depresivo (O'Connor et al., 2009). Si bien es cierto que de entrada nuestro estudio puede resultar contradictorio con la literatura, cabe señalar que los test aplicados en el artículo mencionado (actividad locomotora, natación forzada y suspensión de la cola) fueron diferentes y, por tanto, miden otros aspectos de la patología depresiva menos relacionados con la anhedonia y el ejercicio físico. En este sentido, un reciente estudio recoge la incapacidad de revertir la disminución de la preferencia por la sacarosa inducida por LPS en ratones *knockout* para la kinurenina 3-monooxigenasa (KMO) que, por tanto, no pueden activar la vía de las kinureninas, concordando con nuestros resultados (Parrott et al., 2016). Sin embargo, sí revierten efectos comportamentales evaluados mediante otros test e incluso otras investigaciones apuntan a que podrían estar más relacionados con déficits cognitivos (Heisler y O'Connor, 2015).

No podemos obviar aspectos relacionados con el propio diseño experimental que limitan el estudio. El bloqueo planteado con L-leucina sólo podría asegurar la reducción del transporte de kinurenina a su través mediante la determinación de los metabolitos de esta vía en tejido cerebral. Teniendo en cuenta esta limitación, se decidió emplear ratones *knockout*. La inclusión de hembras *knockout* se realizó por disponibilidad de las mismas, no con el objetivo de introducir la variable del sexo en el estudio. Esto implica la necesidad de replicar el experimento utilizando machos, ya que los test comportamentales pueden arrojar resultados diferentes en función del sexo (Barros y Ferigolo, 1998, Gomez et al., 2014). Si bien es cierto que otras investigaciones afirman que estas diferencias podrían ser mínimas (Kokras et al., 2015) y que los ejemplos mencionados evalúan únicamente el test clásico de natación forzada, aportan evidencia suficiente para considerar la variable del sexo como un posible factor confusor en los resultados presentados.

Por otro lado, el modelo utilizado de administración de LPS y otros similares pueden considerarse más como modelos inflamatorios que como modelos de depresión, cuya etiología en la mayoría de los casos responde al estrés (Leonard y Song, 1996). De hecho, la administración de un inhibidor de laIDO, el 1-metiltriptófano, sobre el modelo de estrés en el que se ha basado la presente Tesis Doctoral, el CMS, ha conseguido prevenir el desarrollo del fenotipo de tipo depresivo en ratón (Liu et al., 2015c).

Además, laIDO-1 no es la única enzima que puede catalizar la conversión del triptófano en kinurenina. La isoforma 2 de laIDO (IDO-2) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO-2) también son susceptibles de activar la vía de las kinureninas y se han reportado efectos comportamentales

diferenciales al producir la delección de cada una de ellas, agregando mayor complejidad a los análisis (Too et al., 2016).

Teniendo en cuenta estos estudios, se hacen necesarias investigaciones que incluyan un análisis más completo y sistemático con diferentes test comportamentales que abarquen el amplio espectro relacionado con la depresión. La utilización de modelos animales que reflejen mejor la etiología de la enfermedad, así como un control de las posibles variables confusoras, podrían aportar una mayor fiabilidad y consistencia a las evidencias acerca de la implicación de la activación de la IDO-1 en los trastornos del estado del ánimo.

Continuando la búsqueda de elementos que vinculasen la respuesta inflamatoria con los efectos comportamentales, se centró la segunda parte de esta investigación en el FGF-21. El FGF-21 puede ser inducido por el ejercicio, fármacos antidiabéticos, la inflamación o el estrés (Kim y Lee, 2015) y experimentos previos del grupo de investigación donde se desarrollaron estos estudios registraron un incremento en la expresión hepática del FGF-21 a las 24 horas tras la administración del LPS.

El bloqueo mediante la administración de un anticuerpo de neutralización antiFGF-21 recuperó el consumo de sacarosa a niveles basales a las 24 horas tras la inyección de LPS mientras que en el grupo de LPS tratado con IgG como vehículo dicho consumo continuaba siendo inferior. Teniendo en cuenta que este factor puede atravesar la barrera hematoencefálica y actuar en el núcleo paraventricular del hipotálamo para suprimir la ingesta de soluciones azucaradas (von Holstein-Rathlou et al., 2016), podría ser responsable de la anhedonia presente en el *sickness behavior*. Además, los efectos que median en esta situación únicamente estarían relacionados con el consumo de sacarosa, ya que tanto el test de natación forzada como los parámetros fisiológicos (peso del ratón e ingesta de comida) no variaron al neutralizar la señalización del FGF-21.

Sin embargo, la anhedonia representa un comportamiento complejo de analizar y sobre cuya definición existe aún controversia, incluso con subdivisiones del término que hacen referencia a las diferentes componentes del mismo (Treadway y Zald, 2011, Thomsen, 2015). Esto implica que la simple reducción en el consumo de sacarosa no es suficiente para evaluar la anhedonia que pueda presentar un animal sometido a un modelo inductor de un comportamiento de tipo depresivo. Es más, el *sickness behavior* inducido por el LPS parece que sí ejerce efectos sobre la motivación necesaria para alcanzar una recompensa pero que no reduce la sensibilidad hacia la misma (Vichaya et al., 2014), chocando con el concepto clásico referido a la pura etimología de anhedonia como “ausencia de placer”.

Por otro lado, es escasa la información acerca de las acciones que regula el FGF-21 en el organismo. Su reciente descubrimiento como hormona metabólica (Kharitonov et al., 2005) y su posible conexión con patologías psiquiátricas (Turner et al., 2016) hace que merezca la pena la profundización en sus acciones, aunque requiera de una caracterización previa que aclare su papel a nivel periférico y central. Por ejemplo, la dieta puede provocar la producción diferencial del FGF-21 según el tejido ante el mismo estímulo (Asrih et al., 2015), por lo que la contribución a los valores finales disponibles en plasma para su acción en el cerebro no podría inferirse de la acción sobre un único órgano.

A pesar de estas limitaciones, los resultados de este experimento son prometedores acerca del papel que pueda jugar este factor en el consumo de sacarosa durante el *sickness behavior*. Además, el FGF-21 podría aportar datos interesantes acerca de la conexión entre la depresión y otras patologías psiquiátricas con enfermedades metabólicas con las que presentan una comorbilidad elevada, como la diabetes o la obesidad.

4. Activación neuroinflamatoria en depresión y resistencia al tratamiento: estudios en cerebros humanos *post-mortem*

El último bloque de resultados apunta hacia la participación de rutas inflamatorias y oxidativo/nitrosativas en pacientes con trastorno depresivo mayor (MDD). Con este objetivo, hemos considerado el análisis de elementos que habíamos encontrado desregulados en el modelo animal que utilizamos, el *chronic mild stress* (CMS), relacionados con las rutas del receptor *Toll-like 4* (TLR-4) y del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) así como algunos elementos involucrados en la apoptosis y la regulación de la liberación de neurotransmisores que refuerzan la evidencia de la participación de la neuroinflamación y el estrés oxidativo/nitrosativo en la fisiopatología del MDD.

El TLR-4 es un receptor de inmunidad innata que desencadena una compleja cascada proinflamatoria (Akira y Takeda, 2004). A nivel del sistema nervioso central (SNC), TLR-4 se expresa en microglía, neuronas, astroglia, oligodendroglía y el endotelio vascular cerebral (García-Bueno et al., 2008a). Este receptor ejerce un papel central al comienzo de la respuesta neuroinflamatoria en patologías como la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson, el traumatismo cerebral, la esclerosis múltiple, el ictus y el dolor crónico (Buchanan et al., 2010, Trotta et al., 2014).

En el ámbito de las patologías psiquiátricas, se ha descrito una activación del TLR-4 en pacientes con esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión y en modelos animales de estrés (García Bueno et al., 2016). De entre los diferentes motivos para el estudio del TLR-4 en el MDD, destaca que un microbioma alterado y señales de inflamación en el intestino, aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal y el fenómeno de la traslocación bacteriana están presentes en pacientes con MDD (Maes et al., 2008, Maes et al., 2012b, Berk et al., 2013, Jiang et al., 2015b).

Nuestro estudio indicó que la expresión de TLR-4 en el cerebro no se induce por el MDD, al menos en el momento en el que se tomaron las muestras. Sin embargo, este hecho no excluye posibles efectos a otros niveles, como por ejemplo la existencia de mecanismos de activación post-traduccionales. De hecho, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con antidepresivos tiende a disminuir los niveles de TLR-4.

Aparte de los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs), los receptores *Toll-like* detectan señales endógenas no infecciosas de daño tisular secretadas por el tejido en peligro conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que activan el sistema inmune de igual manera que los PAMPs (Thundiyil y Lim, 2015). Pertenecientes a estos DAMPs, las proteínas de choque térmico (Hsp) 60 y 70 son activadores del TLR-4 (Vabulas et al., 2001, Asea et al., 2002).

Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de la proteína Hsp 70 en pacientes con MDD comparando con sus controles pareados. Al separar a los pacientes entre tratados y no tratados la significación estadística se pierde, aunque parece persistir una tendencia al aumento en su expresión.

Con el objetivo de tratar de elucidar el posible papel del receptor TLR-4, se analizó la expresión del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) y de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), activadas por este receptor (Guha y Mackman, 2001). El NF- κ B es uno de los principales orquestadores de la respuesta inflamatoria con la inducción de múltiples mediadores como genes proinflamatorios y proteínas de fase aguda tanto en humanos como en roedores (Mitchell y Vargas, 2016). Por su parte, la familia de las MAPKs está implicada en gran cantidad de procesos celulares mediante los que estímulos extracelulares provocan inflamación (incluyendo la producción de mediadores inflamatorios), destacando la importante función que desempeñan en la regulación del NF- κ B (Schmitz et al., 2001). Otra importante señalización de las MAPKs a partir de las citoquinas proinflamatorias está relacionada con el aumento en la expresión y función de los transportadores recaptadores de monoaminas (Moron et al., 2003, Zhu et al., 2006).

El análisis de la expresión nuclear de la subunidad p65 del NF- κ B reveló un descenso en su expresión en pacientes con MDD. Sin embargo, al separar este grupo en función de la presencia o ausencia del tratamiento la significación estadística desaparece en ambos. Es importante recordar que el análisis estadístico realizado incorpora el hecho de que el NF- κ B fue el único parámetro afectado por una correlación positiva con el índice de masa corporal (IMC) de los individuos y que dicho IMC resultó ser menor en los depresivos que en los controles de manera aleatoria. Dadas las importantes implicaciones del NF- κ B en la regulación bioenergética y su implicación en enfermedades metabólicas como la obesidad (Tornatore et al., 2012), no podemos descartar que este parámetro se vea modulado por el IMC además de por la propia patología depresiva, apareciendo como variable confusora del análisis. A pesar de ello, otra posibilidad para la disminución detectada radica en el agotamiento de la vía tras su estimulación

crónica, situación que encaja con la depresión y otras patologías con componente neuroinflamatorio (Sun et al., 1994, Gárate et al., 2011a).

Respecto a las MAPKs, nuestros datos reflejaron un aumento en la expresión de la forma fosforilada de las quinasas reguladoras de la señal extracelular 1/2 (p-ERK1/2) al compararse con sus controles pareados. Curiosamente, si separamos los grupos según presencia o ausencia de tratamiento en los MDD, la significación estadística únicamente existe entre los controles y el grupo tratado con antidepresivos. Por tanto, es el tratamiento con antidepresivos el responsable del incremento de la forma activa de ERK1/2.

Las modificaciones sobre la activación basal de ERK inducen cambios estructurales en las neuronas que resultan responsables de fenotipos característicos de los trastornos del estado de ánimo (Einat y Manji, 2006). Las ERK1/2 han sido relacionadas con la regulación de la expresión génica y la síntesis de proteínas, modificaciones en la estructura celular o el metabolismo, diferenciación y apoptosis y estos efectos pueden estar involucrados en la fisiopatología de la depresión (Shiflett y Balleine, 2011). Por lo tanto, la efectividad de determinados fármacos como estabilizadores del ánimo y antidepresivos depende parcialmente de su habilidad para estimular la actividad de ERK en el SNC (Gourley et al., 2008, Shiflett y Balleine, 2011).

Estudios previos han reportado que en el cerebro *post-mortem* de pacientes con MDD que se han suicidado se produce un descenso en la expresión y activación de ERK (Dwivedi et al., 2001). Los resultados que hemos obtenido registraron un incremento en la expresión de la forma activada de ERK1/2 en el área de Brodmann 9 (BA9) de pacientes con MDD e indican que esta diferencia se debe a que los niveles son más elevados en el grupo tratado con antidepresivos. Por ello, parece que el tratamiento está tratando de aumentar la expresión de p-ERK1/2 quizá en un esfuerzo para recuperar la plasticidad y minimizar los efectos celulares negativos ocasionados por la patología, aunque indudablemente se requieren más investigaciones para confirmar esta hipótesis.

Nuestros datos también revelaron un incremento de las formas activadas de las MAPKs p38 y la quinasa NH₂ terminal de c-jun (JNK). Cabe destacar que el patrón de expresión al distinguir entre pacientes tratados y no tratados fue similar al descrito para ERK, siendo más alto en el grupo tratado con antidepresivos.

Tanto p38 como JNK se han relacionado con la fisiopatología de la depresión (Galeotti y Ghelardini, 2012). Concretamente, p38 se ha postulado por sus acciones proinflamatorias y por su capacidad de aumentar la expresión y función del transportador de serotonina (Haroon et al.,

2012). Por su parte, JNK también es inducida por el estrés y juega un papel fundamental en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T y la producción de citoquinas (Galeotti y Ghelardini, 2012).

Nuestros resultados mostraron que en los pacientes con MDD se producía una mayor expresión tanto de p38 como de JNK que parece apoyar la idea de su participación en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo. Sin embargo, parece contradictorio que la diferencia se deba al grupo que recibía tratamiento antidepresivo. Es importante recordar que las muestras con las que se trabajó proceden de pacientes depresivos que se suicidaron a pesar de encontrarse recibiendo el tratamiento por lo que podría postularse que los antidepresivos no funcionaron como se esperaba o que nos encontrábamos ante pacientes resistentes al tratamiento. No obstante, se hacen necesarios más estudios para corroborar esta posibilidad.

A modo de conclusión global sobre el análisis realizado en las MAPKs, parece que la ruta del TLR-4 se encuentra activa en pacientes con MDD y que los antidepresivos incrementan los niveles de las MAPKs, planteándose como posibilidad la resistencia al tratamiento debido a la procedencia de las muestras (individuos que terminaron por suicidarse).

Las fosfatasa duales específicas (DUSPs) conforman un grupo heterogéneo de fosfatasa que regulan la actividad de las MAPKs mediante defosforilación y sirven para controlar su localización subcelular (Patterson et al., 2009). Entre ellas, la DUSP2 (también conocida como fosfatasa de células activadas 1 o PAC-1) se expresa en el núcleo principalmente de tejidos hematopoyéticos con un elevado contenido en células T, pero también en otros lugares, incluido el SNC (Rohan et al., 1993). Posee especificidad de sustrato por ERK, p38 y JNK y estudios preclínicos *in vivo* han señalado a DUSP2 como un regulador negativo de la actividad de JNK y modulador de la respuesta inmune a través de la comunicación entre JNK y ERK (Jeffrey et al., 2006).

Nuestro estudio reflejó un descenso en la expresión nuclear de DUSP2 en pacientes depresivos al comparar frente a los individuos control pareados. Este resultado correlaciona inversamente con el aumento descrito en los niveles de las MAPKs en el grupo MDD. Al separar este grupo entre tratados y no tratados y tal y como ocurría con las MAPKs, la significación estadística se alcanza en los tratados con antidepresivos infiriéndose que el incremento registrado en las MAPKs podría deberse a esta disminución en la DUSP2. De nuevo, cabe recordar que las muestras sobre las que se realizan estos análisis proceden de pacientes depresivos que se suicidaron en los que los antidepresivos no funcionaron como deberían o eran resistentes al tratamiento.

El principal director de la respuesta antioxidante celular es el Nrf2, activado ante situaciones de estrés oxidativo y que provoca la transcripción de enzimas antioxidantes (Wasserman y Fahl, 1997). En los últimos años se ha teorizado sobre la posibilidad de su implicación en la fisiopatología de la depresión proponiéndose como diana terapéutica a explorar (Maes et al., 2012a, Martin-de-Saavedra et al., 2013).

Nuestro estudio registró un descenso en la ruta de Nrf2 en pacientes con MDD al comparar frente a sus controles pareados, lo que concuerda con el papel potencial de Nrf2 en la depresión y con el estrés oxidativo/nitrosativo descrito en esta patología (Leonard y Maes, 2012). Por lo que sabemos, esta es la primera vez que se descubre una disminución de la expresión nuclear del factor antioxidante Nrf2 en cerebros *post mortem* (BA9) de pacientes con MDD, confirmando los datos obtenidos en modelos experimentales de depresión (Martin-de-Saavedra et al., 2013, Djordjevic et al., 2015).

Si separamos el grupo de pacientes con MDD en tratados y no tratados se observa una expresión nuclear diferencial en función del tratamiento. Un estudio previo en células monocíticas humanas U-937 sugiere que las acciones de los antidepresivos sobre la expresión de enzimas antioxidantes dependen de la duración del tratamiento e incluso pueden resultar pro-oxidantes (Schmidt et al., 2008). En nuestras muestras parece que el tratamiento afectó negativamente a la ruta de Nrf2, lo que concuerda con el estudio señalado y con las implicaciones derivadas de la procedencia de pacientes que se han suicidado mencionadas previamente.

La administración de citoquinas proinflamatorias estimula la producción de la proteína S100 de unión a calcio A10 (S100A10 o p11) a través de mecanismos aún desconocidos (Warner-Schmidt et al., 2011). Además, estudios previos en modelos genéticos demuestran que ratones *knockout* para S100A10 desarrollan un fenotipo de tipo depresivo y que la sobreexpresión de esta proteína posee propiedades antidepresivas (Svenningsson et al., 2006). Los propios antidepresivos convencionales tales como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs) y los antidepresivos tricíclicos (ATCs) inducen su expresión, contribuyendo este incremento a la disposición de receptores de serotonina en la membrana plasmática y amplificando así la acción de los antidepresivos (Svenningsson et al., 2013).

La expresión de S100A10 no se modificó en nuestros resultados al comparar entre pacientes con MDD y controles, pero sí se registró un aumento en el grupo tratado con antidepresivos frente a sus controles pareados. Aunque este hallazgo resulta consistente con otros resultados previos en animales y pacientes, hasta donde sabemos éste es el primer estudio que desvela un incremento de S100A10 en cerebros *post mortem* (BA9) de pacientes con MDD que se

encontraban en tratamiento con antidepresivos, posicionándolo como una prometedora línea de investigación en el futuro.

Nuestros resultados también reflejaron un aumento en los pacientes con MDD en la expresión proteica de la proteína extra grande del linfoma de células B (Bcl-xL), de características anti-apoptóticas, al comparar frente a sus controles pareados. Habitualmente, los estudios llevados a cabo en depresión apuntan hacia un incremento en los factores pro-apoptóticos y una reducción en los anti-apoptóticos. De hecho, una mayor vulnerabilidad hacia la apoptosis relacionada con Bcl-2 parece que contribuye a la disminución en los volúmenes de determinadas áreas cerebrales en pacientes con MDD (Drevets et al., 2008). Sin embargo, estos estudios habitualmente se desarrollan en el hipocampo, es más, se ha descrito que los niveles de Bcl-xL no se modifican en el córtex prefrontal tras la exposición a un modelo experimental de depresión (Kosten et al., 2008) y que los antidepresivos son capaces de incrementar los niveles de mRNA de Bcl-xL (Shishkina et al., 2012).

En relación a otros resultados de nuestro estudio, el aumento descrito para la forma activa de ERK podría explicar los niveles proteicos elevados de Bcl-xL debido a la conocida implicación de ERK en la promoción de la supervivencia celular y a su relación con el incremento de Bcl-xL (Bonni et al., 1999). Además, el gen de Bcl-xL es diana de la proteína activadora-1, producida como consecuencia de la activación de las MAPKs (Manicassamy et al., 2006). En consecuencia, nuestro estudio parece indicar que la activación de ERK en pacientes con depresión induce la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-xL, lo que podría suponer que la apoptosis no representa un factor crítico en el BA9 de los pacientes con MDD, aunque esta afirmación necesita contrastarse con una investigación más exhaustiva acerca del papel de la apoptosis en esta área cerebral.

Sintetizando los hallazgos de nuestros estudios empleando muestras del banco de cerebros (Figura 68), se encontró un aumento en los niveles de la chaperona Hsp 70, ligando endógeno del TLR-4, y en diversos elementos de la cascada de señalización de las MAPKs en muestras de cerebro *post mortem* (BA9) de pacientes con MDD. Además, otros mecanismos celulares relacionados con la capacidad antioxidante (Nrf2), la neurotransmisión (S100A10) y la apoptosis (Bcl-xL) se encontraron afectados. Particularmente, se describe por primera vez en el área BA9 de pacientes con MDD una reducción en la ruta de Nrf2 y una potenciación con los antidepresivos de la transmisión serotoninérgica mediante el incremento de S100A10. Además, se detectó un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL independientemente de la presencia o ausencia del tratamiento antidepresivo. Todas estas vías

de señalización podrían resultar de interés en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. Además, la procedencia de las muestras de pacientes que han fallecido por suicidio otorga especial relevancia al grupo tratado con antidepresivos, ya que nos sitúa ante posibles casos de resistencia al tratamiento y donde, por tanto, la corrección de los desequilibrios detectados podría suponer la mejora diferencial en la clínica de la depresión. Más allá de estas especulaciones, la investigación realizada proporciona importantes evidencias que animan a la profundización en el estudio de los mecanismos moleculares señalados y en la clarificación del papel de la inmunidad innata a través del TLR-4 y su potencial daño asociado en depresión.

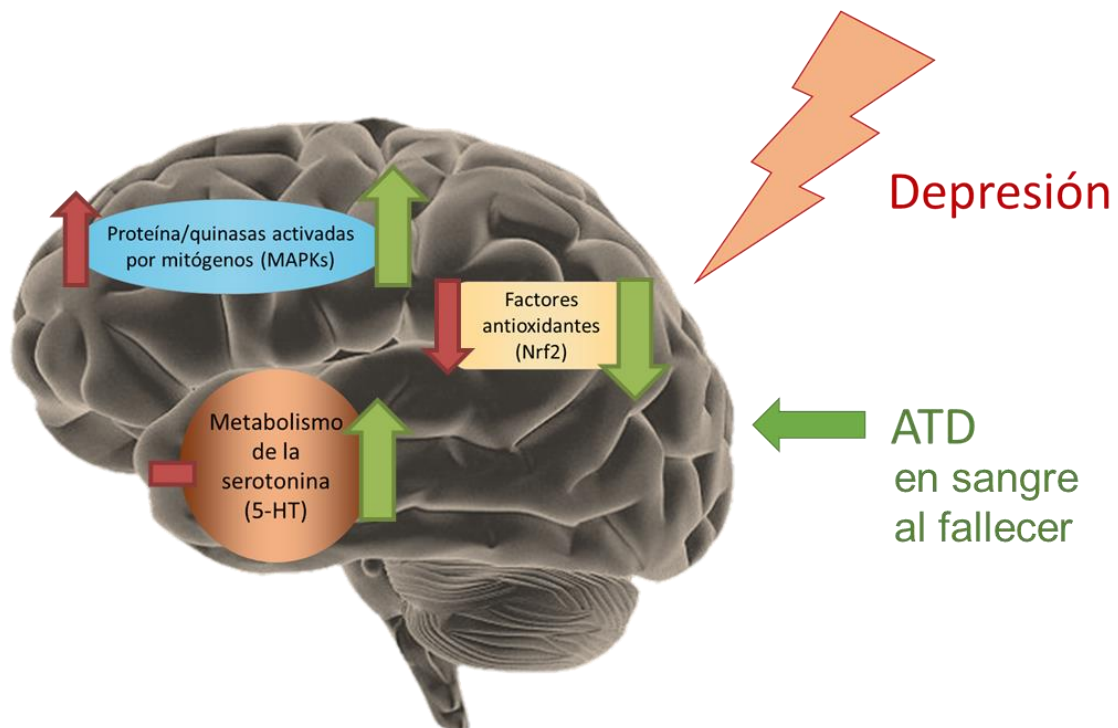


Figura 68. Efectos comportamentales del bloqueo de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) sobre el sickness behavior inducido por la administración de lipopolisacárido (LPS) en ratón. SPT: test de preferencia por la sacarosa; VWR: ejercicio espontáneo en rueda giratoria.

5. Discusión global y nuevos horizontes en la investigación en depresión

La depresión es una enfermedad psiquiátrica identificada clásicamente por un déficit en la producción de monoaminas basado en el efecto antidepresivo de fármacos que aumentan la disponibilidad de monoaminas en la hendidura sináptica. Sin embargo, la existencia de aproximadamente un tercio de pacientes resistentes al tratamiento farmacológico revela las carencias aún existentes en el conocimiento sobre la fisiopatología de la depresión. En este sentido, se han formulado en los últimos años diferentes hipótesis que tratan de aportar luz sobre su origen, sus causas y sus consecuencias, resultando especialmente relevante la contribución de la inflamación y el sistema inmune al proceso no sólo depresivo, sino psiquiátrico en general.

La investigación realizada se enmarca dentro de esta hipótesis y aporta datos interesantes a la nueva visión de la depresión. Valiéndonos de modelos preclínicos en rata y ratón, hemos descrito una disminución en la ruta potencialmente neuroprotectora del factor antioxidante Nrf2 que correlaciona inversamente con un aumento del estrés oxidativo. Además, se exploró la contribución de la activación inflamatoria de laIDO-1 sobre la inducción de la vía de las kinureninas, obteniendo resultados positivos. Sobre estos dos desequilibrios, se evaluó la acción de tres representantes de los tipos de antidepresivos más prescritos en la actualidad observando su capacidad de modular estas vías de manera diferencial entre ellos y a distintos niveles.

El TLR-4 se ha estudiado profundamente como un elemento clave en la respuesta inmune innata con la que cursan diversas patologías psiquiátricas. El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, describió en trabajos previos su participación en el modelo de depresión en rata *chronic mild stress* (CMS) a través del incremento en la expresión del NF- κ B y factores relacionados a la respuesta inflamatoria que orchestra. La traslocación bacteriana inducida por estrés constituye otro de los mecanismos que podrían jugar un papel en depresión y, dado que el LPS bacteriano es ligando exógeno del TLR-4, se plantea como posibilidad que ejerzan parte de sus acciones modulando esta vía. De hecho, se ha descrito cómo el uso de la administración de antibióticos de manera crónica para reducir la flora intestinal normal produce que elementos inmunes desregulados restaurasen sus niveles. Los resultados incluidos en esta Tesis representan la continuación de dicha investigación, demostrando una disfunción intestinal y traslocación bacteriana y explorando sus efectos a nivel cerebral. Para ello, se analizaron las MAPKs, fruto de la inducción de TLR-4, descubriendo un incremento de la

MAPK p38 y una reducción en la ruta de Nrf2. De manera relevante, el tratamiento con antibióticos restauró o minimizó el impacto generado por el estrés sobre estos parámetros consiguiendo a su vez recuperar algunos efectos comportamentales a nivel basal.

En aras de la traslacionalidad de los resultados se llevó a cabo un análisis de algunos de estos mediadores que habíamos encontrado desregulados en el PFC de pacientes depresivos que se habían suicidado, así como de controles. Se registró un incremento del ligando endógeno de TLR-4 Hsp70, de las formas fosforiladas de las MAPKs y de Bcl-xL y una disminución de la ruta antioxidante de Nrf2. Cabe destacar que tanto el aumento en la MAPK p38 como la disminución en la ruta antioxidante Nrf2 coinciden con los datos preclínicos descritos previamente en nuestro modelo de depresión utilizado, el CMS. Curiosamente, los efectos producidos en las muestras de origen humano fueron más potentes en los individuos que se encontraban en tratamiento farmacológico antidepresivo por lo que se plantea como posibilidad que se tratase de pacientes resistentes o en los que el tratamiento no funcionó como debería, teniendo en cuenta que terminaron por suicidarse.

A pesar de la información relevante que se desprende, la investigación realizada presenta limitaciones que debemos señalar. Por un lado, la aplicación de animales en patología psiquiátrica, es muy compleja, ya que son enfermedades específicamente humanas y cualquier modelo preclínico que utilicemos podrá emular algunos aspectos, pero nunca la enfermedad completa. Además, la medición de estos aspectos se lleva a cabo mediante test comportamentales que representan paradigmas bien estudiados y reconocidos, pero de evaluación costosa. Respecto a las muestras humanas, la limitación en el número de las mismas es un factor a tener en cuenta, dada la gran cantidad de posibles variables confusoras y su análisis por pares que limita la potencia estadística. Esto hace que podamos no estar detectando todas las alteraciones, pero, a su vez, otorga mayor valor si cabe a los resultados obtenidos. Por otro lado, la procedencia de las muestras utilizadas representa una subpoblación de pacientes depresivos que han fallecido por suicidio. Esto implica que probablemente estemos ante pacientes resistentes al tratamiento farmacológico, impidiéndonos analizar los efectos de los antidepresivos sobre la población que sí responde a los antidepresivos y correlacionarlos con su historia clínica. Desde otra perspectiva, las determinaciones se realizan directamente sobre tejido nervioso en áreas directamente implicadas en la depresión, situación imposible de aplicar *in vivo* teniendo que recurrir a aproximaciones a nivel periférico que, si bien aportan información valiosa, no nos permiten afirmar que esas mismas alteraciones se produzcan *in situ* en el sistema nervioso central.

A pesar de todas estas limitaciones que dificultan la investigación, tenemos que ser conscientes de que los descubrimientos que aportan los resultados aquí recogidos poseen un valor potencial, resultando además robustos gracias a las importantes correlaciones entre la preclínica y los pacientes que aportan un enfoque traslacional necesario para que puedan llegar a la clínica. Además, todos y cada uno de los hallazgos que se registran en el campo de la investigación en depresión pueden suponer el desarrollo de nuevos tratamientos y una mejora de la calidad de vida para los pacientes de esta enfermedad que, desgraciadamente, cada día posee un mayor impacto en la sociedad.

VI) Conclusiones

1. Conclusiones

1. La exposición de ratas Wistar Hannover a un modelo experimental de depresión (*chronic mild stress*, CMS) induce un comportamiento de tipo depresivo y provoca desequilibrios en mecanismos reguladores de procesos inflamatorios y oxidativos en la corteza prefrontal a través de las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la ruta antioxidante del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) y la vía de las kinureninas, favoreciendo un perfil potencial de daño cerebral.
2. La ausencia de alteraciones en la ruta de Nrf2 a nivel hipocampal en rata tras el CMS apuntan hacia una afectación diferencial según el área cerebral, postulándose como posible que el daño en el hipocampo esté menos relacionado con elementos inflamatorios y de estrés oxidativo en el modelo experimental utilizado.
3. Los distintos tipos de antidepresivos más empleados en clínica, representados por la desipramina, el escitalopram y la duloxetina, son capaces de modular y controlar algunos de los efectos del CMS sobre el estrés oxidativo en el córtex prefrontal del cerebro de rata. Particularmente, la desipramina y la duloxetina se mostraron más eficaces para revertir la disminución registrada en la ruta de Nrf2.
4. El CMS modula la transmisión de la serotonina y la noradrenalina en el córtex prefrontal de rata hacia una disminución en la neurotransmisión monoaminérgica a través de los receptores de serotonina y del transportador de noradrenalina. Los tratamientos con desipramina, escitalopram y duloxetina restauran la mayor parte de las deficiencias inducidas por el CMS.
5. El CMS induce la activación inflamatoria de la vía de las kinureninas en el córtex prefrontal de rata hacia una mayor producción de ácido quinolínico, de potencial neurotóxico por sus acciones sobre los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). El tratamiento con los antidepresivos desipramina, escitalopram y duloxetina es capaz de revertir los efectos causados por la exposición a CMS sobre esta vía
6. La traslocación bacteriana desde el colon se produce en rata tras la exposición al CMS y participa en la neuroinflamación detectada en el córtex prefrontal mediante la MAPK p38 y la ruta antioxidante de Nrf2. Además, influye sobre el comportamiento ya que su prevención a través del tratamiento con antibióticos consiguió restaurar algunos de los parámetros relacionados con la depresión, medidos por distintos test comportamentales.
7. El modelo inflamatorio por inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratón induce un comportamiento enfermizo o *sickness behavior* relacionado con algunos síntomas

depresivos. En este modelo, el bloqueo de la vía de las kinureninas no pareció tener implicaciones en la anhedonia y la motivación, pero el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) es un posible responsable de la disminución del consumo de sacarosa producido tras la administración de LPS.

8. En humanos, los pacientes con depresión mayor presentan desequilibrios inflamatorios y relacionados con el estrés oxidativo en el área 9 de Brodmann de la corteza prefrontal con independencia de la presencia o ausencia de tratamiento antidepresivo. Los mecanismos a través de los que se producen son, al menos, la activación del receptor *Toll-like 4* (TLR-4) y las proteína/quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de la disminución de la ruta de Nrf2, en línea con los resultados preclínicos descritos en esta Tesis Doctoral. Dado que las muestras proceden de pacientes en los que hubo un evidente fracaso terapéutico, se infiere que el control de las vías inflamatorias en depresión podría ser crucial en el tratamiento de la depresión resistente.

VII) Bibliografía

- Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S (2012) Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of affective disorders* 141:308-314.
- AEMPS (2014) Utilización de medicamentos antidepresivos en España durante el periodo 2000-2012. vol. 15012014, pp 1-3.
- Aguiar AS, Jr., Stragier E, da Luz Scheffer D, Remor AP, Oliveira PA, Prediger RD, Latini A, Raisman-Vozari R, Mongeau R, Lanfumey L (2014) Effects of exercise on mitochondrial function, neuroplasticity and anxio-depressive behavior of mice. *Neuroscience* 271:56-63.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 4:499-511.
- Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochemical Society transactions* 40:139-146.
- Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C (2014) Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8:199.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
- Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nature medicine* 8:878-884.
- Ali SR, Timmer AM, Bilgrami S, Park EJ, Eckmann L, Nizet V, Karin M (2011) Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage. *Immunity* 35:34-44.
- American Psychiatric Association (2013) Section II. Diagnostic Criteria and Codes. Depressive Disorders. In: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* Washington, DC.
- Anacker C, Cattaneo A, Luoni A, Musaelyan K, Zunszain PA, Milanese E, Rybka J, Berry A, Cirulli F, Thuret S, Price J, Riva MA, Gennarelli M, Pariante CM (2013) Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38:872-883.
- Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM, Wingate A, Monk CE, Toth R, Santos SG, Iversen L, Arthur JS (2008) The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nature immunology* 9:1028-1036.
- Anderson G, Maes M (2014) Oxidative/nitrosative stress and immuno-inflammatory pathways in depression: treatment implications. *Current pharmaceutical design* 20:3812-3847.
- Ando T, Brown RF, Berg RD, Dunn AJ (2000) Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 279:R2164-R2172.
- Aonurm-Helm A, Jurgenson M, Zharkovsky T, Sonn K, Berezin V, Bock E, Zharkovsky A (2008) Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *The European journal of neuroscience* 28:1618-1628.
- Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of cell science* 110 (Pt 3):369-378.
- Arnone D, McIntosh AM, Ebmeier KP, Munafo MR, Anderson IM (2012) Magnetic resonance imaging studies in unipolar depression: systematic review and meta-regression analyses. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 22:1-16.

- Arthur JS, Ley SC (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature reviews Immunology* 13:679-692.
- Artigas F (2013) Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacology & therapeutics* 137:119-131.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends in neurosciences* 19:378-383.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of biological chemistry* 277:15028-15034.
- Asrih M, Altirriba J, Rohner-Jeanrenaud F, Jornayvaz FR (2015) Ketogenic Diet Impairs FGF21 Signaling and Promotes Differential Inflammatory Responses in the Liver and White Adipose Tissue. *PloS one* 10:e0126364.
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475:91-95.
- Avdoshina V, Mocchetti I, Liu C, Young MA, Anastos K, Cohen M, Crystal H, Pearce CL, Golub ET, Tractenberg RE (2013) Single-nucleotide polymorphisms in TrkB and risk for depression: findings from the women's interagency HIV study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 64:138-141.
- Axelrod J, Reisine TD (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science (New York, NY)* 224:452-459.
- Aye IL, Jansson T, Powell TL (2015) TNF-alpha stimulates System A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. *Physiological reports* 3.
- Babcock TA, Carlin JM (2000) Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 12:588-594.
- Baldwin DS, Hawley CJ, Mellors K (2001) A randomized, double-blind controlled comparison of nefazodone and paroxetine in the treatment of depression: safety, tolerability and efficacy in continuation phase treatment. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 15:161-165.
- Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jeremiin LS, Hunt NH (2007) Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396:203-213.
- Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G (2010) Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Molecular psychiatry* 15:501-511.
- Bancos S, Baglione CJ, Rahman I, Phipps RP (2010) Induction of heme oxygenase-1 in normal and malignant B lymphocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) requires Nrf2. *Cellular immunology* 262:18-27.
- Bandyopadhyay S, Chiang CY, Srivastava J, Gersten M, White S, Bell R, Kurschner C, Martin C, Smoot M, Sahasrabudhe S, Barber DL, Chanda SK, Ideker T (2010) A human MAP kinase interactome. *Nature methods* 7:801-805.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* 1:549-553.
- Barnes NM, Andrade R, Bockaert J, Butler A, Hamon M, Hensler J, Herrick-Davis K, Hoyer D, Maroteaux L, Martin GR, Peters JA, Roth B, Sharp T, Vivallan CM, Neumaier J 5-Hydroxytryptamine receptors, . IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.

- Barros HM, Ferigolo M (1998) Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23:279-286.
- Barth J, Munder T, Gerger H, Nuesch E, Trelle S, Znoj H, Juni P, Cuijpers P (2013) Comparative efficacy of seven psychotherapeutic interventions for patients with depression: a network meta-analysis. *PLoS medicine* 10:e1001454.
- Barton GM, Medzhitov R (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science (New York, NY)* 300:1524-1525.
- Bauer HC, Krizbai IA, Bauer H, Traweger A (2014) "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. *Frontiers in neuroscience* 8:392.
- Beasley CL, Pennington K, Behan A, Wait R, Dunn MJ, Cotter D (2006) Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes. *Proteomics* 6:3414-3425.
- Bekhuis E, Boschloo L, Rosmalen JG, de Boer MK, Schoevers RA (2016) The impact of somatic symptoms on the course of major depressive disorder. *Journal of affective disorders* 205:112-118.
- Belmaker RH, Agam G (2008) Major depressive disorder. *The New England journal of medicine* 358:55-68.
- Benmansour S, Altamirano AV, Jones DJ, Sanchez TA, Gould GG, Pardon M-C, Morilak DA, Frazer A (2004) Regulation of the norepinephrine transporter by chronic administration of antidepressants. *Biological Psychiatry* 55:313-316.
- Benros ME, Mortensen PB, Eaton WW (2012) Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1262:56-66.
- Berk M, Williams LJ, Jacka FN, O'Neil A, Pasco JA, Moylan S, Allen NB, Stuart AL, Hayley AC, Byrne ML, Maes M (2013) So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC medicine* 11:200.
- Berlim MT, Van den Eynde F, Jeff Daskalakis Z (2013) Clinically meaningful efficacy and acceptability of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treating primary major depression: a meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38:543-551.
- Berman RM, Fava M, Thase ME, Trivedi MH, Swanink R, McQuade RD, Carson WH, Adson D, Taylor L, Hazel J, Marcus RN (2009) Aripiprazole augmentation in major depressive disorder: a double-blind, placebo-controlled study in patients with inadequate response to antidepressants. *CNS spectrums* 14:197-206.
- Berntsson PB, Carlsson A, Corrodi HR (1972) Composés Utiles Tant qu'Agents Anti-dépressifs, et Procédé pour Leur Préparation. vol. Belgian Patent No. 781.105.
- Berton O, Nestler E (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience* 7:137-151.
- Bjarnason I, Peters TJ, Wise RJ (1984) The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. *Lancet (London, England)* 1:179-182.
- Blackmore R (1725) *A Treatise of the Spleen and Vapours, Or Hypochondriacal and Hysterical Affections.* 428.
- Blier P, Ward NM (2003) Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry* 53:193-203.
- Bohorquez DV, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, Wang F, Liddle RA (2015) Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *The Journal of clinical investigation* 125:782-786.
- Boldrini M, Santiago AN, Hen R, Dwork AJ, Rosoklija GB, Tamir H, Arango V, John Mann J (2013) Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38:1068-1077.

- Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V (2009) Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 34:2376-2389.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science (New York, NY)* 286:1358-1362.
- Bora E, Fornito A, Pantelis C, Yucel M (2012) Gray matter abnormalities in Major Depressive Disorder: a meta-analysis of voxel based morphometry studies. *Journal of affective disorders* 138:9-18.
- Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF (2014) Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine* 20:509-518.
- Bortolasci CC, Vargas HO, Souza-Nogueira A, Barbosa DS, Moreira EG, Nunes SO, Berk M, Dodd S, Maes M (2014) Lowered plasma paraoxonase (PON)1 activity is a trait marker of major depression and PON1 Q192R gene polymorphism-smoking interactions differentially predict the odds of major depression and bipolar disorder. *Journal of affective disorders* 159:23-30.
- Bortolozzi A, Castane A, Semakova J, Santana N, Alvarado G, Cortes R, Ferres-Coy A, Fernandez G, Carmona MC, Toth M, Perales JC, Montefeltro A, Artigas F (2012) Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT1A autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Molecular psychiatry* 17:612-623.
- Boulenger JP, Loft H, Olsen CK (2014) Efficacy and safety of vortioxetine (Lu AA21004), 15 and 20 mg/day: a randomized, double-blind, placebo-controlled, duloxetine-referenced study in the acute treatment of adult patients with major depressive disorder. *International clinical psychopharmacology* 29:138-149.
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science (New York, NY)* 249:64-67.
- Bovasso GB (2001) Cannabis abuse as a risk factor for depressive symptoms. *The American journal of psychiatry* 158:2033-2037.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* May 7;72:248-254.
- Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorianchikova G, Ivanov D, Nathanson L, Barnum SR, Bethea JR (2009) Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 182:2628-2640.
- Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Kundu P, Gulyas B, Halldin C, Hultenby K, Nilsson H, Hebert H, Volpe BT, Diamond B, Pettersson S (2014) The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine* 6:263ra158.
- Bravo L, Mico JA, Rey-Brea R, Perez-Nievas B, Leza JC, Berrocoso E (2012) Depressive-like states heighten the aversion to painful stimuli in a rat model of comorbid chronic pain and depression. *Anesthesiology* 117:613-625.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS, Haven W (2000) Hippocampal Volume Reduction in Major Depression. *The American journal of psychiatry* 157:115-117.
- Bridges N, Slais K, Sykova E (2008) The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers: a comparison of male and female Wistar rats. *Acta neurobiologiae experimentalis* 68:131-138.

- Brodie BB, Pletscher A, Shore PA (1955) Evidence that serotonin has a role in brain function. *Science (New York, NY)* 122:968.
- Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, Rumble JM, Narasimhachari N, Perozzi EF, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K (2003) Catecholamines in a macrophage cell line. *Journal of neuroimmunology* 135:47-55.
- Bubar MJ, Stutz SJ, Cunningham KA (2011) 5-HT(2C) receptors localize to dopamine and GABA neurons in the rat mesoaccumbens pathway. *PloS one* 6:e20508.
- Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H (2010) Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem* 114:13-27.
- Bukalo O, Fentrop N, Lee AY, Salmen B, Law JW, Wotjak CT, Schweizer M, Dityatev A, Schachner M (2004) Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long-term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:1565-1577.
- Burrell RH (1956) Depression associated with reserpine therapy. *The New Zealand medical journal* 55:228-231.
- Butts CL, Jones YL, Lim JK, Salter CE, Belyavskaya E, Sternberg EM (2011) Tissue expression of steroid hormone receptors is associated with differential immune responsiveness. *Brain, behavior, and immunity* 25:1000-1007.
- Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Jibard N, Hollenberg SM, Giguere V, Evans RM, Baulieu EE (1991) Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *The Journal of biological chemistry* 266:5834-5841.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *The American journal of psychiatry* 161:598-607.
- Canale V, Kurczab R, Partyka A, Sataa G, Ledna T, Jastrzebska-Wiesek M, Wesoowska A, Bojarski AJ, Zajdel P (2016a) Towards new 5-HT7 antagonists among arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)ethyl-alkyl amines: Multiobjective based design, synthesis, and antidepressant and anxiolytic properties. *European journal of medicinal chemistry* 108:334-346.
- Canale V, Kurczab R, Partyka A, Satala G, Lenda T, Jastrzebska-Wiesek M, Wesolowska A, Bojarski AJ, Zajdel P (2016b) Towards new 5-HT7 antagonists among arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)ethyl-alkyl amines: Multiobjective based design, synthesis, and antidepressant and anxiolytic properties. *European journal of medicinal chemistry* 108:334-346.
- Cannon W (1929a) Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Cannon WB (1929b) Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews* 9:399-431.
- Capuron L, Ravaud A, Miller AH, Dantzer R (2004) Baseline mood and psychosocial characteristics of patients developing depressive symptoms during interleukin-2 and/or interferon-alpha cancer therapy. *Brain, behavior, and immunity* 18:205-213.
- Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R (2002) Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Molecular psychiatry* 7:468-473.
- Carey M, Small H, Yoong SL, Boyes A, Bisquera A, Sanson-Fisher R (2014) Prevalence of comorbid depression and obesity in general practice: a cross-sectional survey. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* 64:e122-127.

- Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature immunology* 7:1074-1081.
- Caso JR, Hurtado O, Pereira MP, Garcı B, Menche L, Alou L, Moro A, Lizasoain I, Leza JC (2009) Colonic bacterial translocation as a possible factor in stress-worsening experimental stroke outcome. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 296:979-985.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Moro MA, Lizasoain I (2008) Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39:1314-1320.
- Caunt CJ, Keyse SM (2013) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *The FEBS journal* 280:489-504.
- Cawley NX, Li Z, Loh YP (2016) 60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides. *Journal of molecular endocrinology* 56:T77-97.
- Cepeda MS, Stang P, Makadia R (2016) Depression Is Associated With High Levels of C-Reactive Protein and Low Levels of Fractional Exhaled Nitric Oxide: Results From the 2007-2012 National Health and Nutrition Examination Surveys. *The Journal of clinical psychiatry*.
- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:2781-2787.
- Cichon C, Sabharwal H, Ruter C, Schmidt MA (2014) MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions. *Tissue barriers* 2:e944446.
- Civen M, Knox WE (1960) The specificity of tryptophan analogues as inducers, substrates, inhibitors, and stabilizers of liver tryptophan pyrrolase. *The Journal of biological chemistry* 235:1716-1718.
- ClinicalTrials.gov National Institutes of Health (2016) ClinicalTrials.gov.
- Cohen LJ, Sclar DA (2012) Issues in adherence to treatment with monoamine oxidase inhibitors and the rate of treatment failure. *The Journal of clinical psychiatry* 73 Suppl 1:31-36.
- Cohen P (2009) Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Current opinion in cell biology* 21:317-324.
- Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R (1983) A global measure of perceived stress. *Journal of health and social behavior* 24:385-396.
- Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P (1990) Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Molecular and cellular biology* 10:1498-1506.
- Colle R, Chupin M, Cury C, Vandendrie C, Gressier F, Hardy P, Falissard B, Colliot O, Ducreux D, Corruble E (2015) Depressed suicide attempters have smaller hippocampus than depressed patients without suicide attempts. *Journal of psychiatric research* 61:13-18.
- Collins SM (2001) Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 280:G315-318.
- Coulombe P, Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta* 1773:1376-1387.
- Crane GE (1956) The psychiatric side-effects of iproniazid. *The American journal of psychiatry* 112:494-501.
- Cremers TI, Giorgetti M, Bosker FJ, Hogg S, Arnt J, Mork A, Honig G, 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 : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29:1782-1789.

- Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, Cotman CW (2012) Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *Journal of neuroinflammation* 9:179.
- Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews Neuroscience* 13:701-712.
- Cryan JF, Lucki I (2000) Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 295:1120-1126.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences* 23:238-245.
- Cuijpers P, Berking M, Andersson G, Quigley L, Kleiboer A, Dobson KS (2013) A meta-analysis of cognitive-behavioural therapy for adult depression, alone and in comparison with other treatments. *Canadian journal of psychiatry Revue canadienne de psychiatrie* 58:376-385.
- Cuijpers P, Driessen E, Hollon SD, van Oppen P, Barth J, Andersson G (2012) The efficacy of non-directive supportive therapy for adult depression: a meta-analysis. *Clinical psychology review* 32:280-291.
- Cuijpers P, Geraedts AS, van Oppen P, Andersson G, Markowitz JC, van Straten A (2011) Interpersonal psychotherapy for depression: a meta-analysis. *The American journal of psychiatry* 168:581-592.
- Cuijpers P, Sijbrandij M, Koole SL, Andersson G, Beekman AT, Reynolds CF, 3rd (2014) Adding psychotherapy to antidepressant medication in depression and anxiety disorders: a meta-analysis. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)* 13:56-67.
- Cuijpers P, van Straten A, Warmerdam L (2007) Problem solving therapies for depression: a meta-analysis. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 22:9-15.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:9023-9027.
- Cusack B, Nelson A, Richelson E (1994) Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacology* 114:559-565.
- Challis C, Berton O (2015) Top-Down Control of Serotonin Systems by the Prefrontal Cortex: A Path toward Restored Socioemotional Function in Depression. *ACS chemical neuroscience* 6:1040-1054.
- Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW (1996) NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13943-13948.
- Chavarría A, Alcocer-Varela J (2004) Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity reviews* 3:251-260.
- Chen F, Wegener G, Madsen TM, Nyengaard JR (2013) Mitochondrial plasticity of the hippocampus in a genetic rat model of depression after antidepressant treatment. *Synapse (New York, NY)* 67:127-134.
- Chen P, Fan Y, Li Y, Sun Z, Bissette G, Zhu MY (2012) Chronic social defeat up-regulates expression of norepinephrine transporter in rat brains. *Neurochemistry international* 60:9-20.
- Cheng Y, Pardo M, Armini Rde S, Martinez A, Mouhsine H, Zagury JF, Jope RS, Beurel E (2016) Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that

- promotes susceptibility to depression-like behavior. *Brain, behavior, and immunity* 53:207-222.
- Christen U, von Herrath MG (2004) Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Molecular immunology* 40:1113-1120.
- Dallman MF (2005) Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Frontiers in neuroendocrinology* 26:103-108.
- Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda A, Damasio A (1994) The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science (New York, NY)* May 20;264:1102-1105.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010) Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468:562-566.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews Neuroscience* 9:46-56.
- Dantzer R, O'Connor JC, Lawson Ma, Kelley KW (2011) Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology* 36:426-436.
- Das N, Ratty A (1987) Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, and codeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* Apr;37:258-264.
- Dawson LA, Hughes ZA, Starr KR, Storey JD, Bettelini L, Bacchi F, Arban R, Poffe A, Melotto S, Hagan JJ, Price GW (2006) Characterisation of the selective 5-HT_{1B} receptor antagonist SB-616234-A (1-[6-(cis-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-2,3-dihydro-5-methoxyindol-1-yl]-1-[2'-met hyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methanone hydrochloride): in vivo neurochemical and behavioural evidence of anxiolytic/antidepressant activity. *Neuropharmacology* 50:975-983.
- de Almeida J, Mengod G (2007) Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT_{2A} receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem* 103:475-486.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews* 24:488-522.
- de Pablos RM, Villarán RF, Argüelles S, Herrera AJ, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A (2006) Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience* 26:5709-5719.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
- DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475:106-109.
- Depoortere R, Auclair AL, Bardin L, Colpaert FC, Vacher B, Newman-Tancredi A (2010) F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist: activity in models of cognition in comparison with reference 5-HT_{1A} receptor agonists. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 20:641-654.
- Detke M, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* Sep;121:66-72.

- Dhabhar FS, Burke HM, Epel ES, Mellon SH, Rosser R, Reus VI, Wolkowitz OM (2009) Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression. *Journal of psychiatric research* 43:962-969.
- Dhabhar FS, McEwen BS (1997) Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, behavior, and immunity* 11:286-306.
- Dhar AK, Barton DA (2016) Depression and the Link with Cardiovascular Disease. *Frontiers in psychiatry* 7:33.
- Di Benedetto B, Radecke J, Schmidt MV, Rupprecht R (2013) Acute antidepressant treatment differently modulates ERK/MAPK activation in neurons and astrocytes of the adult mouse prefrontal cortex. *Neuroscience* 232:161-168.
- Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:3047-3052.
- Diaz SL, Narboux-Neme N, Boutourlinsky K, Doly S, Maroteaux L (2016) Mice lacking the serotonin 5-HT_{2B} receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26:265-279.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11908-11913.
- DiSabato D, Quan N, Godbout JP (2016) Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *J Neurochem*.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Mitic M, Lukic I, Radojicic MB (2015) Alterations in the Nrf2-Keap1 signaling pathway and its downstream target genes in rat brain under stress. *Brain research* 1602:20-31.
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67:446-457.
- Draheim T, Liessem A, Scheld M, Wilms F, Weissflog M, Denecke B, Kensler TW, Zendedel A, Beyer C, Kipp M, Wruck CJ, Fragoulis A, Clarner T (2016) Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. *Glia* 64:2219-2230.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain structure & function* 213:93-118.
- Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME (1992) A functional anatomical study of unipolar depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:3628-3641.
- Driessen E, Cuijpers P, de Maat SC, Abbass AA, de Jonghe F, Dekker JJ (2010) The efficacy of short-term psychodynamic psychotherapy for depression: a meta-analysis. *Clinical psychology review* 30:25-36.
- Du MY, Wu QZ, Yue Q, Li J, Liao Y, Kuang WH, Huang XQ, Chan RC, Mechelli A, Gong QY (2012) Voxelwise meta-analysis of gray matter reduction in major depressive disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 36:11-16.
- Duman RS, Aghajanian GK (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science (New York, NY)* 338:68-72.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.

- Duncan LE, Hutchison KE, Carey G, Craighead WE (2009) Variation in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene is associated with symptoms of depression. *Journal of affective disorders* 115:215-219.
- Dunne A, Carpenter S, Brikos C, Gray P, Strelow A, Wesche H, Morrice N, O'Neill LA (2010) IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). *The Journal of biological chemistry* 285:18276-18282.
- Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LA, Gay NJ (2003) Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *The Journal of biological chemistry* 278:41443-41451.
- Durand V, Wong SY, Tough DF, Le Bon A (2004) Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: a role for IFN-alpha/beta. *Immunology and cell biology* 82:596-602.
- Duric V, Banasr M, Licznanski P, Schmidt HD, Stockmeier CA, Simen AA, Newton SS, Duman RS (2010) A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior. *Nature medicine* 16:1328-1332.
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Roberts RC, Conley RC, Tamminga CA, Pandey GN (2001) Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J Neurochem* 77:916-928.
- Einat H, Manji HK (2006) Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 59:1160-1171.
- Ekers D, Webster L, Van Straten A, Cuijpers P, Richards D, Gilbody S (2014) Behavioural activation for depression; an update of meta-analysis of effectiveness and sub group analysis. *PLoS one* 9:e100100.
- Ekselius L, von Knorring L (1998) Personality disorder comorbidity with major depression and response to treatment with sertraline or citalopram. *International clinical psychopharmacology* 13:205-211.
- Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380-397.
- Emadi-Kouchak H, Mohammadinejad P, Asadollahi-Amin A, Rasoulinejad M, Zeinoddini A, Yalda A, Akhondzadeh S (2016) Therapeutic effects of minocycline on mild-to-moderate depression in HIV patients: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *International clinical psychopharmacology* 31:20-26.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4:1313-1317.
- Erridge C, Pridmore A, Eley A, Stewart J, Poxton IR (2004) Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *Journal of medical microbiology* 53:735-740.
- Erspamer V (1946) Presenza di enteramina o di una sostanza enteraminosimile negli estratti gastrointestinali e splenici dei pesci e negli estratti gastroenterici dell'ascidie. *Experientia* 2:369-371.
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-801.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11:81-128.
- European Depression Association (2016) Epidemiology of MDD in Spain.
- Eyding D, Lelgemann M, Grouven U, Harter M, Kromp M, Kaiser T, Kerekes MF, Gerken M, Wieseler B (2010) Reboxetine for acute treatment of major depression: systematic review and meta-analysis of published and unpublished placebo and selective serotonin reuptake inhibitor controlled trials. *BMJ (Clinical research ed)* 341:c4737.

- Eyre HA, Air T, Pradhan A, Johnston J, Lavretsky H, Stuart MJ, Baune BT (2016) A meta-analysis of chemokines in major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 68:1-8.
- Eyre HA, Air T, Proctor S, Rositano S, Baune BT (2015) A critical review of the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 57:11-16.
- Ezenwa VO, Gerardo NM, Inouye DW, Medina M, Xavier JB (2012) Microbiology. Animal behavior and the microbiome. *Science (New York, NY)* 338:198-199.
- Fagius J, Osterman PO, Siden A, Wiholm BE (1985) Guillain-Barre syndrome following zimeldine treatment. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 48:65-69.
- Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Bianchi R, Marshall B, Keskin DB, Mellor AL, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P (2002) Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *International immunology* 14:65-68.
- Fan Y, Chen P, Li Y, Ordway GA, Zhu MY (2015) Effects of desipramine treatment on stress-induced up-regulation of norepinephrine transporter expression in rat brains. *Psychopharmacology* 232:379-390.
- Farquhar MG, Palade GE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology* 17:375-412.
- Fatemi SH, Laurence JA, Araghi-Niknam M, Sary JM, Schulz SC, Lee S, Gottesman, II (2004) Glial fibrillary acidic protein is reduced in cerebellum of subjects with major depression, but not schizophrenia. *Schizophrenia research* 69:317-323.
- Fattal O, Link J, Quinn K, Cohen BH, Franco K (2007) Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies. *CNS spectrums* 12:429-438.
- Fava M, Dunner DL, Greist JH, Preskorn SH, Trivedi MH, Zajecka J, Cohen M (2001) Efficacy and safety of mirtazapine in major depressive disorder patients after SSRI treatment failure: an open-label trial. *The Journal of clinical psychiatry* 62:413-420.
- Finberg JP, Gillman K (2011) Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the "cheese effect". *International review of neurobiology* 100:169-190.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T (2003a) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* 4:491-496.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT (2003b) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine* 198:1043-1055.
- Fitzgerald PB, Hoy KE, Herring SE, Clinton AM, Downey G, Daskalakis ZJ (2013) Pilot study of the clinical and cognitive effects of high-frequency magnetic seizure therapy in major depressive disorder. *Depression and anxiety* 30:129-136.
- Flinkkila E, Keski-Rahkonen A, Marttunen M, Raevuori A (2016) Prenatal Inflammation, Infections and Mental Disorders. *Psychopathology* 49:317-333.
- Flores BH, Kenna H, Keller J, Solvason HB, Schatzberg AF (2006) Clinical and biological effects of mifepristone treatment for psychotic depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:628-636.
- Fond G, Boukouaci W, Chevalier G, Regnault A, Eberl G, Hamdani N, Dickerson F, Macgregor A, Boyer L, Dargel A, Oliveira J, Tamouza R, Leboyer M (2015) The "psychomicrobiotic": Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. *Pathologie-biologie* 63:35-42.

- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812.
- Fowler JS, Logan J, Azzaro AJ, Fielding RM, Zhu W, Poshusta AK, Burch D, Brand B, Free J, Asgharnejad M, Wang GJ, Telang F, Hubbard B, Jayne M, King P, Carter P, Carter S, Xu Y, Shea C, Muench L, Alexoff D, Shumay E, Schueller M, Warner D, Apelskog-Torres K (2010) Reversible inhibitors of monoamine oxidase-A (RIMAs): robust, reversible inhibition of human brain MAO-A by CX157. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35:623-631.
- Freis ED (1954) Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *The New England journal of medicine* 251:1006-1008.
- Frodl T, Koutsouleris N, Bottlender R, Born C, Jager M, Morgenthaler M, Scheuerecker J, Zill P, Baghai T, Schule C, Rupprecht R, Bondy B, Reiser M, Moller HJ, Meisenzahl EM (2008) Reduced gray matter brain volumes are associated with variants of the serotonin transporter gene in major depression. *Molecular psychiatry* 13:1093-1101.
- Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Louise Thomas E, Bell JD (2014) The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications* 5:3611.
- Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR (1991a) Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56:2007-2017.
- Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Yoshiaki T, Smith QR (1991b) Blood-Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism. *Journal of Neurochemistry Jun;56:2007-2017*.
- Furukawa TA, McGuire H, Barbui C (2002) Meta-analysis of effects and side effects of low dosage tricyclic antidepressants in depression: systematic review. *BMJ (Clinical research ed)* 325:991.
- Gabilondo A, Rojas-Farreras S, Vilagut G, Haro JM, Fernández A, Pinto-Meza A, Alonso J (2010) Epidemiology of major depressive episode in a southern European country: Results from the ESEMeD-Spain project. *Journal of affective disorders* 120:76-85.
- Galeotti N, Ghelardini C (2012) Regionally selective activation and differential regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinase signalling pathway by protein kinase C in mood modulation. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 15:781-793.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine* 197:1107-1117.
- Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Bravo L, Berrocoso E, Caso JR, Mico JA, Leza JC (2011a) Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *Journal of neuroinflammation* 8:151.
- Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, Leza JC (2014) Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *Journal of neuroinflammation* 11:8.
- Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, Mico JA, Leza JC (2013) Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry* 73:32-43.
- Gárate I, García-Bueno B, Madrigal JLM, Bravo L, Berrocoso E, Caso JR, Mico JA, Leza JC (2011b) Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *Journal of neuroinflammation* 8:151.

- Garavaglia S, Perozzi S, Galeazzi L, Raffaelli N, Rizzi M (2009) The crystal structure of human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase in complex with 1,3-dihydroxyacetonephosphate suggests a regulatory link between NAD synthesis and glycolysis. *The FEBS journal* 276:6615-6623.
- García-Bueno B, Caso JR, Leza JC (2008a) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 32:1136-1151.
- García-Bueno B, Gasso P, MacDowell KS, Callado LF, Mas S, Bernardo M, Lafuente A, Meana JJ, Leza JC (2016) Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 proinflammatory pathway in patients with schizophrenia. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 41:E46-55.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Perez-Nievas BG, Leza JC (2008b) Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation after stress in rats. *Endocrinology* 149:1969-1978.
- García-Sevilla JA, Álvaro-Bartolome M, Díez-Alarcia R, Ramos-Miguel A, Puigdemont D, Pérez V, Álvarez E, Meana JJ (2010) Reduced platelet G protein-coupled receptor kinase 2 in major depressive disorder: antidepressant treatment-induced upregulation of GRK2 protein discriminates between responder and non-responder patients. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 20:721-730.
- García Bueno B, Caso JR, Madrigal JL, Leza JC (2016) Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 64:134-147.
- Gardner A, Johansson A, Wibom R, Nennesmo I, von Döbeln U, Hagenfeldt L, Hallström T (2003) Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *Journal of affective disorders* 76:55-68.
- Gay NJ, Keith FJ (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356.
- Gershon MD, Tack J (2007) The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132:397-414.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, NY)* 330:841-845.
- Ginty AT, Conklin SM (2015) Short-term supplementation of acute long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may alter depression status and decrease symptomology among young adults with depression: A preliminary randomized and placebo controlled trial. *Psychiatry research* 229:485-489.
- Gloaguen V, Cottraux J, Cucherat M, Blackburn IM (1998) A meta-analysis of the effects of cognitive therapy in depressed patients. *Journal of affective disorders* 49:59-72.
- Glowinski J, Axelrod J (1964) Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. *Nature* 204:1318-1319.
- Godbout JP, Moreau M, Lestage J, Chen J, Sparkman NL, O'Connor J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R, Johnson RW (2008) Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:2341-2351.
- Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ (2016) A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular psychiatry* 21:1696-1709.
- Gómez-Sámano MA, Grajales-Gomez M, Zuarth-Vazquez JM, Navarro-Flores MF, Martínez-Saavedra M, Juárez-León OA, Morales-García MG, Enriquez-Estrada VM, Gómez-Pérez

- FJ, Cuevas-Ramos D (2016) Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress. *Redox biology* 11:335-341.
- Gomez ML, Martinez-Mota L, Estrada-Camarena E, Fernandez-Guasti A (2014) Influence of the brain sexual differentiation process on despair and antidepressant-like effect of fluoxetine in the rat forced swim test. *Neuroscience* 261:11-22.
- Gong Y, Chai Y, Ding JH, Sun XL, Hu G (2011) Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. *Neuroscience letters* 488:76-80.
- Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R (2008) Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Molecular psychiatry* 13:717-728.
- Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR (2008) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol Psychiatry* 63:353-359.
- Greenhill CJ, Rose-John S, Lissilaa R, Ferlin W, Ernst M, Hertzog PJ, Mansell A, Jenkins BJ (2011) IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186:1199-1208.
- Grisanti LA, Woster AP, Dahlman J, Sauter ER, Combs CK, Porter JE (2011) alpha1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 338:648-657.
- Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* 13:85-94.
- Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ (2005) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 49:15-23.
- Guillemin R, Rosenberg B (1955) Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 57:599-607.
- Gupta R, Gupta K, Tripathi AK, Bhatia MS, Gupta LK (2016) Effect of Mirtazapine Treatment on Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tumor Necrosis Factor-alpha in Patients of Major Depressive Disorder with Severe Depression. *Pharmacology* 97:184-188.
- Guseva D, Wirth A, Ponimaskin E (2014) Cellular mechanisms of the 5-HT7 receptor-mediated signaling. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8:306.
- Gyoneva S, Traynelis SF (2013) Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry* 288:15291-15302.
- Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI (2002) Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature immunology* 3:354-359.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6:845-858.
- Haroon E, Raison CL, Miller AH (2012) Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37:137-162.
- Hart A, Kamm MA (2002) Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16:2017-2028.
- Haskew-Layton RE, Payappilly JB, Xu H, Bennett SA, Ratan RR (2013) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) protects neurons from oxidative death via an Nrf2 astrocyte-specific mechanism independent of PPARgamma. *J Neurochem* 124:536-547.

- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
- He X, Ma Q (2009) NRF2 cysteine residues are critical for oxidant/electrophile-sensing, Kelch-like ECH-associated protein-1-dependent ubiquitination-proteasomal degradation, and transcription activation. *Molecular pharmacology* 76:1265-1278.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, NY)* 303:1526-1529.
- Heisler JM, O'Connor JC (2015) Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent neurotoxic kynurenine metabolism mediates inflammation-induced deficit in recognition memory. *Brain, behavior, and immunity* 50:115-124.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
- Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF (1950) Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Archives of internal medicine (Chicago, Ill : 1908)* 85:545-666.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493:674-678.
- Hippocrates (siglo V a.C.) Aphorisms. Section 6.23.
- Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.
- Holzel L, Harter M, Reese C, Kriston L (2011) Risk factors for chronic depression--a systematic review. *Journal of affective disorders* 129:1-13.
- Howland RH (2011) A benefit-risk assessment of agomelatine in the treatment of major depression. *Drug safety* 34:709-731.
- Hroudova J, Fisar Z, Kitzlerova E, Zverova M, Raboch J (2013) Mitochondrial respiration in blood platelets of depressive patients. *Mitochondrion* 13:795-800.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12475-12480.
- Huang HW, Tang JL, Han XH, Peng YP, Qiu YH (2013) Lymphocyte-derived catecholamines induce a shift of Th1/Th2 balance toward Th2 polarization. *Neuroimmunomodulation* 20:1-8.
- Huang R, Wang K, Hu J (2016) Effect of Probiotics on Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* 8.
- Hubbs AF, Benkovic SA, Miller DB, O'Callaghan JP, Battelli L, Schwegler-Berry D, Ma Q (2007) Vacuolar leukoencephalopathy with widespread astrogliosis in mice lacking transcription factor Nrf2. *The American journal of pathology* 170:2068-2076.
- Hughes ZA, Starr KR, Scott CM, Newson MJ, Sharp T, Watson JM, Hagan JJ, Dawson LA (2007) Simultaneous blockade of 5-HT1A/B receptors and 5-HT transporters results in acute increases in extracellular 5-HT in both rats and guinea pigs: in vivo characterization of the novel 5-HT1A/B receptor antagonist/5-HT transport inhibitor SB-649915-B. *Psychopharmacology* 192:121-133.
- Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214.

- Husebye H, Halaas O, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger O, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal* 25:683-692.
- Hwang EK, Chung JM (2014) 5HT(1B) receptor-mediated pre-synaptic depression of excitatory inputs to the rat lateral habenula. *Neuropharmacology* 81:153-165.
- Igualdad MdSPSe (2013) Estrategia en Salud Mental del Sistema Nacional de Salud. p 98 Boletín Oficial del Estado.
- Innamorato NG, Rojo AI, Garcia-Yague AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado A (2008) The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181:680-689.
- Institute for Health Metrics and Evaluation I (2015) Global Burden of Disease. vol. 2017: University of Washington.
- Irwin W, Anderle MJ, Abercrombie HC, Schaefer SM, Kalin NH, Davidson RJ (2004) Amygdalar interhemispheric functional connectivity differs between the non-depressed and depressed human brain. *NeuroImage* 21:674-686.
- Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, Matsumoto K (2003) Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *The EMBO journal* 22:6277-6288.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236:313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13:76-86.
- Jackson SW (1986) Melancholia and depression: From hippocratic times to modern times. 439.
- Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Overvatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 285:22576-22591.
- Janssen HL, Brouwer JT, van der Mast RC, Schalm SW (1994) Suicide associated with alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Journal of hepatology* 21:241-243.
- Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M, Rommel C, Gerondakis SD, Mackay CR (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nature immunology* 7:274-283.
- Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR (2007) Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews Drug discovery* 6:391-403.
- Jeon SW, Kim YK (2016) Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World journal of psychiatry* 6:283-293.
- Jiang B, Wang F, Yang S, Fang P, Deng ZF, Xiao JL, Hu ZL, Chen JG (2015a) SKF83959 produces antidepressant effects in a chronic social defeat stress model of depression through BDNF-TrkB pathway. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 18.
- Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, Wang W, Tang W, Tan Z, Shi J, Li L, Ruan B (2015b) Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, behavior, and immunity* 48:186-194.
- Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 Suppl 1:4659-4665.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, NY)* 298:1911-1912.
- Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147:61-69.
- Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, Greenwood BN, Fleshner M (2005) Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* 135:1295-1307.
- Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Stark M, Watkins LR, Maier SF (2002) Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain, behavior, and immunity* 16:461-476.
- Jones RM, Wu H, Wentworth C, Luo L, Collier-Hyams L, Neish AS (2008) Salmonella AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell host & microbe* 3:233-244.
- Josefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A (1996) Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 88:140-146.
- Jou I, Lee JH, Park SY, Yoon HJ, Joe EH, Park EJ (2006) Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *The American journal of pathology* 168:1619-1630.
- Joyce PR, Hawes CR, Mulder RT, Sellman JD, Wilson DA, Boswell DR (1992) Elevated levels of acute phase plasma proteins in major depression. *Biol Psychiatry* 32:1035-1041.
- Joyce PR, Porter RJ, Mulder RT, Luty SE, McKenzie JM, Miller AL, Kennedy MA (2005) Reversed diurnal variation in depression: associations with a differential antidepressant response, tryptophan: large neutral amino acid ratio and serotonin transporter polymorphisms. *Psychological medicine* 35:511-517.
- Jun TY, Pae CU, Hoon H, Chae JH, Bahk WM, Kim KS, Serretti A (2003) Possible association between -G308A tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatric genetics* 13:179-181.
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology* 9:361-368.
- Kagaya A, Kugaya A, Takebayashi M, Fukue-Saeki M, Saeki T, Yamawaki S, Uchitomi Y (2001) Plasma concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor alpha of depressed patients in Japan. *Neuropsychobiology* 43:59-62.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *The Journal of biological chemistry* 273:23629-23632.
- Kang KW, Choi SH, Kim SG (2002) Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction. *Nitric oxide : biology and chemistry* 7:244-253.
- Kansanen E, Kivela AM, Levonen AL (2009) Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free radical biology & medicine* 47:1310-1317.
- Karabatsiakis A, Bock C, Salinas-Manrique J, Kolassa S, Calzia E, Dietrich DE, Kolassa IT (2014) Mitochondrial respiration in peripheral blood mononuclear cells correlates with depressive subsymptoms and severity of major depression. *4:e397*.
- Kaspar JW, Jaiswal AK (2010) An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *The Journal of biological chemistry* 285:21349-21358.

- Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Inubushi T (1992) Brain phosphorous metabolism in depressive disorders detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Journal of affective disorders* 26:223-230.
- Kellner CH, Knapp RG, Petrides G, Rummans TA, Husain MM, Rasmussen K, Mueller M, Bernstein HJ, O'Connor K, Smith G, Biggs M, Bailine SH, Malur C, Yim E, McClintock S, Sampson S, Fink M (2006) Continuation electroconvulsive therapy vs pharmacotherapy for relapse prevention in major depression: a multisite study from the Consortium for Research in Electroconvulsive Therapy (CORE). *Archives of general psychiatry* 63:1337-1344.
- Kelly JR, Borre Y, C OB, Patterson E, El Aidy S, Deane J, Kennedy PJ, Beers S, Scott K, Moloney G, Hoban AE, Scott L, Fitzgerald P, Ross P, Stanton C, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG (2016) Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of psychiatric research* 82:109-118.
- Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G, Hyland NP (2015) Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:392.
- Kemp AH, Quintana DS, Felmingham KL, Matthews S, Jelinek HF (2012) Depression, comorbid anxiety disorders, and heart rate variability in physically healthy, unmedicated patients: implications for cardiovascular risk. *PLoS one* 7:e30777.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American journal of psychiatry* 156:837-841.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome research* 12:996-1006.
- Kerr DS, Campbell LW, Thibault O, Landfield PW (1992) Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: relevance to brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:8527-8531.
- Keszthelyi D, Troost FJ, Jonkers DM, van Eijk HM, Lindsey PJ, Dekker J, Buurman WA, Masclee AA (2014) Serotonergic reinforcement of intestinal barrier function is impaired in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 40:392-402.
- Keum YS, Yu S, Chang PP, Yuan X, Kim JH, Xu C, Han J, Agarwal A, Kong AN (2006) Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer research* 66:8804-8813.
- Khandaker GM, Pearson RM, Zammit S, Lewis G, Jones PB (2014) Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study. *JAMA psychiatry* 71:1121-1128.
- Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation* 115:1627-1635.
- Kigerl KA, Lai W, Rivest S, Hart RP, Satoskar AR, Popovich PG (2007) Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem* 102:37-50.
- Kim HW, Rapoport SI, Rao JS (2011) Altered arachidonic acid cascade enzymes in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Molecular psychiatry* 16:419-428.
- Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, Lee JO (2005) Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *The Journal of biological chemistry* 280:11347-11351.
- Kim KH, An DR, Song J, Yoon JY, Kim HS, Yoon HJ, Im HN, Kim J, Kim DJ, Lee SJ, Kim KH, Lee HM, Kim HJ, Jo EK, Lee JY, Suh SW (2012) Mycobacterium tuberculosis Eis protein initiates

- suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:7729-7734.
- Kim KH, Lee MS (2015) FGF21 as a mediator of adaptive responses to stress and metabolic benefits of anti-diabetic drugs. *The Journal of endocrinology* 226:R1-16.
- Kim Y, Zhou P, Qian L, Chuang JZ, Lee J, Li C, Iadecola C, Nathan C, Ding A (2007a) MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival. *The Journal of experimental medicine* 204:2063-2074.
- Kim YK, Lee HP, Won SD, Park EY, Lee HY, Lee BH, Lee SW, Yoon D, Han C, Kim DJ, Choi SH (2007b) Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 31:78-85.
- Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G (2013) The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature communications* 4:1829.
- Klieber MA, Underhill C, Hammond GL, Muller YA (2007) Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *The Journal of biological chemistry* 282:29594-29603.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 24:7130-7139.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and cellular biology* 26:221-229.
- Kodama M, Russell DS, Duman RS (2005) Electroconvulsive seizures increase the expression of MAP kinase phosphatases in limbic regions of rat brain. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 30:360-371.
- Koenigs M, Grafman J (2009) The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behavioural brain research* 201:239-243.
- Kohler CA, Freitas TH, Maes M, de Andrade NQ, Liu CS, Fernandes BS, Stubbs B, Solmi M, Veronese N, Herrmann N, Raison CL, Miller BJ, Lanctot KL, Carvalho AF (2017) Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies.
- Kohler O, Benros ME, Nordentoft M, Farkouh ME, Iyengar RL, Mors O, Krogh J (2014) Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA psychiatry* 71:1381-1391.
- Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C (2015) Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology* 99:408-421.
- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology* 12:213-223.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131:1149-1163.
- Komossa K, Depping AM, Gaudchau A, Kissling W, Leucht S (2010) Second-generation antipsychotics for major depressive disorder and dysthymia. *The Cochrane database of systematic reviews* Cd008121.

- Korte SM, Prins J, Krajnc AM, Hendriksen H, Oosting RS, Westphal KG, Korte-Bouws GA, Olivier B (2015) The many different faces of major depression: it is time for personalized medicine. *European journal of pharmacology* 753:88-104.
- Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, Russell DS, D'Sa C (2008) Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:1545-1558.
- Kovarik P, Stoiber D, Eysers PA, Menghini R, Neiningner A, Gaestel M, Cohen P, Decker T (1999) Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13956-13961.
- Krueger C, Hawkins K, Wong S, Enns MW, Minuk G, Rempel JD (2011) Persistent pro-inflammatory cytokines following the initiation of pegylated IFN therapy in hepatitis C infection is associated with treatment-induced depression. *Journal of viral hepatitis* 18:e284-291.
- Kuhn R (1958) The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *The American journal of psychiatry* 115:459-464.
- Kucemider M, Solich J, Paach P, Dziedzicka-wasylewska M (2007) Effect of citalopram in the modified forced swim test in rats. *Pharmacological Reports* 59:785-788.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW (2003) Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 23:8786-8794.
- Lacroix S, Feinstein D, Rivest S (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 8:625-640.
- Lai CH (2013) Gray matter volume in major depressive disorder: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Psychiatry research* 211:37-46.
- Lam RW, Lonn SL, Despiegel N (2010) Escitalopram versus serotonin noradrenaline reuptake inhibitors as second step treatment for patients with major depressive disorder: a pooled analysis. *International clinical psychopharmacology* 25:199-203.
- Langley JN (1921) *The Autonomic Nervous System*. Cambridge: W. Heffer & Sons LTD.
- Lastres-Becker I, Ulusoy A, Innamorato NG, Sahin G, Rabano A, Kirik D, Cuadrado A (2012) alpha-Synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 21:3173-3192.
- Laughren TP, Gobburu J, Temple RJ, Unger EF, Bhattaram A, Dinh PV, Fossom L, Hung HM, Klimek V, Lee JE, Levin RL, Lindberg CY, Mathis M, Rosloff BN, Wang SJ, Wang Y, Yang P, Yu B, Zhang H, Zhang L, Zineh I (2011) Vilazodone: clinical basis for the US Food and Drug Administration's approval of a new antidepressant. *The Journal of clinical psychiatry* 72:1166-1173.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA (2003a) Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *The Journal of biological chemistry* 278:12029-12038.
- Lee JM, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 276:20011-20016.

- Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW (2003b) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nature medicine* 9:900-906.
- Lee SY, Kang JS, Song GY, Myung CS (2006) Stress induces the expression of heterotrimeric G protein beta subunits and the phosphorylation of PKB/Akt and ERK1/2 in rat brain. *Neuroscience research* 56:180-192.
- Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58:253-263.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8514-8519.
- Lenze EJ, Mulsant BH, Shear MK, Schulberg HC, Dew MA, Begley AE, Pollock BG, Reynolds CF, 3rd (2000) Comorbid anxiety disorders in depressed elderly patients. *The American journal of psychiatry* 157:722-728.
- Leonard B, Maes M (2012) Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36:764-785.
- Leonard BE, Song C (1996) Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54:299-303.
- Lesch KP, Waider J (2012) Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 76:175-191.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of experimental zoology* 116:321-361.
- Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *The Biochemical journal* 378:373-382.
- Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW (1998) The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286:1397-1403.
- Li CT, Chen MH, Juan CH, Huang HH, Chen LF, Hsieh JC, Tu PC, Bai YM, Tsai SJ, Lee YC, Su TP (2014a) Efficacy of prefrontal theta-burst stimulation in refractory depression: a randomized sham-controlled study. *Brain : a journal of neurology* 137:2088-2098.
- Li H, Gao Z, Zhang J, Ye X, Xu A, Ye J, Jia W (2012) Sodium butyrate stimulates expression of fibroblast growth factor 21 in liver by inhibition of histone deacetylase 3. *Diabetes* 61:797-806.
- Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, Juncker AS, Manichanh C, Chen B, Zhang W, Levenez F, Wang J, Xu X, Xiao L, Liang S, Zhang D, Zhang Z, Chen W, Zhao H, Al-Aama JY, Edris S, Yang H, Wang J, Hansen T, Nielsen HB, Brunak S, Kristiansen K, Guarner F, Pedersen O, Doré J, Ehrlich SD, Consortium M, Bork P, Wang J (2014b) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32:834-841.
- Li M, Liu J, Zhang C (2011a) Evolutionary history of the vertebrate mitogen activated protein kinases family. *PloS one* 6:e26999.
- Li M, Wang Y, Guo R, Bai Y, Yu Z (2007) Glucocorticoids impair microglia ability to induce T cell proliferation and Th1 polarization. *Immunology letters* 109:129-137.
- Li N, McLaren JE, Michael DR, Clement M, Fielding CA, Ramji DP (2010) ERK is integral to the IFN-gamma-mediated activation of STAT1, the expression of key genes implicated in

- atherosclerosis, and the uptake of modified lipoproteins by human macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 185:3041-3048.
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5567-5572.
- Li W, Katz BP, Spinola SM (2011b) Haemophilus ducreyi Lipooligosaccharides Induce Expression of the Immunosuppressive Enzyme Indoleamine 2, 3-Dioxygenase via Type I Interferons and Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Dendritic Cells □. 79:3338-3347.
- Li YC, Wang FM, Pan Y, Qiang LQ, Cheng G, Zhang WY, Kong LD (2009) Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33:435-449.
- Libermann TA, Baltimore D (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Molecular and cellular biology* 10:2327-2334.
- Linden W, Vodermaier A, Mackenzie R, Greig D (2012) Anxiety and depression after cancer diagnosis: prevalence rates by cancer type, gender, and age. *Journal of affective disorders* 141:343-351.
- Liu GH, Qu J, Shen X (2008) NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochimica et biophysica acta* 1783:713-727.
- Liu JT, Chen BY, Zhang JQ, Kuang F, Chen LW (2015a) Lead exposure induced microgliosis and astrogliosis in hippocampus of young mice potentially by triggering TLR4-MyD88-NFkappaB signaling cascades. *Toxicology letters* 239:97-107.
- Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, Jia Y (2015b) A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PloS one* 10:e0138904.
- Liu X, Dong Y, Li X, Ren Y, Li Y, Wang W, Wang L, Feng L (2010) Characterization of the anthranilate degradation pathway in *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Microbiology* (Reading, England) 156:589-595.
- Liu YN, Peng YL, Liu L, Wu TY, Zhang Y, Lian YJ, Yang YY, Kelley KW, Jiang CL, Wang YX (2015c) TNFalpha mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *European cytokine network* 26:15-25.
- Lo DC (1995) Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* 15:979-981.
- Lopresti AL, Maes M, Meddens MJ, Maker GL, Arnoldussen E, Drummond PD (2015) Curcumin and major depression: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial investigating the potential of peripheral biomarkers to predict treatment response and antidepressant mechanisms of change. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25:38-50.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220-230.
- Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B (2004) Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry* 55:789-796.
- Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER, Swaab DF (2001) Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *The American journal of pathology* 158:453-468.
- Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J (2009a) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry international* 54:358-362.
- Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Reus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J (2009b) Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the

- brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *Journal of psychiatric research* 43:864-869.
- MacDowell KS, Caso JR, Martin-Hernandez D, Madrigal JL, Leza JC, Garcia-Bueno B (2014) Paliperidone prevents brain toll-like receptor 4 pathway activation and neuroinflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 18.
- MacDowell KS, Caso JR, Martín-Hernández D, Moreno BM, Madrigal JL, Micó JA, Leza JC, García-Bueno B (2016) The Atypical Antipsychotic Paliperidone Regulates Endogenous Antioxidant/Anti-Inflammatory Pathways in Rat Models of Acute and Chronic Restraint Stress. *Neurotherapeutics*.
- MacQueen G, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, Young LT (2003) Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1387-1392.
- MacQueen G, Frodl T (2011a) The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Molecular psychiatry* Mar;16:252-264.
- MacQueen G, Frodl T (2011b) The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Molecular psychiatry* 16:252-264.
- Madrigal JL, Caso JR, de Cristobal J, Cardenas A, Leza JC, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA (2003) Effect of subacute and chronic immobilisation stress on the outcome of permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Brain research* 979:137-145.
- Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Hinojosa AE, Polak P, Feinstein DL, Leza JC (2010) Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs. *J Neurochem* 113:543-551.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC (2002) Stress-induced increase in extracellular sucrose space in rats is mediated by nitric oxide. *Brain research* 938:87-91.
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC (2001) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 24:420-429.
- Maes M, Bosmans E, De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E, Neels H (1997) Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 9:853-858.
- Maes M, Bosmans E, Suy E, Vandervorst C, De Jonckheere C, Raus J (1990) Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. *Neuropsychobiology* 24:115-120.
- Maes M, Fisar Z, Medina M, Scapagnini G, Nowak G, Berk M (2012a) New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology* 20:127-150.
- Maes M, Kubera M, Leunis JC (2008) The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro endocrinology letters* 29:117-124.
- Maes M, Kubera M, Leunis JC, Berk M (2012b) Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *Journal of affective disorders* 141:55-62.

- Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R (2011) The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35:702-721.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science (New York, NY)* 247:1446-1451.
- Malo MS, Alam SN, Mostafa G, Zeller SJ, Johnson PV, Mohammad N, Chen KT, Moss AK, Ramasamy S, Faruqui A, Hodin S, Malo PS, Ebrahimi F, Biswas B, Narisawa S, Millan JL, Warren HS, Kaplan JB, Kitts CL, Hohmann EL, Hodin RA (2010) Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut* 59:1476-1484.
- Malykhin NV, Carter R, Seres P, Coupland NJ (2010) Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: contributions of disease and treatment. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 35:337-343.
- Mamdani F, Rollins B, Morgan L, Myers RM, Barchas JD, Schatzberg AF, Watson SJ, Akil H, Potkin SG, Bunney WE, Vawter MP, Sequeira PA (2015) Variable telomere length across post-mortem human brain regions and specific reduction in the hippocampus of major depressive disorder. *Translational psychiatry* 5:e636.
- Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (1989) Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Molecular pharmacology* 36:106-112.
- Manicassamy S, Gupta S, Huang Z, Sun Z (2006) Protein kinase C-theta-mediated signals enhance CD4⁺ T cell survival by up-regulating Bcl-xL. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 176:6709-6716.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, NY)* 298:1912-1934.
- Marcus M, Yasamy MT, van Ommeren M, Chisholm D (2012) Depression, a global public health concern. In: WHO Department of Mental Health and Substance Abuse, pp 1-8.
- Marinoni I, Nonnis S, Monteferrante C, Heathcote P, Hartig E, Bottger LH, Trautwein AX, Negri A, Albertini AM, Tedeschi G (2008) Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *The FEBS journal* 275:5090-5107.
- Markham A, Cameron I, Franklin P, Spedding M (2004) BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *The European journal of neuroscience* 20:1189-1196.
- Martin-de-Saavedra MD, Budni J, Cunha MP, Gomez-Rangel V, Lorrio S, Del Barrio L, Lastres-Becker I, Parada E, Tordera RM, Rodrigues AL, Cuadrado A, Lopez MG (2013) Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. *Psychoneuroendocrinology* 38:2010-2022.
- Martin JL, Martin-Sanchez E (2012) Systematic review and meta-analysis of vagus nerve stimulation in the treatment of depression: variable results based on study designs. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 27:147-155.
- Martin SA, Dantzer R, Kelley KW, Woods JA (2014) Voluntary wheel running does not affect lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in young adult and aged mice. *Neuroimmunomodulation* 21:52-63.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
- Marwick KF, Kaaya SF (2010) Prevalence of depression and anxiety disorders in HIV-positive outpatients in rural Tanzania. *AIDS care* 22:415-419.
- Masson GS, Nair AR, Dange RB, Silva-Soares PP, Michelini LC, Francis J (2015) Toll-like receptor 4 promotes autonomic dysfunction, inflammation and microglia activation in the

- hypothalamic paraventricular nucleus: role of endoplasmic reticulum stress. *PLoS one* 10:e0122850.
- Matcham F, Rayner L, Steer S, Hotopf M (2013) The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford, England)* 52:2136-2148.
- Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine* 3:2011-2030.
- Mathews DC, Henter ID, Zarate CA (2012) Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs* 72:1313-1333.
- Matrisciano F, Bonaccorso S, Ricciardi A, Scaccianoce S, Panaccione I, Wang L, Ruberto A, Tatarelli R, Nicoletti F, Girardi P, Shelton RC (2009) Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. *Journal of psychiatric research* 43:247-254.
- Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y (2007) Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC genomics* 8:124.
- McAllister MS, Krizanac-Bengez L, Macchia F, Naftalin RJ, Pedley KC, Mayberg MR, Marroni M, Leaman S, Stanness KA, Janigro D (2001) Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain research* 904:20-30.
- McEwen BS (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *The New England journal of medicine* 338:171-179.
- McEwen BS, Morrison JH (2013) The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79:16-29.
- McFarquhar M, Elliott R, McKie S, Thomas E, Downey D, Mekli K, Toth ZG, Anderson IM, Deakin JF, Juhasz G (2014) TOMM40 rs2075650 may represent a new candidate gene for vulnerability to major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39:1743-1753.
- McKean J, Naug H, Nikbakht E, Amiet B, Colson N (2016) Probiotics and Subclinical Psychological Symptoms in Healthy Participants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, NY)*.
- Meddings JB, Swain MG (2000) Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119:1019-1028.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Mendez-David I, Tritschler L, Ali ZE, Damiens MH, Pallardy M, David DJ, Kerdine-Romer S, Gardier AM (2015) Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroscience letters* 597:121-126.
- Mikova O, Yakimova R, Bosmans E, Kenis G, Maes M (2001) Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 11:203-208.
- Miller AH, Raison CL (2016) The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature reviews Immunology* 16:22-34.
- Miller CL, Llenos IC, Dulay JR, Barillo MM, Yolken RH, Weis S (2004) Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiology of disease* 15:618-629.
- Mitchell S, Vargas J (2016) Signaling via the NFkappaB system. *8:227-241*.
- Moghaddam B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650-1657.

- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:9926-9930.
- Moisan MP, Minni AM, Dominguez G, Helbling JC, Foury A, Henkous N, Dorey R, Beracochea D (2014) Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. *Steroids* 81:109-115.
- Moreira FP, Cardoso Tde A, Mondin TC, Souza LD, Silva R, Jansen K, Osés JP, Wiener CD (2015) The effect of proinflammatory cytokines in Cognitive Behavioral Therapy. *Journal of neuroimmunology* 285:143-146.
- Morente V, Perez-Sen R, Ortega F, Huerta-Cepas J, Delicado EG, Miras-Portugal MT (2014) Neuroprotection elicited by P2Y₁₃ receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery. *Biochimica et biophysica acta* 1843:1886-1898.
- Moretti A, Gorini A, Villa RF (2003) Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism. *Molecular psychiatry* 8:773-785.
- Morgan CJ, Curran HV (2012) Ketamine use: a review. *Addiction (Abingdon, England)* 107:27-38.
- Mork A, Pehrson A, Brennum LT, Nielsen SM, Zhong H, Lassen AB, Miller S, Westrich L, Boyle NJ, Sanchez C, Fischer CW, Liebenberg N, Wegener G, Bundgaard C, Hogg S, Bang-Andersen B, Stensbol TB (2012) Pharmacological effects of Lu AA21004: a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 340:666-675.
- Moron JA, Zakharova I, Ferrer JV, Merrill GA, Hope B, Lafer EM, Lin ZC, Wang JB, Javitch JA, Galli A, Shippenberg TS (2003) Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:8480-8488.
- Mouri T, Itoi K, Takahashi K, Suda T, Murakami O, Yoshinaga K, Andoh N, Ohtani H, Masuda T, Sasano N (1993) Colocalization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *Neuroendocrinology* 57:34-39.
- Moyano-Porcile V, Olavarria-Ramirez L, Gonzalez-Arancibia C, Bravo JA, Julio-Pieper M (2015) Short-term effects of Poly(I:C) on gut permeability. *Pharmacological research* 101:130-136.
- Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O'Neil A, Hayley AC, Pasco JA, Anderson G, Jacka FN, Maes M (2014) Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? *Neuroscience and biobehavioral reviews* 45:46-62.
- Mrazek Da, Hornberger JC, Altar CA, Degtjar I (2014) A review of the clinical, economic, and societal burden of treatment-resistant depression: 1996-2013. *Psychiatric services (Washington, DC)* 65:977-987.
- Muller MB, Lucassen PJ, Yassouridis A, Hoogendijk WJ, Holsboer F, Swaab DF (2001) Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *The European journal of neuroscience* 14:1603-1612.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C (2006) Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:3813-3820.
- Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E (2005) Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neuroscience research* 53:129-139.
- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, Bonifacino T, Mallei A, Baldelli P, Racagni G, Raiteri M, Benfenati F, Bonanno G, Popoli M (2010) Acute stress

- increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS one* 5:e8566.
- Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, Greiner K, Nemeroff CB, Miller AH (2001) Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *The New England journal of medicine* 344:961-966.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature immunology* 3:667-672.
- Nagy N, Goldstein AM (2017) Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in cell & developmental biology*.
- Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, Hasko J, Krizbai IA (2010) Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochemistry international* 57:556-564.
- Nair S, Doh ST, Chan JY, Kong AN, Cai L (2008) Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. *British journal of cancer* 99:2070-2082.
- Nautiyal KM, Tritschler L, Ahmari SE, David DJ, Gardier AM, Hen R (2016) A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*.
- Neff CD, Abkevich V, Packer JC, Chen Y, Potter J, Riley R, Davenport C, DeGrado Warren J, Jammulapati S, Bhatena A, Choi WS, Kroeger PE, Metzger RE, Gutin A, Skolnick MH, Shattuck D, Katz DA (2009) Evidence for HTR1A and LHPP as interacting genetic risk factors in major depression. *Molecular psychiatry* 14:621-630.
- Nichols NR, Osterburg HH, Masters JN, Millar SL, Finch CE (1990) Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment. *Brain research Molecular brain research* 7:1-7.
- Nikiforuk A (2015) Targeting the Serotonin 5-HT 7 Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders : Rationale and Progress to Date. *CNS drugs* 265-275.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, NY)* 308:1314-1318.
- Nishimura M, Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28:886-892.
- Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et biophysica acta* 1492:203-206.
- Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK (2009) Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *Journal of cell science* 122:4452-4464.
- Niture SK, Jain AK, Shelton PM, Jaiswal AK (2011) Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *The Journal of biological chemistry* 286:28821-28832.
- Novak CM, Burghardt PR, Levine JA (2012) The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36:1001-1014.
- Novak U, Cocks BG, Hamilton JA (1991) A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic acids research* 19:3389-3393.
- O' Connor J, Andre C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R (2009) Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Mediate the Upregulation

- of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and the Induction of Depressive-Like Behavior in Mice in Response to *Bacillus Calmette-Guérin*. *The Journal of Neuroscience* 29:4200-4209.
- O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Herkenham M, Dantzer R, Kelley KW (2009) Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 182:3202-3212.
- O'Neill LA, Dinarello CA (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology today* 21:206-209.
- O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews Immunology* 13:453-460.
- OECD (2015) Health at a Glance 2015: OECD indicators.
- Ogawa H, Limura M, Eckmann L, Kagnoff MF (2004) Regulated production of the chemokine CCL28 in human colon epithelium. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 287:G1062-1069.
- Oglodek EA, Just MJ, Szromek AR, Araszkiwicz A (2016) Melatonin and neurotrophins NT-3, BDNF, NGF in patients with varying levels of depression severity. *Pharmacological reports : PR* 68:945-951.
- Ohtani H, Mouri T, Sasaki A, Sasano N (1987) Immunoelectron microscopic study of corticotropin-releasing factor in the human hypothalamus and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 45:104-108.
- Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y (2007) Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVA. *Science (New York, NY)* 316:1632-1634.
- Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T (2012) Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *The Journal of biological chemistry* 287:40611-40617.
- Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, Liljeroos M, Vuori K, Hallman M (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *European journal of immunology* 33:597-605.
- Oladeji BD, Gureje O (2013) The comorbidity between depression and diabetes. *Current psychiatry reports* 15:390.
- Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, Bathke B, Lauterbach H, Suter M, Dreher S, Koedel U, Akira S, Kawai T, Buer J, Wagner H, Bauer S, Hochrein H, Kirschning CJ (2012) TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science (New York, NY)* 337:1111-1115.
- Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jönsson B (2012) The economic cost of brain disorders in Europe. *European Journal of Neurology* 19:155-162.
- Olivier B (2015) Serotonin: A never-ending story. *European journal of pharmacology* 753:2-18.
- Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF (2016) Major depressive disorder. *Nature reviews Disease primers* 2:16065.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O (2004) Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *International clinical psychopharmacology* 19:89-95.
- Padro CJ, Sanders VM (2014) Neuroendocrine regulation of inflammation. *Seminars in immunology* 26:357-368.
- Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD (2014) Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1beta-related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain, behavior, and immunity* 41:90-100.
- Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA (2001) P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:7135-7142.

- Pantouris G, Serys M, Yuasa HJ, Ball HJ, Mowat CG (2014) Human indoleamine 2,3-dioxygenase-2 has substrate specificity and inhibition characteristics distinct from those of indoleamine 2,3-dioxygenase-1. *Amino acids* 46:2155-2163.
- Papakostas GI, Nelson JC, Kasper S, Moller HJ (2008) A meta-analysis of clinical trials comparing reboxetine, a norepinephrine reuptake inhibitor, with selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of major depressive disorder. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 18:122-127.
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195.
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E (2006) High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American journal of physiology Cell physiology* 290:C917-924.
- Parrott JM, Redus L, Santana-Coelho D, Morales J, Gao X, O'Connor JC (2016) Neurotoxic kynurenine metabolism is increased in the dorsal hippocampus and drives distinct depressive behaviors during inflammation. *Translational psychiatry* 6:e918.
- Parsey RV, Olvet DM, Oquendo MA, Huang YY, Ogden RT, Mann JJ (2006) Higher 5-HT1A receptor binding potential during a major depressive episode predicts poor treatment response: preliminary data from a naturalistic study. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:1745-1749.
- Patil H, Lavie CJ, O'Keefe JH (2011) Cuppa joe: friend or foe? Effects of chronic coffee consumption on cardiovascular and brain health. *Missouri medicine* 108:431-438.
- Patricio P, Mateus-Pinheiro A, Irmiler M, Alves ND, Machado-Santos AR, Morais M, Correia JS, Korostynski M, Piechota M, Stoffel R, Beckers J, Bessa JM, Almeida OF, Sousa N, Pinto L (2015) Differential and converging molecular mechanisms of antidepressants' action in the hippocampal dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 40:338-349.
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical journal* 418:475-489.
- Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D (1998) Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* 43:315-319.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002) Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology* 14:123-128.
- Pérez-Burgos A, Wang B, Mao YK, Mistry B, McVey Neufeld KA, Bienenstock J, Kunze W (2013) Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 304:G211-220.
- Pérez-Nievas BG, Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Zoppi S, Leza JC (2010) Corticosterone basal levels and vulnerability to LPS-induced neuroinflammation in the rat brain. *Brain research* 1315:159-168.
- Pérez V, Soler J, Puigdemont D, Alvarez E, Artigas F (1999) A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of pindolol augmentation in depressive patients resistant to serotonin reuptake inhibitors. *Grup de Recerca en Trastorns Afectius. Archives of general psychiatry* 56:375-379.
- Pirbaglou M, Katz J, de Souza RJ, Stearns JC, Motamed M, Ritvo P (2016) Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition research (New York, NY)* 36:889-898.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling

- in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, NY)* 282:2085-2088.
- Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, Lizasoain I, Menchen P, Gomez-Lus ML, Lorenzo P, Cos E, Leza JC, Menchen L (2007) The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology* 132:1791-1803.
- Popa C, Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Takahashi N, Sprong T, Matera G, Liberto MC, Foca A, van Deuren M, Kullberg BJ, van den Berg WB, van der Meer JW, Netea MG (2007) *Bartonella quintana* lipopolysaccharide is a natural antagonist of Toll-like receptor 4. *Infection and immunity* 75:4831-4837.
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature reviews Neuroscience* 13:22-37.
- Porsolt R, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* Apr 21,266:730-732.
- Pozuelo M, Panda S, Santiago A, Mendez S, Accarino A, Santos J, Guarner F, Azpiroz F, Manichanh C (2015) Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Scientific reports* 5:12693.
- Qin H, Niyongere SA, Lee SJ, Baker BJ, Benveniste EN (2008) Expression and functional significance of SOCS-1 and SOCS-3 in astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181:3167-3176.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65.
- Qiu YH, Peng YP, Jiang JM, Wang JJ (2004) Expression of tyrosine hydroxylase in lymphocytes and effect of endogenous catecholamines on lymphocyte function. *Neuroimmunomodulation* 11:75-83.
- Rada P, Rojo AI, Evrard-Todeschi N, Innamorato NG, Cotte A, Jaworski T, Tobon-Velasco JC, Devijver H, Garcia-Mayoral MF, Van Leuven F, Hayes JD, Bertho G, Cuadrado A (2012) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP axis. *Molecular and cellular biology* 32:3486-3499.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in immunology* 27:24-31.
- Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, Vogt G, Spivey JR, Saito K (2009) CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN- α : relationship to CNS immune responses and depression. *Molecular psychiatry* 15:393-403.
- Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, Vogt G, Spivey JR, Saito K, Miller AH (2010) CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN- α : relationship to CNS immune responses and depression. *Molecular psychiatry* 15:393-403.
- Rajagopalan S, Brook R, Rubenfire M, Pitt E, Young E, Pitt B (2001) Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression. *The American journal of cardiology* 88:196-198, a197.
- Rajkowska G (2000) Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* 48:766-777.

- Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1995) Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: I. Remapping of areas 9 and 46 using quantitative criteria. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 5:307-322.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3410-3415.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *The Journal of biological chemistry* 176:1243-1251.
- Reichmann D, Coute Y, Ollagnier de Choudens S (2015) Dual activity of quinolinate synthase: triose phosphate isomerase and dehydration activities play together to form quinolinate. *Biochemistry* 54:6443-6446.
- Renault PF, Hoofnagle JH, Park Y, Mullen KD, Peters M, Jones DB, Rustgi V, Jones EA (1987) Psychiatric complications of long-term interferon alfa therapy. *Archives of internal medicine* 147:1577-1580.
- Rénéric J, Lucki I (1998) Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology* 136:190-197.
- Rezin GT, Cardoso MR, Goncalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, Comim CM, Quevedo J, Streck EL (2008) Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochemistry international* 53:395-400.
- Rhee SH, Jones BW, Toshchakov V, Vogel SN, Fenton MJ (2003) Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 278:22506-22512.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82.
- Rios P, Nunes-Xavier CE, Tabernero L, Kohn M, Pulido R (2014) Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxidants & redox signaling* 20:2251-2273.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:588-593.
- Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U, Kelly K (1993) PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science (New York, NY)* 259:1763-1766.
- Rojo AI, Rada P, Egea J, Rosa AO, Lopez MG, Cuadrado A (2008a) Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Molecular and cellular neurosciences* 39:125-132.
- Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A (2008b) GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* 105:192-202.
- Ronkina N, Kotlyarov A, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Hitti E, Milarski K, Askew R, Marusic S, Lin LL, Gaestel M, Telliez JB (2007) The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Molecular and cellular biology* 27:170-181.
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA (2006) Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert reviews in molecular medicine* 8:1-27.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M (2006a) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring

- one or several treatment steps: A STAR*D report. *American Journal of Psychiatry* 163:1905-1917.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Stewart JW, Nierenberg AA, Thase ME, Ritz L, Biggs MM, Warden D, Luther JF, Shores-Wilson K, Niederehe G, Fava M (2006b) Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. *The New England journal of medicine* 354:1231-1242.
- Russo SJ, Nestler EJ (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews Neuroscience* 14:609-625.
- Sakuraba H, Tsuge H, Yoneda K, Katunuma N, Ohshima T (2005) Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase. *The Journal of biological chemistry* 280:26645-26648.
- Samak G, Suzuki T, Bhargava A, Rao RK (2010) c-Jun NH2-terminal kinase-2 mediates osmotic stress-induced tight junction disruption in the intestinal epithelium. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 299:G572-584.
- Sandi C, Bisaz R (2007) A model for the involvement of neural cell adhesion molecules in stress-related mood disorders. *Neuroendocrinology* 85:158-176.
- Sapolsky RM (1996) Why stress is bad for your brain. *Science (New York, NY)* 273:749-750.
- Sapolsky RM (1998) *Why Zebras Don't Get Ulcers: An Updated Guide To Stress, Stress Related Diseases, and Coping*: W. H. Freeman.
- Sapolsky RM (2004) Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biol Psychiatry* 56:137-139.
- Sapolsky RM (2015) Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nature neuroscience* 18:1344-1346.
- Sari Y (2004) Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:565-582.
- Sato H, Skelin I, Diksic M (2010a) Chronic buspirone treatment decreases 5-HT1B receptor densities and the serotonin transporter but increases the density of 5-HT2A receptors in the bulbectomized rat model of depression: An autoradiographic study. *Brain research* 1345:28-44.
- Sato H, Skelin I, Diksic M (2010b) Chronic buspirone treatment decreases 5-HT1B receptor densities and the serotonin transporter but increases the density of 5-HT2A receptors in the bulbectomized rat model of depression: an autoradiographic study. *Brain research* 1345:28-44.
- Sayd A, Anton M, Alen F, Caso JR, Pavon J, Leza JC, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Bueno B, Orio L (2014) Systemic administration of oleylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 18.
- Sayuk GS, Gott BM, Nix BD, Lustman PJ (2011) Improvement in sexual functioning in patients with type 2 diabetes and depression treated with bupropion. *Diabetes care* 34:332-334.
- Scaini G, Maggi DD, De-Nes BT, Goncalves CL, Ferreira GK, Teodorak BP, Bez GD, Ferreira GC, Schuck PF, Quevedo J, Streck EL (2011) Activity of mitochondrial respiratory chain is increased by chronic administration of antidepressants. *Acta neuropsychiatrica* 23:112-118.
- Schele E, Grahnmö L, Anestén F, Hallén A, Backhed F, Jansson JO (2013) The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. *Endocrinology* 154:3643-3651.
- Schlaepfer TE, Bewernick BH, Kayser S, Madler B, Coenen VA (2013) Rapid effects of deep brain stimulation for treatment-resistant major depression. *Biol Psychiatry* 73:1204-1212.

- Schmidt AJ, Heiser P, Hemmeter UM, Krieg JC, Vedder H (2008) Effects of antidepressants on mRNA levels of antioxidant enzymes in human monocytic U-937 cells. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 32:1567-1573.
- Schmidt C (2015) Mental health: thinking from the gut. *Nature* 518:S12-15.
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M (2001) I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends in biochemical sciences* 26:186-190.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic acids research* 17:6419.
- Schumacher J, Jamra RA, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB, Schulze TG, Deschner M, Schmal C, Hofels S, Zobel A, Illig T, Propping P, Holsboer F, Rietschel M, Nothen MM, Cichon S (2005) Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry* 58:307-314.
- Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB, Weber JR (1998) Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes. *Glia* 22:295-305.
- Schwaber JS, Kapp BS, Higgins GA, Rapp PR (1982) Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2:1424-1438.
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ (2012) Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nature reviews Neuroscience* 13:465-477.
- Sekine A, Kuroki Y, Urata T, Mori N, Fukuwatari T (2016) Inhibition of Large Neutral Amino Acid Transporters Suppresses Kynurenic Acid Production Via Inhibition of Kynurenine Uptake in Rodent Brain. *Neurochemical research* 41:2256-2266.
- Selye H (1936) A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138:32.
- Selye H (1975) Confusion and controversy in the stress field. *Journal of human stress* 1:37-44.
- Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164:337-340.
- Sepanjnia K, Modabbernia A, Ashrafi M, Modabbernia MJ, Akhondzadeh S (2012) Pioglitazone adjunctive therapy for moderate-to-severe major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37:2093-2100.
- Shastri A, Bonifati DM, Kishore U (2013) Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators of inflammation* 2013:342931.
- Shelton RC, Claiborne J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Reddy R, Aschner M, Lewis DA, Mirnics K (2011) Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Molecular psychiatry* 16:751-762.
- Shi Z, Ren H, Huang Z, Peng Y, He B, Yao X, Yuan TF, Su H (2016) Fish Oil Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior by Inhibiting Neuroinflammation. *Molecular neurobiology*.
- Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science (New York, NY)* 272:1179-1182.
- Shiflett MW, Balleine BW (2011) Contributions of ERK signaling in the striatum to instrumental learning and performance. *Behavioural brain research* 218:240-247.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently

- protects neurons from oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:3394-3406.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 189:1777-1782.
- Shirey KA, Lai W, Scott AJ, Lipsky M, Mistry P, Pletneva LM, Karp CL, McAlees J, Gioannini TL, Weiss J, Chen WH, Ernst RK, Rossignol DP, Gusovsky F, Blanco JC, Vogel SN (2013) The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature* 497:498-502.
- Shishkina GT, Kalinina TS, Berezova IV, Dygalo NN (2012) Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior. *Neuropharmacology* 62:177-183.
- Shore PA, Brodie BB (1958) Effect of iproniazid on brain levels of norepinephrine and serotonin. *Science (New York, NY)* 127:704.
- Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE, Jr. (1992) Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science (New York, NY)* 258:1808-1812.
- Shulman KI, Herrmann N, Walker SE (2013) Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression. *CNS drugs* 27:789-797.
- Siednienko J, Gajanayake T, Fitzgerald KA, Moynagh P, Miggin SM (2011) Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN-beta and RANTES production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186:2514-2522.
- Signorovitch J, Ramakrishnan K, Ben-Hamadi R, Yu AP, Wu EQ, Dworak H, Erder MH (2011) Remission of major depressive disorder without adverse events: a comparison of escitalopram versus serotonin norepinephrine reuptake inhibitors. *Current medical research and opinion* 27:1089-1096.
- Sleator RD (2010) The human superorganism - of microbes and men. *Medical hypotheses* 74:214-215.
- Smiley ST, King JA, Hancock WW (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 167:2887-2894.
- Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 278:32552-32560.
- Smith SM, Vale WW (2006) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience* 8:383-395.
- Sobanski JA, Klasa K, Mielimaka M, Rutkowski K, Dembinska E, Muldner-Nieckowski L, Cyranka K, Smiatek-Mazgaj B, Popiolek L (2015) The crossroads of gastroenterology and psychiatry - what benefits can psychiatry provide for the treatment of patients suffering from gastrointestinal symptoms. *Przegląd gastroenterologiczny* 10:222-228.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32:638-647.
- Song C, Horrobin DF, Leonard BE (2006) The comparison of changes in behavior, neurochemistry, endocrine, and immune functions after different routes, doses and durations of administrations of IL-1beta in rats. *Pharmacopsychiatry* 39:88-99.
- Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64:33-39.
- Spencer RL, Miller AH, Stein M, McEwen BS (1991) Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain research* 549:236-246.

- Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL (1994) Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor- α production from macrophages in vitro. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 152:3024-3031.
- Spitzer R, Endicott J, Robins E (1975) Research diagnostic criteria. *Psychopharmacol Bull Jul*;11:22-25.
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* (New York, NY) 1:3-9.
- Stanojevic S, Dimitrijevic M, Kustrimovic N, Mitic K, Vujic V, Leposavic G (2013) Adrenal hormone deprivation affects macrophage catecholamine metabolism and beta₂-adrenoceptor density, but not propranolol stimulation of tumour necrosis factor- α production. *Experimental physiology* 98:665-678.
- Steele RD (1986) Blood-brain barrier transport of the alpha-keto acid analogs of amino acids. *Federation proceedings* 45:2060-2064.
- Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health* 629-649.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of cell biology* 103:755-766.
- Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56:640-650.
- Stork C, Renshaw PF (2005) Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Molecular psychiatry* 10:900-919.
- Stork O, Welzl H, Wotjak CT, Hoyer D, Dellling M, Cremer H, Schachner M (1999) Anxiety and increased 5-HT_{1A} receptor response in NCAM null mutant mice. *Journal of neurobiology* 40:343-355.
- Strakowski SM, DelBello MP, Adler C, Cecil DM, Sax KW (2000) Neuroimaging in bipolar disorder. *Bipolar disorders* 2:148-164.
- Strekalova T, Evans M, Costa-Nunes J, Bachurin S, Yeritsyan N, Couch Y, Steinbusch HM, Eleonore Kohler S, Lesch KP, Anthony DC (2015) Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain, behavior, and immunity* 48:42-47.
- Stroth N, Svenningsson P (2015a) S100B interacts with the serotonin 5-HT₇ receptor to regulate a depressive-like behavior. *European Neuropsychopharmacology* 25:2372-2380.
- Stroth N, Svenningsson P (2015b) S100B interacts with the serotonin 5-HT₇ receptor to regulate a depressive-like behavior. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25:2372-2380.
- Su ZY, Khor TO, Shu L, Lee JH, Saw CL, Wu TY, Huang Y, Suh N, Yang CS, Conney AH, Wu Q, Kong AN (2013) Epigenetic reactivation of Nrf2 in murine prostate cancer TRAMP C1 cells by natural phytochemicals Z-ligustilide and *Radix angelica sinensis* via promoter CpG demethylation. *Chemical research in toxicology* 26:477-485.
- Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75:487-493.
- Sun SC, Ganchi PA, Beraud C, Ballard DW, Greene WC (1994) Autoregulation of the NF- κ B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:1346-1350.
- Sun Z, Chin YE, Zhang DD (2009a) Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Molecular and cellular biology* 29:2658-2672.

- Sun Z, Huang Z, Zhang DD (2009b) Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS one* 4:e6588.
- Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD (2007) Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 27:6334-6349.
- Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, Yoon IS, Kim DD (2011) 15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2), an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical pharmacology* 82:1335-1351.
- Sutçigil L, Oktenli C, Musabak U, Bozkurt A, Cansever A, Uzun O, Sanisoglu SY, Yesilova Z, Ozmenler N, Ozsahin A, Sengul A (2007) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clinical & developmental immunology* 2007:76396.
- Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416:750-756.
- Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P (2006) Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science (New York, NY)* 311:77-80.
- Svenningsson P, Kim Y, Warner-Schmidt J, Oh YS, Greengard P (2013) p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants. *Nature reviews Neuroscience* 14:673-680.
- Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, da Cunha AA, Dalmaz C, Wyse AT (2011) Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochemical research* 36:487-493.
- Takada E, Okahira S, Sasai M, Funami K, Seya T, Matsumoto M (2007) C-terminal LRRs of human Toll-like receptor 3 control receptor dimerization and signal transmission. *Molecular immunology* 44:3633-3640.
- Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Molecular cell* 5:649-658.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* 13:933-940.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 169:10-14.
- Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Experimental neurology* 213:114-121.
- Taniuchi H, Hayaishi O (1963) Studies on the metabolism of kynurenic acid. III. Enzymatic formation of 7,8-dihydroxykynurenic acid from kynurenic acid. *The Journal of biological chemistry* 238:283-293.
- Tasker JG, Herman JP (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 14:398-406.
- 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. *Physiology & behavior* 99:186-193.

- Tataczynska E, Antkiewicz-Michaluk L, Klodzinska A, Stachowicz K, Chojnacka-Wojcik E (2005) Antidepressant-like effect of the selective 5-HT_{1B} receptor agonist CP 94253: a possible mechanism of action. *European journal of pharmacology* 516:46-50.
- Tataczynska E, Klodzinska A, Stachowicz K, Chojnacka-Wojcik E (2004) Effect of combined administration of 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B/1D} receptor antagonists and antidepressants in the forced swimming test. *European journal of pharmacology* 487:133-142.
- Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *European journal of pharmacology* 340:249-258.
- Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RA, Updegraff JA (2000) Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychological review* 107:411-429.
- Thomas AJ, Davis S, Morris C, Jackson E, Harrison R, O'Brien JT (2005) Increase in interleukin-1 β in late-life depression. *The American journal of psychiatry* 162:175-177.
- Thomsen KR (2015) Measuring anhedonia: impaired ability to pursue, experience, and learn about reward. *Frontiers in psychology* 6:1409.
- Thundiyil J, Lim KL (2015) DAMPs and neurodegeneration. *Ageing research reviews* 24:17-28.
- TMS Neuro Solutions (2016) Major Depression is a Brain Disease - PET Scan.
- Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ (1995) Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *The Journal of biological chemistry* 270:10482-10488.
- Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M (2000) NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404:778-782.
- Tolosa L, Caraballo-Miralles V, Olmos G, Llado J (2011) TNF-alpha potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF-kappaB. *Molecular and cellular neurosciences* 46:176-186.
- Too LK, Li KM, Suarna C, Maghzal GJ, Stocker R, McGregor IS, Hunt NH (2016) Deletion of TDO2, IDO-1 and IDO-2 differentially affects mouse behavior and cognitive function. *Behavioural brain research* 312:102-117.
- Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G (2012) The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends in cell biology* 22:557-566.
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature reviews Neuroscience* 4:13-25.
- Treadway MT, Zald DH (2011) Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:537-555.
- Triantafilou M, Brandenburg K, Kusumoto S, Fukase K, Mackie A, Seydel U, Triantafilou K (2004) Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *The Biochemical journal* 381:527-536.
- Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science* 115:2603-2611.
- Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA (2014) Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *Journal of neuroimmunology* 268:1-12.
- Tse KH, Chow KB, Leung WK, Wong YH, Wise H (2014) Primary sensory neurons regulate Toll-like receptor-4-dependent activity of glial cells in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 279:10-22.
- Tsikis D, Gutzki FM, Rossa S, Bauer H, Neumann C, Dockendorff K, Sandmann J, Frolich JC (1997) Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass

- spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay--solutions by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 244:208-220.
- Turner CA, Eren-Kocak E, Inui EG, Watson SJ, Akil H (2016) Dysregulated fibroblast growth factor (FGF) signaling in neurological and psychiatric disorders. *Seminars in cell & developmental biology* 53:136-143.
- Tyring S, Gottlieb A, Papp K, Gordon K, Leonardi C, Wang A, Lalla D, Woolley M, Jahreis A, Zitnik R, Cella D, Krishnan R (2006) Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet (London, England)* 367:29-35.
- Uchida K (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research* 42:318-343.
- Uddin S, Sassano A, Deb DK, Verma A, Majchrzak B, Rahman A, Malik AB, Fish EN, Platanius LC (2002) Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *The Journal of biological chemistry* 277:14408-14416.
- Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T (1994) NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 153:2052-2063.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40:e115.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of biological chemistry* 276:31332-31339.
- Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of neurology* 57:67-81.
- Varnas K, Thomas DR, Tupala E, Tiihonen J, Hall H (2004) Distribution of 5-HT7 receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [3H]SB-269970. *Neuroscience letters* 367:313-316.
- Venugopal R, Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14960-14965.
- Venugopal R, Jaiswal AK (1998) Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17:3145-3156.
- Vichaya EG, Hunt SC, Dantzer R (2014) Lipopolysaccharide reduces incentive motivation while boosting preference for high reward in mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39:2884-2890.
- Vivarelli MS, McDonald D, Miller M, Cusson N, Kelliher M, Geha RS (2004) RIP links TLR4 to Akt and is essential for cell survival in response to LPS stimulation. *The Journal of experimental medicine* 200:399-404.
- Vogel DY, Kooij G, Heijnen PD, Breur M, Peferoen LA, van der Valk P, de Vries HE, Amor S, Dijkstra CD (2015) GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. *European journal of immunology* 45:1808-1819.
- Volz HP, Rzanny R, Riehemann S, May S, Hegewald H, Preussler B, Hubner G, Kaiser WA, Sauer H (1998) 31P magnetic resonance spectroscopy in the frontal lobe of major depressed patients. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 248:289-295.

- von Holstein-Rathlou S, BonDurant LD, Peltekian L, Naber MC, Yin TC, Claflin KE, Urizar AI, Madsen AN, Ratner C, Holst B, Karstoft K, Vandenbeuch A, Anderson CB, Cassell MD, Thompson AP, Solomon TP, Rahmouni K, Kinnamon SC, Pieper AA, Gillum MP, Potthoff MJ (2016) FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell metabolism* 23:335-343.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
- Wang C, Wu HM, Jing XR, Meng Q, Liu B, Zhang H, Gao GD (2012) Oxidative parameters in the rat brain of chronic mild stress model for depression: relation to anhedonia-like responses. *The Journal of membrane biology* 245:675-681.
- Wang W, Lu Y, Xue Z, Li C, Wang C, Zhao X, Zhang J, Wei X, Chen X, Cui W, Wang Q, Zhou W (2015) Rapid-acting antidepressant-like effects of acetyl-L-carnitine mediated by PI3K/AKT/BDNF/VGF signaling pathway in mice. *Neuroscience* 285:281-291.
- Wang Y, Devkota S, Musch MW, Jabri B, Nagler C, Antonopoulos DA, Chervonsky A, Chang EB (2010) Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon. *PloS one* 5:e13607.
- Warner-Schmidt JL, Vanover KE, Chen EY, Marshall JJ, Greengard P (2011) Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9262-9267.
- Wasserman WW, Fahl WE (1997) Functional antioxidant responsive elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:5361-5366.
- Wefers B, Hitz C, Holter SM, Trumbach D, Hansen J, Weber P, Putz B, Deussing JM, de Angelis MH, Roenneberg T, Zheng F, Alzheimer C, Silva A, Wurst W, Kuhn R (2012) MAPK signaling determines anxiety in the juvenile mouse brain but depression-like behavior in adults. *PloS one* 7:e35035.
- Weiss U (2008) Inflammation. *Nature* 454:427.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature immunology* 2:346-352.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7:837-847.
- Wichers MC, Koek GH, Robaey G, Verkerk R, Scharpe S, Maes M (2005) IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Molecular psychiatry* 10:538-544.
- Willner P (2016a) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*.
- Willner P (2016b) Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiology of Stress*.
- Willner P, Towell A, Sampson D, S S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 93:358-364.
- Woiciechowsky C, Schoning B, Stoltenburg-Didinger G, Stockhammer F, Volk HD (2004) Brain-IL-1 beta triggers astrogliosis through induction of IL-6: inhibition by propranolol and IL-10. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 10:Br325-330.
- Wong DT, Perry KW, Bymaster FP (2005) Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature reviews Drug discovery* 4:764-774.

- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (New York, NY)* 249:1431-1433.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, NY)* 334:105-108.
- Wu MD, Hein AM, Moravan MJ, Shaftel SS, Olschowka JA, O'Banion MK (2012) Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1beta and not rescued by voluntary running. *Brain, behavior, and immunity* 26:292-300.
- Xu C, Yuan X, Pan Z, Shen G, Kim JH, Yu S, Khor TO, Li W, Ma J, Kong AN (2006) Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular cancer therapeutics* 5:1918-1926.
- Yalcin I, Aksu F, Belzung C (2005) Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European journal of pharmacology* 514:165-174.
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science (New York, NY)* 270:2008-2011.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, NY)* 301:640-643.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
- Yamanaka H, Yokoyama C, Mizuma H, Kurai S, Finnema SJ, Halldin C, Doi H, Onoe H (2014) A possible mechanism of the nucleus accumbens and ventral pallidum 5-HT1B receptors underlying the antidepressant action of ketamine: a PET study with macaques. *Translational psychiatry* 4:e342.
- Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161:264-276.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science (New York, NY)* 308:1626-1629.
- Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaya M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y, Wu H (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418:443-447.
- Yoshimura R, Mitoma M, Sugita A, Hori H, Okamoto T, Umene W, Ueda N, Nakamura J (2007) Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 31:1034-1037.
- Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH (2005) Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175:3339-3346.
- Yu M, Li H, Liu Q, Liu F, Tang L, Li C, Yuan Y, Zhan Y, Xu W, Li W, Chen H, Ge C, Wang J, Yang X (2011) Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cellular signalling* 23:883-892.

- Yu YW, Chen TJ, Hong CJ, Chen HM, Tsai SJ (2003) Association study of the interleukin-1 beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28:1182-1185.
- Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Ren Y, Feng J, McEwen BS, Yan Z (2011) Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular psychiatry* 16:156-170.
- Zagami CJ, Beart PM, Wallis N, Nagley P, O'Shea RD (2009) Oxidative and excitotoxic insults exert differential effects on spinal motoneurons and astrocytic glutamate transporters: Implications for the role of astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 57:119-135.
- Zampieri TT, Pedrosa JA, Furigo IC, Tirapegui J, Donato J, Jr. (2013) Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. *PLoS one* 8:e84094.
- Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA, Jr., Gould TD (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* 533:481-486.
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of general psychiatry* 63:856-864.
- Zarembek KA, Godowski PJ (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 168:554-561.
- Zaru R, Ronkina N, Gaestel M, Arthur JS, Watts C (2007) The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nature immunology* 8:1227-1235.
- Zhang CK, Hewett J, Hemming J, Grant T, Zhao H, Abraham C, Oikonomou I, Kanakia M, Cho JH, Proctor DD (2013) The influence of depression on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 19:1732-1739.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science (New York, NY)* 303:1522-1526.
- Zhang DD, Lo SC, Sun Z, Habib GM, Lieberman MW, Hannink M (2005) Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* 280:30091-30099.
- Zhang JC, Wu J, Fujita Y, Yao W, Ren Q, Yang C, Li SX, Shirayama Y, Hashimoto K (2015) Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 18.
- Zhang JC, Yao W, Hashimoto K (2016) Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Current neuropharmacology* 14:721-731.
- Zhao Z, Zhang HT, Bootzin E, Millan MJ, O'Donnell JM (2009) Association of changes in norepinephrine and serotonin transporter expression with the long-term behavioral effects of antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34:1467-1481.
- Zheng K, Scimemi A, Rusakov DA (2008) Receptor actions of synaptically released glutamate: the role of transporters on the scale from nanometers to microns. *Biophysical journal* 95:4584-4596.

- Zheng P, Zeng B, Zhou C, Liu M, Fang Z, Xu X, Zeng L, Chen J, Fan S, Du X, Zhang X, Yang D, Yang Y, Meng H, Li W, Melgiri ND, Licinio J, Wei H, Xie P (2016) Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular psychiatry* 21:786-796.
- Zhou H, Lapointe BM, Clark SR, Zbytniuk L, Kubes P (2006) A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 177:8103-8110.
- Zhu CB, Blakely RD, Hewlett WA (2006) The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:2121-2131.
- Zhu CB, Lindler KM, Owens AW, Daws LC, Blakely RD, Hewlett WA (2010) Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35:2510-2520.
- Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA (2010) Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology* 58:465-473.
- Zschocke J, Bayatti N, Clement AM, Witan H, Figiel M, Engele J, Behl C (2005) Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions. *The Journal of biological chemistry* 280:34924-34932.