



Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

# **Implicación del factor de transcripción Nrf2 en trastornos depresivos**

M<sup>a</sup> Dolores Martín de Saavedra Álvarez-Uribarri

Licenciada en Farmacia

Directora de tesis: Dra. Manuela García López

Instituto Teófilo Hernando. Universidad Autónoma de Madrid.



## Abstract/ Resumen

---



## **Abstract**

A causative relationship between inflammation and depression has been documented. Because Nrf2 participates in inflammation, we hypothesized that Nrf2 could play a role in depressive disorders. To demonstrate our hypothesis, we employed both genetical and pharmacological approaches, in order to i) study if Nrf2 could promote a depressive-like behaviour and the subsequent biochemical and cellular alterations and ii) to analyse if Nrf2 could be considered as a pharmacological target against depression in two different models: inflammation-induced depression and the chronic mild stress model of depression.

In the first part of this thesis, we demonstrate that Nrf2 knockout (ko) mice showed an increase in the immobility time in the tail-suspension prueba and in the forced swimming prueba, accompanied by a decrease in the grooming time in the splash prueba. As expected, serotonin and dopamine were decreased whilst glutamate was increased in Nrf2 ko mice. Moreover, proteins linked to depression

as BDNF, VEGF, synaptophysin, GFAP and GSK3 $\beta$  were altered in Nrf2 ko mice, indicating that neuroplasticity and regulation and cell signaling were affected. Inflammatory markers such as F4/80, Iba1 and Mac-1 and COX-2 were also altered. Treatment with rofecoxib reversed the depressive-like behavior of Nrf2 knockout mice.

In the second part, it is depicted how the induction of Nrf2 by sulforaphane (SFN) in an inflammatory model of depression elicited by LPS afforded antidepressant-like effects. SFN administered subchronically at 1 mg/kg induced hemoxygenase-1 and glutamate cysteine ligase modulatory subunit, as an indicator of Nrf2 activation; BDNF and VEGF, which could be potentially positive in depression and besides, SFN prevented LPS-induced iNOS and F4/80 expression which reflects that the drug is exerting an anti-inflammatory action.

Finally, in the CMS model of depression, SFN administered chronically at 1 mg/kg, was not able to ameliorate the anhedonic response induced by CMS.

These results show that chronic inflammation due to a deletion of Nrf2 can lead to depressive-like behavior and that induction of Nrf2 could become a therapeutical target to treat depression. Different experimental conditions must be used to obtain valid results in the CMS model.

## Resumen

Existe una relación causal entre inflamación y depresión. Debido a que se ha descrito también que Nrf2 participa en la inflamación, nos planteamos la hipótesis de que Nrf2 podría desempeñar un papel en los trastornos depresivos. Para demostrarlo, empleamos dos enfoques distintos: uno genético y otro farmacológicos, con el fin de i) estudiar si la eliminación de Nrf2 podría promover un comportamiento depresivo acompañado de las consecuentes alteraciones bioquímicas y celulares, y ii) analizar si Nrf2 podría ser considerado como una diana farmacológica en la depresión en dos modelos diferentes: depresión inducida por inflamación y el modelo de depresión inducido por estrés crónico suave.

En la primera parte de esta tesis, se demuestra que los ratones Nrf2 (-/-) muestran un incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión la cola y en

la prueba de natación forzada, acompañado por una disminución en el tiempo de acicalado en prueba de la sacarosa. Como era de esperar, la serotonina y la dopamina están disminuidos, mientras que el glutamato estaba aumentado en los ratones Nrf2 (-/-). Además, las proteínas vinculadas a la depresión como BDNF, VEGF, sinaptofisina, GFAP y GSK3 $\beta$  estaban también alterados en los ratones deficientes en Nrf2, lo que indica que la neuroplasticidad y la señalización celular están alterados. Marcadores inflamatorios, tales como F4/80, Iba1, Mac-1 y COX-2 estaban aumentados en los ratones nulos para Nrf2. Además, el tratamiento con rofecoxib, un antiinflamatorio no esteroideo, previno el comportamiento depresivo de estos ratones.

En la segunda parte de esta tesis, se describe cómo la inducción de Nrf2 por el sulforafano en un modelo de depresión inducido por inflamación mediante lipopolisacárido, produjo un efecto antidepresivo. El sulforafano administrado subcrónicamente a 1 mg/kg induce hemo oxigenasa-1 y glutamato cisteína ligasa moduladora, lo que indica que el sulforafano activa Nrf2; induce también BDNF y VEGF que podría ser potencialmente positivo en la depresión y, además, impide la inducción de iNOS y F4/80 asociadas a la administración de LPS.

Finalmente, en el modelo de depresión inducido por ECS, el SFN administrado crónicamente a 1 mg / kg, no fue capaz de mejorar la respuesta anhedónica producida por el ECS.

Estos resultados muestran que la inflamación crónica debida a una ablación de Nrf2 puede inducir depresión y que la activación de Nrf2 podría convertirse en una diana terapéutica para tratar la depresión. En cuanto al ECS, se deben modificar las condiciones experimentales para poder concluir con firmeza sobre el efecto del SFN.





# Índice

---



---

<b>1. Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>7</b>
2.1 La depresión .....	<b>10</b>
2.1.1 Generalidades de la depresión.....	10
2.1.2 Clasificación de los síndromes depresivos.....	12
2.1.3 Factores etiológicos de la depresión .....	12
2.1.4 Tratamiento de la depresión .....	13
2.2 Teorías de la depresión.....	<b>15</b>
2.2.1 Teoría monoaminérgica .....	15
2.2.2 Teoría de la neuroplasticidad .....	16
2. La administración de citocinas induce síntomas depresivos.....	19
3. El estrés aumenta la inflamación.....	20
2.3 Efectos de las citocinas en el cerebro.....	<b>20</b>
2.3.1 Origen de la inflamación en la depresión.....	20
2.3.2 Paso al sistema nervioso central.....	21

2.3.3 Alteración del metabolismo de los neurotransmisores .....	22
2.3.4 Efecto de las citocinas en la neurogénesis .....	25
2.3.5 Impacto de las citocinas en la función neuroendocrina .....	25
<b>2.4 Modelos de depresión .....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Generalidades de los modelos de depresión.....	25
2.4.2 Modelo inflamatorio.....	28
2.4.3 Modelo de estrés crónico suave o estrés ambiental .....	28
<b>2.5 Nrf2 .....</b>	<b>32</b>
2.5.1. Generalidades de Nrf2.....	32
2.5.2 Regulación de Nrf2 .....	33
2.5.3 Papel protector de Nrf2 .....	36
2.5.4 El sulforafano (SFN) .....	39
<b>3. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>41</b>
Hipótesis de trabajo.....	43
Objetivos. ....	44
<b>4. Materiales y métodos .....</b>	<b>45</b>
4.1 Animales .....	47
4.2 Fármacos y tratamientos .....	48
4.3 Comportamiento.....	48
4.3.1 Prueba de la natación forzada (PNF) .....	48
4.3.2 Prueba de suspensión de la cola (PSC) .....	49
4.3.3 Prueba del vaporizador de sacarosa (PVS) .....	49
4.3.4 Prueba de campo abierto (PCA).....	49
4.5 Estrés crónico suave (ECS).....	50
4.6 Prueba del Rota-Rod .....	51
4.7 Western blot .....	51
4.8 Inmunofluorescencia de GFAP e Iba1 .....	52
4.9 Análisis de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real .....	53
4.10 Determinación de aminas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	54
4.11 Determinación de GABA y glutamato por HPLC .....	55
4.12 Análisis estadístico.....	57

---

<b>5. Resultados .....</b>	<b>59</b>
5.1 Los ratones Nrf2 (-/-) presentan un comportamiento depresivo .....	61
5.2. La ablación de Nrf2 conduce a una modificación de los niveles de neurotransmisores .....	64
5.3 Disminución de la neuroplasticidad en ratones Nrf2 (-/-).....	67
5.4 Aumento de la actividad de GSK3 $\beta$ en los ratones Nrf2 (-/-).....	71
5.5 Participación de la inflamación en el fenotipo depresivo de ratones Nrf2 (-/-)	72
5.6 El LPS administrado intraperitonealmente induce cambios en el comportamiento.....	83
5.6 El sulforafano, inductor de Nrf2, previene la depresión inducida por LPS ....	85
5.7 El sulforafano activa Nrf2, induce neuroplasticidad y previene la inflamación	87
5.8 El sulforafano no revierte la anhedonia inducida por estrés crónico suave a pesar de ejercer un efecto antiinflamatorio. ....	90
<b>6. Discusión .....</b>	<b>97</b>
<b>7. Conclusions/ Conclusiones .....</b>	<b>111</b>
Conclusions .....	113
Conclusiones .....	114
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>117</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>135</b>



# **1. Abreviaturas**

---





5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARE	Antioxidant Response Elements
ATC	Antidepresivo tricíclico
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BH4	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
CBP	cAMP Response Element Binding Protein
CMS	Chronic mild stress
CNC	Cap'n'collar
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Cul3	Cullin-3
DA	Dopamina
db	Decibelio
DOPAC	Ácido dihidroxifenil acético
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition
ECS	Estrés crónico suave
EECC	Ensayos clínicos
EEM	Error estandar de la media
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GCLc	Glutamato-cisteina ligasa catalítica

GCLm	Glutamato-cisteína ligasa moduladora
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLC	Glutamato-cisteína ligasa
GSH	Glutation
GSK3 $\beta$	Glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$
GST	Glutation S-transferasa
h	Hora
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HPA	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HVA	Ácido homovanílico
IDO	Indolamino-2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMAO	Inhibidor de monoaminoxidasa
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
ip	Intraperitoneal
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
KDa	Kilodalton
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacarido
MAPK	Mitogen-activated protein (MAP) kinases
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
min	Minuto
NA	Noradrenalina
Neh	Nrf2-ECH homology
NES	Señal de exclusion nuclear
NF-E2	Nuclear factor erythroid-derived 2
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NF-kB	Nuclear factor kappa B
NLS	Señal de localización nuclear
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NQO1	NAD(P)H quinona-oxidoreductasa
Nrf2	Nuclear factor (eritroid-derived 2)-related factor 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNF	Prueba de la natación forzada
PSC	Prueba de suspensión de la cola
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PVS	Prueba del vaporizador de sacarosa
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RG	Receptor glucocorticoide

rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS- PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERT	Transportador de serotonina
SFN	Sulforafano
sMaf	Maf pequeña
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TNF	Tumor necrosis factor
UGT	UDP-glucuronosil transferasa
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
WB	Western blot



## **2. Introducción**

---



La importancia de la investigación de nuevos fármacos antidepresivos radica en el alto porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento con antidepresivos convencionales (30 – 40 %) y la falta de efecto antidepresivo inmediato que supone una espera de hasta tres semanas en un alivio de la sintomatología.

La inflamación, a pesar de no ser un denominador común en todos los pacientes que sufren depresión, puede suponer una nueva diana terapéutica para un subgrupo de pacientes que sufren esta enfermedad. Cabe destacar, que se ha descrito en la literatura que los pacientes refractarios al tratamiento con antidepresivos son aquellos que presentan marcadores inflamatorios elevados.

Con todo esto, en esta sección se situará el tema de trabajo ahondando en la neurobiología de la depresión y las distintas teorías que tratan de explicarla. Además, se describirá de manera general las funciones del factor de transcripción Nrf2 así como su papel modulador de distintas enfermedades y del sulforafano, concretamente, como posible agente terapéutico en esta enfermedad.

## **2.1 La depresión**

### ***2.1.1 Generalidades de la depresión***

La depresión es un trastorno mental común, caracterizado por tristeza, pérdida de interés o placer (anhedonia), sentimiento de culpa, baja autoestima, trastorno del sueño, del apetito, falta de energía y falta de concentración (Referencia de la OMS).

La depresión forma parte de los trastornos del estado del ánimo, los cuales son de las enfermedades mentales más prevalentes. Afecta dos veces más a mujeres que a hombres. Para que se establezca el diagnóstico de depresión mayor (Tabla 1) se requiere un cambio en el estado de ánimo, caracterizado por tristeza o irritabilidad, acompañado de varios cambios psicofisiológicos, entre ellos alteraciones del sueño, apetito o deseo sexual, estreñimiento, pérdida o incapacidad para sentir placer (anhedonia), llanto, ideación suicida...



**Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de la depresión mayor**

Humor deprimido
Irritabilidad
Baja autoestima
Sentimiento de culpa, desesperanza e inutilidad
Habilidad disminuida para concentrarse y pensar
Apetito aumentado o disminuido
Pérdida o ganancia de peso
Insomnio o hipersomnia
Falta de energía, agitación aumentada, fatiga
Interés disminuido por estímulos placenteros (comida, sexo, interacción social...)
Pensamientos recurrentes de muerte o suicidio

Se diagnostica depresión mayor cuando se sufre un cierto número de los síntomas descritos en la tabla durante más de dos semanas o cuando los síntomas alteran el desarrollo de la vida diaria [Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM IV) 2000].

Estos cambios deben durar un mínimo de dos semanas e interferir considerablemente con las relaciones interpersonales y la actividad laboral <sup>1,2</sup>. La prevalencia de trastornos mentales varía del 4,3 al 26,4 %, según datos epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recabados en 14 países de América, Europa, Oriente Medio, África y Asia. En estos estudios participaron 60.463 personas mayores de edad, y las alteraciones más frecuentes fueron las de tipo ansioso y del estado del ánimo. La OMS ubica a la depresión como la cuarta causa de discapacidad en el mundo, señalando que, para el año 2020, si no antes, estará en segundo lugar. Las personas menores de 45 años son las que más frecuentemente desarrollan depresión, es decir, es más probable que la enfermedad se manifieste durante los años de vida laboral productiva. La edad de inicio típica para la depresión es entre los 20-40 años <sup>3,4</sup>. Otros factores sociodemográficos vinculados al desarrollo de depresión son: el divorcio, la viudez, un nivel socioeconómico bajo o desfavorable y un bajo nivel educativo<sup>4</sup>. Además, de acuerdo con la OMS, sólo el 30 % de los casos se diagnostica y se trata apropiadamente <sup>4</sup>.

### ***2.1.2 Clasificación de los síndromes depresivos***

A lo largo del tiempo se han realizado clasificaciones muy variadas de los trastornos depresivos debido a su gran heterogeneidad. Concretamente, se utilizan como criterios de clasificación la etiología, los síntomas y la evolución de la enfermedad.

Según criterios etiológicos, la depresión puede ser endógena o reactiva, en función de si se conoce o no la causa desencadenante.

En referencia a la clasificación basada en la descripción de los síntomas, la depresión puede dividirse en psicótica o neurótica, diferenciadas principalmente por la presencia o ausencia de alucinaciones o delirios.

Basándose en la evolución de la enfermedad, la depresión se clasifica como unipolar o bipolar, en función de si sólo se producen síntomas depresivos o si hay una combinación de fases de depresión con estados de excitación (manía).

En la actualidad, una de las clasificaciones más aceptadas es la dada por las directrices de la DSM-IV. Según estos criterios, los cuadros depresivos se clasifican en depresión mayor (unipolar y bipolar), trastornos ciclotímicos/distímicos y trastornos atípicos.

### ***2.1.3 Factores etiológicos de la depresión***

El limitado conocimiento acerca de la etiología de la depresión, se refleja mediante una lista de factores de riesgo. Entre los factores etiológicos de esta patología destaca el estrés. La depresión se ha descrito frecuentemente como una patología asociada al estrés puesto que existe buena evidencia de que los eventos estresantes de la vida o el estrés mantenido pueden precipitar los trastornos depresivos <sup>5,6</sup>. No obstante, no todo el mundo se deprime bajo las mismas circunstancias y la probabilidad de desarrollar depresión varía en función de la intensidad y la duración de los eventos estresantes, del apoyo social de cada persona y de la dotación genética individual <sup>7</sup>.

Otros factores adicionales de índole demográfica o económica podrían, asimismo, suponer riesgos potenciales de la enfermedad <sup>8</sup>. Se estima que la depresión mayor es hereditaria en el 31-42 % de los casos, siendo éste un porcentaje muy inferior al 70 % estimado para otras patologías psiquiátricas como la esquizofrenia o el trastorno bipolar. Existen determinadas evidencias que indican que hijos de padres con un cuadro depresivo, presentan una probabilidad tres veces superior de sufrir la enfermedad respecto a aquellos que carecen de estos antecedentes <sup>9-11</sup>. Por lo tanto, la historia familiar, es uno de los factores predictivos más sólidos de vulnerabilidad adquirida a la depresión. A pesar de que el conocimiento acerca de los factores genéticos es limitado <sup>12</sup>, se sabe que pueden interactuar con factores ambientales como el estrés, influyendo de este modo en la vulnerabilidad a padecer depresión mayor <sup>13,14</sup>. La transmisión genética de la vulnerabilidad a la depresión, no sigue claramente las leyes de la herencia de Mendel, si no que parece ser poligénica. De hecho, se baraja la posibilidad de que varios genes puedan interactuar con una amplia variedad de factores ambientales adversos aumentando de este modo la vulnerabilidad familiar a manifestar el trastorno depresivo <sup>15</sup>. Varios estudios han mostrado por ejemplo, que polimorfismos a nivel del gen promotor del transportador de serotonina (5-HT) <sup>16-18</sup> o del receptor 5-HT1A <sup>19</sup> pueden modular la influencia del estrés en la depresión. Parecen de especial relevancia numerosos trabajos que muestran que la dotación genética, aparte de regular la vulnerabilidad al estrés, también puede influenciar la probabilidad de que algunos individuos seleccionen ambientes de alto riesgo, es decir, estilos de vida o situaciones altamente estresantes <sup>20-23</sup>.

Por último, también existen otros factores de riesgo como anormalidades endocrinas (hipotiroidismo o hipercortisolismo), cáncer (como el adenocarcinoma pancreático o tumores de pecho) y efectos secundarios de ciertos fármacos (por ejemplo, de la isotretinoína para el acné o del interferón- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) para la hepatitis C entre otros <sup>3,24</sup>).

### ***2.1.4 Tratamiento de la depresión***

El tratamiento farmacológico de la depresión se basa en el restablecimiento de los niveles de los neurotransmisores serotonina (5-HT) y/o noradrenalina (NA)

deficitarios en el proceso de la enfermedad, según la hipótesis clásica monoaminérgica de la depresión <sup>25</sup>. Entre los primeros antidepresivos utilizados en terapéutica se incluyen los antidepresivos tricíclicos (p.ej. imipramina, amitriptilina, desipramina y clomipramina) y los inhibidores de la enzima monoaminoxidasa (IMAO). No obstante, la frecuencia de los efectos adversos, cardiotoxicidad asociada al empleo de tricíclicos o crisis hipertensivas producidas por los IMAO en interacción con alimentos ricos en tiramina, y su ineficacia en un porcentaje importante de los pacientes, impulsó la investigación de nuevos fármacos.

Desde la década de los ochenta, han adquirido una gran relevancia los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), ya que carecen de los efectos adversos anticolinérgicos presentes en los antidepresivos tricíclicos y son fármacos con una mayor seguridad. Los ISRS no han logrado, no obstante, mejorar la eficacia clínica de los antidepresivos clásicos de manera sustancial y presentan ciertos efectos adversos como náuseas, ansiedad, insomnio, anorexia o disfunción sexual. En este grupo farmacológico se incluyen fármacos tan utilizados como la fluoxetina, paroxetina, citalopram, sertralina y fluvoxamina.

Otras estrategias farmacológicas sobre el sistema monoaminérgico han consistido en el desarrollo de inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa (moclobemida), la terapia combinada de fármacos inhibidores de la recaptación de aminas y moduladores de distintos receptores como la mirtazapina (antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub> y  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenérgicos), o la trazodona (antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>). Asimismo, se han desarrollado compuestos inhibidores de la recaptación de NA y 5-HT como la venlafaxina o duloxetina, con acción selectiva noradrenérgica como la reboxetina o con acción selectiva sobre la dopamina (DA) (amineptina, fenmetrazina, vanorexina) . A pesar de las expectativas generadas, estos compuestos no han logrado aumentar la eficacia ni disminuir significativamente el tiempo de latencia desde el inicio del tratamiento hasta la aparición del efecto terapéutico esperado <sup>26</sup>.

Otro fármaco que representa una innovación potencial para el tratamiento farmacológico de la depresión es la agomelatina. Este fármaco es un nuevo agonista melatoninérgico que actúa sobre los receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> y

adicionalmente es un antagonista 5-HT<sub>2C</sub>. La eficacia, tolerabilidad y seguridad de este compuesto ya se han determinado en varios estudios doble-ciego<sup>27</sup>.

En la tabla 2 se muestra un resumen de los fármacos empleados en el tratamiento de la depresión.

**Tabla 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la depresión**

Clasificación farmacológica	Principios activos
Antidepresivos tricíclicos (ATC)	Imipramina, amitriptilina, desipramina y clomipramina
Inhibidores de monoaminoxidasa (IMAO)	Iproniacida, moclobemida, selgilina
Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (ISRS)	Fluoxetina, paroxetina, citalopram, sertralina y fluvoxamina
Inhibidores de recaptación y moduladores de transmisión de aminas	Mirtazapina, trazodona
Inhibidores de la recaptación de NA y 5-HT	Venlafaxina o duloxetina
Inhibidores de la recaptación de NA	Reboxetina, bupropión
Inhibidores de la recaptación de DA	Amineptina, fenmetrazina, vanorexina
Agonista melatoninérgico	Agomelatina
Inhibidores triples de recaptación NA, 5-HT y DA	En ensayos clínicos

Actualmente, se está ensayando a nivel experimental y clínico la efectividad de los antidepresivos de “triple acción”, inhibidores de la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina. Se piensa que la acción neurotrófica de la dopamina podría ofrecer ventajas terapéuticas respecto a los antidepresivos monoaminérgicos actuales<sup>28</sup>.

## 2.2 Teorías de la depresión

### 2.2.1 Teoría monoaminérgica

La teoría más aceptada de la etiología de la depresión es la monoaminérgica. Esta teoría fue formulada por Schildkraut en los años 60<sup>25</sup>. De acuerdo con esta hipótesis, existe una alteración de la neurotransmisión monoaminérgica con una disminución concomitante de la concentración extracelular de NA y/o 5-HT<sup>25,29</sup>. La teoría se basaba originalmente en diversas observaciones. Por un lado, en los

años 50 se observó que la reserpina, un alcaloide de la rauwolfia utilizado ampliamente como antihipertensivo, que depleta las vesículas de monoaminas, desencadenaba síntomas depresivos en un subgrupo de pacientes<sup>30</sup>. Por otro lado, se encontraron por azar dos clases de compuestos eficaces en el tratamiento de la depresión. Se trata de los antidepresivos tricíclicos (imipramina) y de los inhibidores de la monoaminoxidasa (iproniazid), ya mencionados en un apartado anterior. Estos fármacos eran capaces de aumentar los niveles de NA y 5-HT. Los antidepresivos tricíclicos procedían de la investigación de los antihistamínicos<sup>31</sup> y los IMAO, derivaron de la investigación de antituberculosos<sup>32</sup>.

A pesar de que los antidepresivos tienen una gran potencia<sup>33</sup> y que las alteraciones en las monoaminas podrían contribuir a la vulnerabilidad genética<sup>12,34</sup> que existe en esta enfermedad, la causa de la depresión está lejos de ser una simple deficiencia de monoaminas a nivel central. Los IMAO y los ISRS producen un aumento inmediato de la transmisión monoaminérgica, mientras que el efecto antidepresivo tarda en aparecer unas semanas. Ahora se cree que los aumentos agudos en la cantidad de monoaminas en la sinapsis que es inducida por los antidepresivos, producen neuroplasticidad de manera secundaria. Estos tipos de cambios están en una escala temporal mayor, ya que involucran la transcripción y la traducción de distintos factores<sup>35</sup>.

### ***2.2.2 Teoría de la neuroplasticidad***

Las manifestaciones de neuroplasticidad en el sistema nervioso central (SNC) adulto incluyen alteraciones en la neurogénesis, gliogénesis, sinaptogénesis y la remodelación sináptica, entre otros, que conducen a una alteración en la función dendrítica, procesos implicados en aprendizaje y memoria como la potenciación a largo plazo (LTP; del inglés **L**ong **T**erm **P**otentiation) y la depresión a largo plazo (LTD; **L**ong **T**erm **D**epression)<sup>36</sup>. La disfunción de estos procesos fundamentales podría contribuir a la fisiopatología de los trastornos del humor, y la recuperación de los mismos podría relacionarse con la recuperación de una plasticidad adecuada. Se postula que la depresión podría ser el resultado de una incapacidad para adaptarse a factores ambientales adversos, consecuencia de una disfunción en los mecanismos normales de neuroplasticidad<sup>37</sup>. Esta posibilidad se ve apoyada

por estudios clínicos y preclínicos, en los que se observan alteraciones a nivel estructural y celular en pacientes deprimidos en respuesta al estrés <sup>38,39</sup>.

La observación de la disminución en el volumen del hipocampo y otras zonas cerebrales en un subgrupo de pacientes con depresión apoyaron la teoría neuroplástica de la depresión, en la que existiría una disminución de factores tróficos. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en el papel de BDNF (del inglés, **Brain-Derived Neurotrophic Factor**) que está expresado ampliamente en estructuras límbicas del cerebro aunque también se ha estudiado el papel de otras neurotrofinas como el VEGF (del inglés, **Vascular Endotelial Growth Factor**). Existe una amplia literatura preclínica que apoya esta teoría. Los resultados muestran que distintos tipos de estrés disminuyen la señalización producida por BDNF en el hipocampo; además, el tratamiento crónico con antidepresivos lo aumenta <sup>40</sup>.

No obstante, la implicación de la neurogénesis en la precipitación del comportamiento depresivo, está siendo últimamente cuestionada. En los últimos años se ha postulado que la disminución de este proceso no es esencial para que se produzca la sintomatología depresiva <sup>6,41,42</sup>. La disrupción de la neurogénesis mediante rayos X en roedores <sup>43</sup> no parece afectar al fenotipo conductual depresivo. Además, en algunos estudios se ha observado desesperación conductual sin necesidad de una disminución en la proliferación celular <sup>41</sup>. En concordancia, los ensayos clínicos llevados a cabo con pacientes deprimidos no muestran cambios en la proliferación celular <sup>44</sup>. Cada vez hay un mayor número de trabajos, sin embargo, que consideran que el aumento de la neurogénesis no es imprescindible para que se produzca la mejoría de la sintomatología depresiva <sup>45-48</sup>. En este aspecto, es importante señalar que para que el incremento de la neurogénesis sea beneficioso, las nuevas neuronas generadas en el hipocampo deben de integrarse adecuadamente en las redes neuronales existentes con una apropiada diferenciación y migración <sup>8,49</sup>.

Cabe reseñar también que cada vez existe una mayor evidencia que sugiere la implicación de las células de la glía en la patología depresiva. Esta afirmación se basa en distintas investigaciones llevadas a cabo con tejido postmortem de pacientes que han sufrido depresión y en distintos modelos animales de depresión,

en los que se muestra un descenso en la densidad y en el número de células de la astrogliá, sobre todo en regiones corticales <sup>45,46,50</sup>

### ***2.3 Teoría inflamatoria***

El reconocimiento de la inflamación como uno de los mecanismos patogénicos primarios de las enfermedades crónicas es una de las mayores observaciones científicas de la década <sup>51</sup>. Aunque la participación de la inflamación en este tipo de enfermedades se ha centrado en diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, recientemente ciertas enfermedades psiquiátricas como la depresión mayor se están sumando a la lista de enfermedades en las que la inflamación está significativamente involucrada. De esta manera, se abre la puerta a nuevas dianas terapéuticas para tratar la depresión mayor aunque sea en un subgrupo de pacientes en los que se ha descrito un aumento de parámetros inflamatorios.

Las evidencias que existen para la asociación entre depresión e inflamación se basan en distintas observaciones, que comentaremos a continuación:

#### ***1.- Pacientes que sufren depresión muestran biomarcadores de inflamación aumentados***

Las primeras evidencias de que la depresión estaba asociada a un aumento de la inflamación provienen principalmente del grupo de Maes <sup>52-54</sup>, grupo que describió un aumento de marcadores inflamatorios en pacientes con depresión incluyendo proteínas de fase aguda, de citocinas proinflamatorias y marcadores celulares de activación inmune. Estos datos fueron una sorpresa porque existía literatura relacionando el sistema inmune y la depresión dominada por descripciones de respuesta celular linfocitaria disminuida, y actividad de linfocitos Natural Killer también disminuida. Aunque esto no está totalmente resuelto, datos preclínicos sugieren que la respuesta inflamatoria *per se* podría estar limitando la actividad de los linfocitos <sup>55</sup>.

Desde la década de los 90 ha ido aumentando la literatura que apoya los datos obtenidos por Maes et al.. Distintos meta-análisis han revelado que los marcadores inflamatorios aumentados en depresión más reproducibles son el



aumento de citocinas en sangre periférica, IL-6, TNF $\alpha$  (del inglés, **T**umor **N**ecrosis **F**actor  **$\alpha$** ) y la proteína C reactiva<sup>56,57</sup>. También se ha descrito que existe aumento en sangre periférica de pacientes con depresión de quiomioquinas, moléculas de adhesión celular y de NF- $\kappa$ B, factor nuclear que se induce con el estrés. Además, se ha descrito que existe una correlación entre la concentración de estos factores y la severidad de los síntomas depresivos (alteraciones del sueño, disfunción cognitiva y fatiga<sup>58,59</sup>).

Una serie de experimentos demuestran que los niveles inflamatorios aumentados de los pacientes deprimidos vuelven a los niveles basales después de un tratamiento exitoso con antidepresivos<sup>60</sup>. Se describe que pacientes con depresión que no responden a la terapia antidepresiva muestran marcadores inflamatorios aumentados y además los pacientes con estos parámetros inflamatorios más altos de manera basal tienen menos probabilidades de responder al tratamiento antidepresivo<sup>61-63</sup>.

## *2. La administración de citocinas induce síntomas depresivos*

El segundo bloque de evidencias que apoyan la teoría inflamatoria de la depresión se basa en que la administración de citocinas pro-inflamatorias o inductores de éstas conduce a la aparición de comportamiento depresivo tanto en modelos animales como en humanos.

a) La administración de endotoxina o la vacuna tifoidea en humanos conduce a alteraciones en el comportamiento que incluyen humor alicaído, cansancio y disfunción cognitiva<sup>64-69</sup>. Los síntomas desarrollados tras la administración de endotoxina son revertidos mediante la pre-administración de antidepresivos<sup>69</sup>.

b) La administración crónica de IFN $\alpha$  induce síntomas depresivos. Entre un 30-50 % de los pacientes tratados cumplen los criterios diagnósticos de depresión mayor<sup>70-72</sup>. Comparando los síntomas de depresión en pacientes tratados con IFN $\alpha$  con pacientes con depresión idiopática se muestra una gran correlación tanto es la expresión de los síntomas como en la severidad<sup>73</sup>. Las diferencias principales que se encontraron fueron un mayor enlentecimiento psicomotor y anorexia y menos sentimiento de culpa y reproche en los tratados con IFN.

Además, esta sintomatología se revierte mediante la pre-administración de tratamientos antidepresivos convencionales, incluyendo la paroxetina <sup>70,74</sup>.

### *3. El estrés aumenta la inflamación*

El estrés psicosocial es bien conocido como un precipitante de depresión mayor <sup>75</sup>. Uno de los primeros descubrimientos que relacionaron estrés y depresión es un trabajo en humanos frente al prueba de estrés social de Trier. Se sometió a los sujetos a unas pruebas en las que tiene que hablar y hacer cálculos matemáticos en público. Se observó un aumento de la unión del factor de transcripción inflamatorio NF- $\kappa$ B al ácido desoxirribonucleico (ADN) en células mononucleares de sangre periférica <sup>76</sup>.

El papel del sistema nervioso simpático (SNS) se ha estudiado extensamente como el mecanismo responsable de la inflamación en respuesta al estrés. Las catecolaminas son capaces de aumentar la expresión de citocinas tanto en el cerebro como en la periferia de ratas a través de receptor  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgico <sup>77</sup>. Además agonistas  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgico son capaces de activar NF- $\kappa$ B in vitro <sup>76</sup>. Sin embargo, la relación entre el SNS y el sistema inmune es complejo y comprende tanto aspectos inhibitorios como estimulatorios <sup>78</sup>.

El sistema nervioso parasimpático (SNP) también está relacionado con la regulación inmune <sup>79</sup>. La denominada vía colinérgica antiinflamatoria consiste en la liberación de acetilcolina por el nervio vago que a su vez activa los receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , capaces de regular la síntesis de proteínas. Además, la estimulación del nervio vago es capaz de reducir la mortalidad secundaria a la inoculación de endotoxina en ratas a la vez que reduce la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de TNF $\alpha$ .

## **2.3 Efectos de las citocinas en el cerebro**

### *2.3.1 Origen de la inflamación en la depresión.*

La inflamación crónica está asociada al desarrollo de distintas enfermedades como la diabetes, el cáncer, la enfermedad cardiovascular y la depresión. El origen de la inflamación crónica asociada a distintos procesos patológicos se encuentra en

diversos factores incluyendo factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. En el caso de la depresión, una de las causas principales de inflamación es el estrés. El estrés es uno de los predictores de desarrollo de depresión más importantes <sup>75</sup> como se ha mencionado en el apartado 2.1.3. El estrés psicosocial, el estrés ambiental y el estrés ocurrido en la vida temprana se han asociado con un aumento de marcadores inflamatorios tanto en animales de laboratorio como en humanos. En estos casos se observa una alteración del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y activación de NF- $\kappa$ B <sup>80</sup>. La dieta y la obesidad son otros factores que están siendo objeto de estudio como inductores de inflamación. Un aumento del índice de masa corporal se asocia a un aumento de la probabilidad de desarrollar depresión y viceversa. La obesidad induce la expresión de MCP-1 (del inglés, **Monocyte Chemoattractant Protein-1**) por los adipocitos, lo cual atrae a los macrófagos circulantes y producen una batería de citocinas <sup>81</sup> que como se explicará en el próximo apartado pueden afectar al SNC. La disfunción de los linfocitos T o el síndrome del inruebaino permeable son otros dos factores que conducen a inflamación crónica no resuelta que inducen distintas enfermedades.

### ***2.3.2 Paso al sistema nervioso central***

Al ser las citocinas unas proteínas relativamente pesadas de hasta 70 KDa no atravesar fácilmente la **barrera hematoencefálica** (BHE) por lo que se han propuesto varios mecanismos por los que éstas pueden afectar al comportamiento:

- 1.- Paso por zonas permeables de la BHE como los órganos circunventriculares.
- 2.- Transporte activo a través de transportadores saturables.
- 3.- Activación de las células de la vasculatura cerebral como el endotelio y macrófagos perivasculares.
- 4.- La denominada ‘ruta natural’ por la que los receptores de citocinas de las fibras aferentes periféricas llevan la señal a zonas cerebrales como el núcleo del tracto solitario y el hipotálamo.

- 5.- Reclutamiento de células activadas en la periferia tales como monocitos/macrófagos al cerebro donde pueden seguir produciendo citocinas.

### ***2.3.3 Alteración del metabolismo de los neurotransmisores***

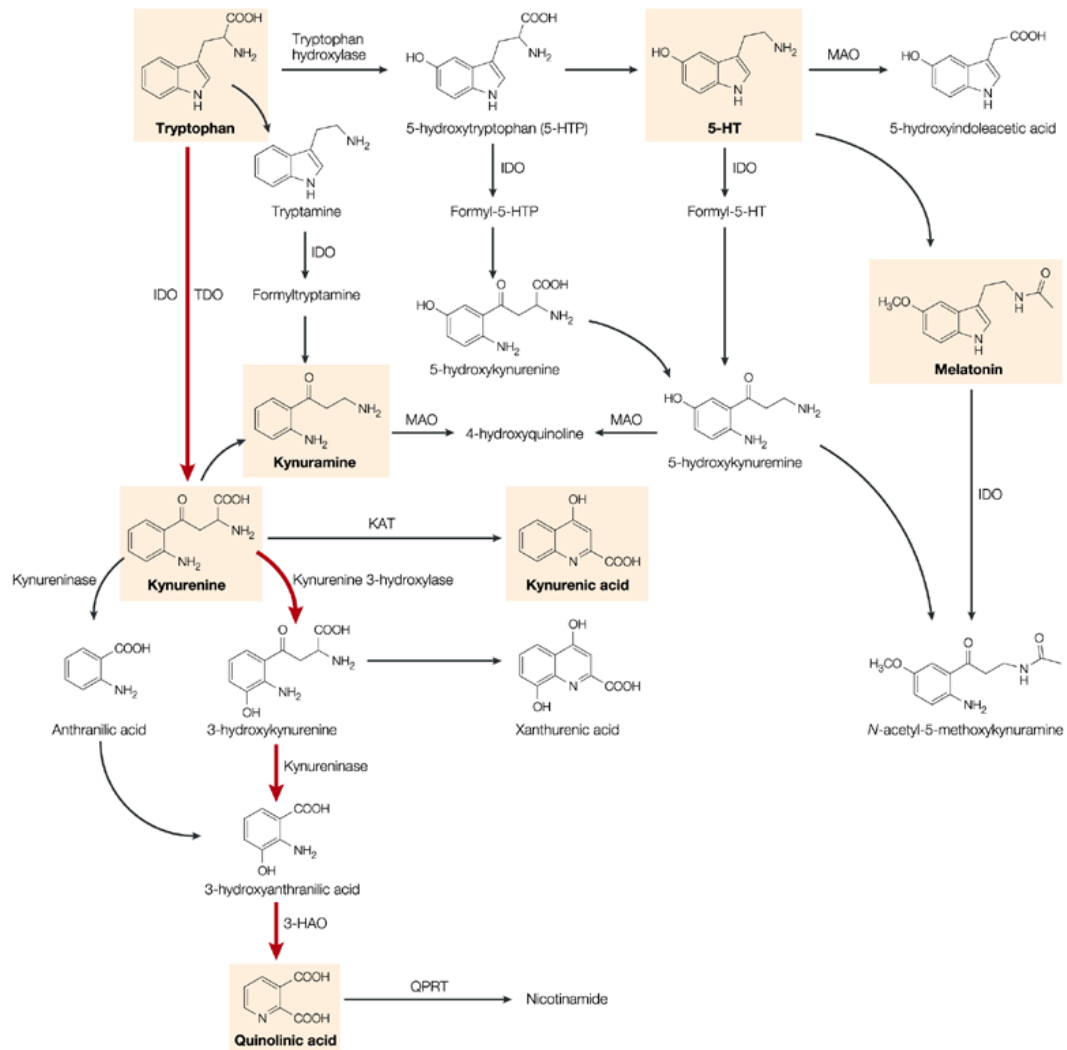
Numerosos estudios tanto en humanos como en animales han demostrado que las citocinas administradas aguda y crónicamente son capaces de alterar los niveles de serotonina, dopamina y glutamato.

Los inhibidores de la recaptación de serotonina son capaces de revertir los síntomas depresivos inducidos por el tratamiento crónico con IFN $\alpha$  en humanos <sup>70,74</sup>. El aumento de IL6 inducido por IFN en líquido cefalorraquídeo se correlaciona negativamente con los niveles de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) <sup>82</sup>.

Estudios mediante neuroimagen han demostrado que las citocinas tienen un fuerte efecto en las vías dopaminérgicas: el flujo sanguíneo y la actividad metabólica están alterados en los ganglios basales durante la exposición a estímulos inflamatorios <sup>83,84</sup>. La administración de IFN $\alpha$  en primates no humanos disminuyen también los niveles de ácido homovanílico (HVA) en el líquido cefalorraquídeo (CSF) <sup>85,86</sup>. Estudios en roedores también han demostrado que las citocinas afectan los ganglios basales y las vías dopaminérgicas <sup>85</sup>.

Los mecanismos por los que estas citocinas podrían estar afectando el metabolismo de las monoaminas se ha explicado mediante varios mecanismos. Uno de ellos sería la inducción de la indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) <sup>38,87</sup>. La IDO es una enzima que se activa por distintas citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL6, IL1) y por varios mecanismos de señalización intracelular [p38, NF- $\kappa$ B, STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1)]. Esta enzima produce una degradación del triptófano hacia otros metabolitos de manera que la síntesis de serotonina queda comprometida (Fig. 1). Estos metabolitos de la llamada vía de las kinureninas tienen efectos neuroactivos. El ácido quinolínico tiene el potencial de actuar sobre el receptor NMDA (del inglés, N-Methyl-D-Aspartic acid) y de producir estrés oxidativo, lo cual conduce finalmente a

excitotoxicidad. Por el contrario, el ácido kinurénico se produce principalmente en los astrocitos donde disminuye la síntesis de dopamina.



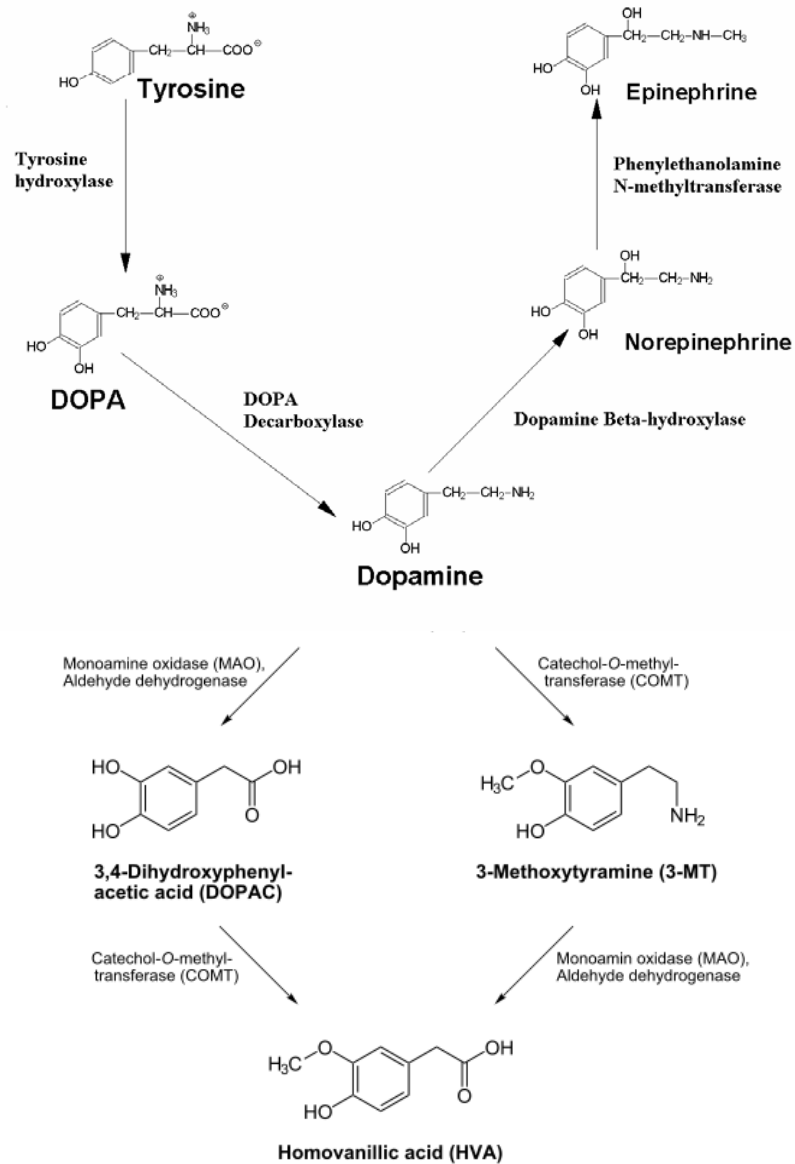
Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 1. Metabolismo de la serotonina.** Tomado de Nature Reviews Drug discovery<sup>88</sup>.

Otra de las rutas que puede afectar al metabolismo de las monoaminas es la activación de las MAPK (del inglés, **Mitogen-Activated Protein Kinases**) por las citocinas. Se conoce que la activación de p38 conduce a un aumento de la actividad del transportador de serotonina (SERT)<sup>39</sup>. La endotoxina también es capaz de aumentar la actividad del SERT<sup>89</sup>. Por otro lado, las citocinas también son capaces de aumentar la actividad del transportador de dopamina<sup>90</sup>.

También se conoce que las citocinas son capaces de degradar la tetrahydrobiopterina (BH4)<sup>7,41</sup>. La BH4 es un cofactor de la triptófano hidroxilasa

y de la tirosina hidroxilasa, que son las enzimas limitantes en la síntesis de serotonina y dopamina/noradrenalina respectivamente (Fig. 2).



**Figura 2. Metabolismo de la dopamina, noradrenalina y adrenalina.**

Finalmente, las citocinas también tienen un efecto sobre el metabolismo del glutamato. Esto se debe a que las citocinas disminuyen la expresión de los transportadores de glutamato y además aumentan su liberación desde los astrocitos<sup>91</sup>.

### ***2.3.4 Efecto de las citocinas en la neurogénesis***

La neurogénesis es un proceso muy estudiado en la patología de la depresión y en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos. Varios antidepresivos tienen efecto neurogénico y, además, su mejora en la conducta depende de esta actividad neurogénica<sup>40,47</sup>. La literatura existente parece indicar que el estrés induce la liberación de citocinas inflamatorias que a su vez disminuyen la neurogénesis; esto finalmente conduce a los cambios en el comportamiento que se producen por el estrés. Más concretamente, el estrés crónico se ha asociado a una disminución de la neurogénesis y a la aparición de síntomas depresivos en animales de laboratorio<sup>40</sup>. Además, esta disminución de la neurogénesis y de la síntesis de BDNF se revierten mediante la administración de IL-1ra, un antagonista del receptor de IL1 o mediante el uso de animales nulos para este receptor<sup>92-94</sup>.

### ***2.3.5 Impacto de las citocinas en la función neuroendocrina***

Una de las alteraciones más reproducibles en los pacientes que sufren depresión es la alteración del eje HPA. Las hormonas de este eje como la hormona liberadora de corticotropina, la hormona adrenocorticotropa (ACTH) o el cortisol se encuentran elevados en los pacientes con depresión mayor. Las citocinas son capaces de mediar estos efectos en animales de laboratorio<sup>95</sup> y en humanos<sup>96</sup>. Esto se acompaña de resistencia a glucocorticoides debido a una falta de función o de expresión del receptor glucocorticoide. Existe una amplia literatura que describe como las citocinas son capaces de disminuir la expresión del receptor glucocorticoide (RG)<sup>97</sup>. Los mecanismos propuestos para esta resistencia parecen mediados por p38<sup>98</sup>, de STAT-5<sup>99</sup> o de NF-κB<sup>100</sup> de manera que evitan que RG se una al ADN en el núcleo para ejercer sus efectos.

## **2.4 Modelos de depresión**

### ***2.4.1 Generalidades de los modelos de depresión***

Los modelos de depresión utilizados hasta la fecha se basan en dos fundamentos: i) la acción de antidepresivos ya conocidos y ii) la respuesta a estrés (Tabla 3).

Alguno de estos prueba, especialmente la prueba de natación forzada, ha sido muy efectivo en predecir la eficacia antidepressiva de nuevos fármacos. Además, han permitido formular distintas hipótesis sobre el origen de la depresión y plantear nuevas dianas terapéuticas. Sin embargo, existe una serie de problemas que dificulta el estudio de la depresión en animales.

- 1.- Uno de los mayores problemas en la investigación en depresión es la falta de modelos validados para estudiarla. Muchos de los síntomas principales de la depresión, como la tristeza, baja autoestima, pensamientos suicidas, etc., son difíciles de estudiar en animales de laboratorio.
- 2.- Otra de las desventajas es que estos prueba todavía no han introducido un fármaco con un mecanismo de acción realmente novedoso (no monoaminérgico); aunque ello no sea solo debido a los modelo de depresión, sino también a las dificultades del proceso de autorización de medicamentos por las autoridades competentes.
- 3.- Otro punto a tener en cuenta es que estos medicamentos son activos de manera aguda en los modelos que existen, mientras que su eficacia clínica depende de una administración crónica. Así no se sabe si estas pruebas son sensibles al mecanismo de acción real que se les achaca o a algún otro epifenómeno.
- 4.- Además, estos modelos utilizan ratones ‘normales’ mientras que en la mayoría de los casos la depresión posee un componente genético. Se desconocen los genes que aumentan la vulnerabilidad frente a la depresión.

Teniendo todos estos aspectos en cuenta la mejor aproximación que se puede hacer consiste en usar distintos modelos de los existentes para estudiar por separado las distintas características de la depresión como son las alteraciones cognitivas, las alteraciones de la atención, la anhedonia, etc. En esta tesis doctoral nos valdremos de distintos modelos de depresión para intentar demostrar la hipótesis de partida: un modelo genético, un modelo agudo basado en un mecanismo inflamatorio y un modelo crónico basado en la inducción de estrés.



**Tabla 3. Modelos animales de depresión utilizados en investigación.**

Modelo	Características principales
Prueba de natación forzada	Los antidepresivos agudamente aumentan el tiempo que el animal lucha en un recipiente con agua. La ausencia de lucha es una medida de desesperanza.
Prueba de suspensión de la cola	Los antidepresivos agudamente aumentan el tiempo que el animal lucha cuando es suspendido por la cola. La ausencia de lucha es una medida de desesperanza.
Prueba de indefensión aprendida	Los animales son expuestos a una descarga eléctrica repetidas veces. A medida que aumentan las repeticiones el animal tarda más tiempo en escapar o no lo consigue. Los antidepresivos disminuyen el tiempo de latencia y los fallos.
Estrés crónico suave	Los animales expuestos repetidamente a distintos estreses (ruido, luces intermitentes, falta de comida...) muestran disminución en la preferencia por sacarosa y conducta sexual. Evalúa principalmente la anhedonia.
Estrés social	Los animales son expuestos a varios tipos de estrés social (cercanía a machos dominantes o olor a depredadores naturales) muestran distintas alteraciones en el comportamiento.
Estrés en edades temprana	Los animales son separados de sus madres a edades tempranas. Muestran alteraciones en el comportamiento y en el eje HPA mantenido en edades adultas que pueden ser revertidas con antidepresivos.
Bulbectomía olfatoria	Alteraciones químicas o quirúrgicas en el bulbo olfatorio causan alteraciones en la conducta que pueden ser revertidas con antidepresivos.
Condicionamiento al miedo	Los animales muestran miedo ante estímulos neutros, como un sonido o una jaula, que han asociado a un estímulo negativo como una descarga eléctrica.
Pruebas basados en la ansiedad (campo abierto, luz-oscuridad, prueba del laberinto elevado)	Los animales exploran un determinado ambiente (espacio abierto, área iluminada, área elevada...). Los ansiolíticos (benzodiazepinas) aumentan este tiempo.
Pruebas basados en la recompensa (autoadministración de drogas, ensayos de estimulación intracraneal...)	Los animales muestran respuestas muy reproducibles frente a drogas de abuso (o comida o sexo) en ensayos condicionados.
Pruebas basados en la cognición: memoria o atención (Prueba de morris, laberinto en T...)	Miden la capacidad de los animales de aprender y recordar en diversas situaciones

### **2.4.2 Modelo inflamatorio**

Existen evidencias de que el desarrollo de la depresión puede estar asociado a una activación del sistema inmune innato<sup>60,101</sup>. Un modelo inmunológico de depresión mayor es el denominado comportamiento enfermizo (en inglés ‘sickness behavior’)<sup>102-104</sup>. Este comportamiento enfermizo se puede inducir por distintos agentes pro-inflamatorios como son el lipopolisacárido (LPS), el TNF $\alpha$ , el INF $\alpha$ , la IL1 $\beta$ , la IL6, el bacilo calmette-guerin, etc.

El LPS es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas considerado un potente activador de la respuesta inmunitaria innata además de estar aceptado como un inductor de depresión en roedores<sup>102,105,106</sup>. La administración de LPS tanto a nivel central como periférico en roedores induce depresión, aumento del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola y en el de natación forzada además de ser revertidos por distintos antidepresivos y por minociclina, compuesto que atenúa la neuroinflamación<sup>107,108</sup>. Varias características fundamentales del comportamiento enfermizo se solapan con los síntomas clínicos de la depresión como el descenso de la actividad motora, la anhedonia, el descenso de la ingesta de alimentos, activación del eje HPA, y alteraciones de la neurotransmisión monoaminérgica<sup>107,109-111</sup>.

Humanos expuestos a bajas dosis de LPS también desarrollan un humor decaído que se relaciona con la secreción de citocinas<sup>64</sup>. Este mismo efecto sobre el humor se desarrolla en humanos al administrar la vacuna tifoidea<sup>66</sup>.

### **2.4.3 Modelo de estrés crónico suave o estrés ambiental**

La depresión se ha relacionado con la falta de control sobre las experiencias estresantes indeseables. Se ha observado que cuando existe un grado de control conductual sobre los eventos adversos, las consecuencias sobre la salud y las emociones de estas experiencias son mucho menos severas. La importancia del control sobre estos agentes estresantes se ha demostrado en varias especies, incluyendo los humanos, en las que se han encontrado un amplio rango de alteraciones conductuales y neuroquímicas<sup>112</sup>. De hecho, estudios experimentales han demostrado que, mientras que el estrés bajo control aumenta la neurogénesis

y la memoria, la pérdida de control del mismo produce efectos opuestos<sup>113-115</sup>. Se han escrito numerosas revisiones acerca del papel del estrés en la patología de la depresión<sup>35,116-120</sup>. Mediante entrevistas acerca de los eventos episódicos de la vida diaria, eventos con un contenido negativo o indeseable que tienen un inicio y un fin, se ha llegado a la conclusión de que las personas que padecen episodios de depresión mayor son las que han estado más expuestas a agentes estresantes<sup>121</sup>. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en las últimas tres décadas y todos ellos han mostrado una asociación consistente entre la exposición a eventos estresantes y la consiguiente aparición de episodios de depresión mayor. Esta asociación se explicita en los estudios llevados a cabo por Mazure et al.<sup>121</sup>, en los que se apunta que en pacientes deprimidos los agentes estresantes son dos veces y media más probables que en pacientes control y que el 80 % de los casos de depresión están precedidos por un agente estresante severo. Se ha encontrado, además, una asociación directa entre la severidad y el número de eventos negativos y la probabilidad de inicio de la depresión<sup>13</sup>. Las primeras investigaciones acerca de la relación de la depresión con el estrés se basaban casi exclusivamente en el análisis de eventos episódicos. En la actualidad, existe un mayor interés acerca del estudio del estrés crónico (estrés con una duración superior a 12 meses), dado que este parece un mejor vaticinador de los síntomas depresivos que el estrés agudo<sup>122</sup>. Hay abundantes estudios epidemiológicos que muestran la relación entre los efectos perjudiciales del estrés crónico en el trabajo, la pobreza<sup>123-125</sup>, las dificultades del matrimonio<sup>126</sup> y la ausencia de apoyo social<sup>118</sup> con la depresión. Así mismo, se ha encontrado una relación funcional entre estrés crónico y episódico en la precipitación de los episodios depresivos<sup>127</sup>. Los agentes estresantes crónicos, de hecho, se asocian frecuentemente con una exacerbación de los efectos de los eventos de la vida sobre los episodios de depresión mayor. Otra característica del estrés crónico es su “efecto a largo plazo”, es decir, la larga duración de sus consecuencias. Si bien la mayor parte de las depresiones tienen una duración de meses o pocos años, algunos pacientes sufren depresión a lo largo de toda su vida aun cuando los agentes estresantes han cesado por completo. Esto sugiere que hay efectos del estrés que son persistentes y que pueden condicionar la probabilidad de sufrir recurrencias sucesivas. Asimismo, los síntomas residuales por debajo del umbral, están presentes en un

alto porcentaje de pacientes a pesar de la administración de un tratamiento crónico antidepresivo y de la finalización del estrés. El estrés crónico durante el desarrollo también tiene importantes consecuencias en el adulto. De hecho, existe una mayor proporción de personas deprimidas entre aquellos adultos que han sufrido situaciones adversas durante su niñez, como la separación de sus padres, psicopatología parental o abusos<sup>128-130</sup>

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

El estrés ambiental rompe el equilibrio del organismo, es decir, su estado homeostático, como consecuencia de la acción de un estímulo proveniente del exterior o del interior del organismo, que recibe el nombre de agente estresante. Como respuesta a este estímulo, se desencadenan una serie de reacciones de comportamiento y/o fisiológicas con el fin de adaptarse lo mejor posible a esta nueva situación. En esta respuesta el organismo activa su eje hipotálamo-simpático-cromafín y el eje HPA. Desde el punto de vista fisiológico esta reacción es beneficiosa para el animal ya que le permite recuperar su estado homeostático anteriormente alterado. Si esta situación se convierte en crónica, el animal ya no tiene tanta capacidad para reaccionar y genera problemas en los procesos de crecimiento reproductivos, osmorreguladores e inmunitarios que se reflejan a nivel de organismo, población y comunidad.

El estrés crónico suave (ECS) se desarrolló como un modelo animal para mimetizar los factores ambientales adversos que contribuyen a la inducción de los trastornos depresivos en humanos. El modelo es capaz de reproducir cambios en el comportamiento que perduran durante meses. Se considera uno de los mejores modelos en cuanto a su validez constructiva, aparente y predictiva<sup>131,132</sup>. Respecto a la **validez constructiva**, se pretendió proporcionar una simulación realista del estrés de la vida diaria estableciendo un modelo experimental en el que los roedores se exponían durante varias semanas a distintos agentes estresantes suaves y no predecibles. Así, los animales se exponen secuencialmente a una variedad de

agentes estresantes suaves (por ejemplo, iluminación durante toda la noche, periodos de privación de agua y comida, inclinación de la caja, emparejamiento con un compañero desconocido...), que van cambiando cada pocas horas por un periodo de semanas o meses <sup>133-135</sup>.

La **validez aparente** viene claramente demostrada en este modelo, que es capaz de reproducir un síntoma central de la depresión como es el comportamiento anhedónico <sup>136</sup>. Además, el ECS induce un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada <sup>137,138</sup> un aumento en la ansiedad <sup>139</sup> y una variedad de alteraciones en el sueño características del trastorno depresivo <sup>140</sup>. Asimismo, este modelo es capaz de inducir un deterioro en la memoria de reconocimiento <sup>135,141</sup> y en la memoria espacial <sup>142</sup>.

Respecto a los cambios biológicos, los animales sometidos a ECS presentan signos que indican una hiperactividad del eje HPA <sup>143</sup> y una hipersecreción de corticosterona <sup>144</sup>. El ECS también induce una disminución de la proliferación celular y de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo <sup>145,146</sup>. Algunos estudios también han mostrado cómo el ECS induce una disminución de la génesis de células de la glía en hipocampo <sup>147</sup> y un aumento de la apoptosis hipocampal y cortical <sup>148,149</sup>. Aparte de estas alteraciones, este paradigma experimental provoca diversas modificaciones en numerosos marcadores de plasticidad neuronal. Por ejemplo, el ECS produce una regulación a la baja del factor neurotrófico BDNF <sup>40,150</sup>.

Por último, respecto a la **validez predictiva**, la mayoría de los fármacos que se utilizan en la actualidad son capaces de revertir el comportamiento anhedónico. Entre ellos figuran antidepresivos tricíclicos como la imipramina, desipramina, amitriptilina y clomipramina <sup>151,152</sup> y por los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina como fluoxetina, fluvoxamina, citalopram y escitalopram <sup>151,153,154</sup>.

## 2.5 Nrf2

### 2.5.1. Generalidades de Nrf2

El descubrimiento del factor de transcripción Nrf2 o NFE2L2 [del inglés, ‘**N**uclear **F**actor (Erythroid-derived 2)- **R**elated **F**actor-**2**’ o ‘**N**uclear **F**actor (**E**rythroid-**D**erived **2**)-**L**ike **2**’] está relacionado con estudios de la proteína NF-E2 (del inglés, **N**uclear **F**actor **E**rythroid-derived **2**) implicada en la regulación de genes de globina específicos de tejido. La caracterización de esta proteína en levaduras permitió identificar dos proteínas muy semejantes a NF-E2, a las que se denominó Nrf1<sup>155</sup> y Nrf2<sup>156</sup>, ambos reguladores positivos de los ARE (del inglés **A**ntioxidant **R**esponse **E**lements). Posteriormente se encontró un tercer factor, Nrf3, que funciona como un regulador negativo de los ARE<sup>157</sup>. Los ARE son regiones ubicadas en el promotor de enzimas antioxidantes, de enzimas de detoxificación de fase II y relacionadas con estrés cuyo principal regulador es Nrf2. Nrf2 interacciona con estas regiones ARE tanto constitutivamente como en respuesta a distintas señales de estrés oxidativo o electrofílico.

Los Nrf2 pertenecen a una familia de proteínas básicas con una cremallera característica de leucinas (bZip) en la región C-terminal. Nrf2 posee seis regiones altamente conservadas denominadas Neh (del inglés, **N**rf2-**E**CH **H**omology) (Fig 3). Neh1 posee una zona cap’n’collar de *Drosophila* altamente conservada entre los Nrf2 cuya función aún se desconoce; además posee la cremallera de leucinas que le permiten unirse las proteínas Maf pequeñas (sMaf). Se ha descrito que al eliminar el dominio Neh2 la actividad del factor se incrementa, proponiendo dicho dominio como el sitio de interacción con el represor. La región Neh3 podría desempeñar un papel estabilizador de Nrf2 e interacciona con el ‘aparato’ transcripcional. Neh4 y Neh5 también son dominios de transactivación aunque se unen a otra molécula distinta, la CBP (del inglés, **c**AMP **R**esponse **E**lement **B**inding **P**rotein) que posee actividad acetiltransferasa de histonas intrínseca. El dominio Neh6 podría contener un degrón involucrado en la degradación de Nrf2.

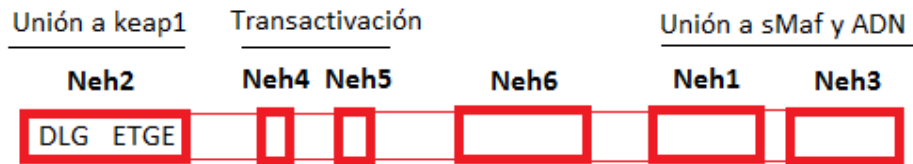


Figura 3. Estructura de Nrf2.

El gen de Nrf2, Ffe212, codifica para una proteína de 589 aminoácidos en el hombre y 597 en el ratón, con un peso molecular teórico de 68 KDa. Sin embargo, al ser una proteína muy ácida su movilidad electroforética se ve reducida y en geles de poliacrilamida presenta un tamaño aparente de 110 KDa.

### 2.5.2 Regulación de Nrf2

Como ya hemos mencionado, Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células pero su actividad está estrictamente regulada. No se encuentra libre y activo todo el tiempo, sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidativo. Aunque es relativamente sencillo encontrar niveles constitutivos del ARNm de Nrf2, ha resultado difícil detectar la proteína madura, sugiriendo la rápida degradación dentro de la célula. La vida media de Nrf2 es muy corta y se ha estimado en un tiempo menor de 20 minutos en macrófagos y en varias líneas celulares. El uso de inhibidores del proteasoma indica que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinización y reconocimiento del proteasoma <sup>158</sup>.

Un detallado análisis de la actividad de Nrf2 usando sistemas de hibridación en levaduras llevó a la identificación del represor de Nrf2, denominado Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Fig.4) quien suprime hasta en un 80 % la translocación al núcleo de Nrf2 y por lo tanto la actividad transcripcional de Nrf2. Estas interacción se ha confirmado in vitro y en sistemas celulares de mamíferos.

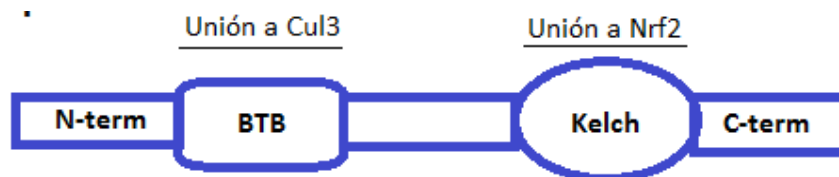
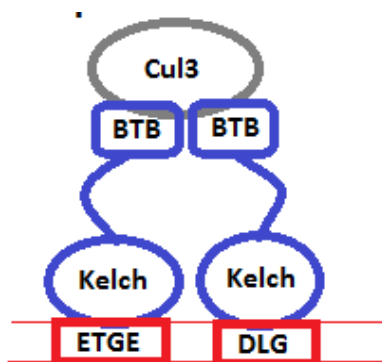


Figura 4. Estructura de Keap1.

Keap1 es una proteína adaptadora de sustratos para la ubiquitina ligasa E3 que regula los niveles de Nrf2 según el estado redox de la célula<sup>159-161</sup>. La interacción entre Nrf2 y Keap1 ocurre a través de un mecanismo de “doble anclaje” llamado también mecanismo de pestillo y bisagra (Fig. 5). En este modelo<sup>162</sup>, dos motivos del dominio N-terminal Neh2 de Nrf2 (ETGE y DGL) interaccionan con dos dominios Kelch de dos moléculas independientes de Keap1. Un único polipéptido de Nrf2 se une primero a un motivo de Kelch de Keap1 a través de un motivo de alta afinidad ETGE lo que permite que el motivo de baja afinidad DGL se una con el otro dominio distinto Kelch presente en la otra subunidad de Keap1<sup>163 164</sup>. Además de esta interacción con Nrf2, Keap1 también se une a Cullin-3 (Cul3) formándose el complejo de ubiquitina ligasa E3 a través de la asociación con la proteína Ring-Box1. Este complejo es capaz de ubiquitinar Nrf2 y marcarlo para su degradación proteasómica en un estado celular normal<sup>156,158,162</sup>.



**Figura 5. Interacción entre Nrf2, Keap1 y Cullina3.**

Existen varias formas de regulación de Nrf2. La principal es la rotura de la unión de Nrf2 con Keap1 aunque también se ha descrito que varias cinasas pueden regular la activación de Nrf2.

- *Modificaciones en Keap1 según el estado redox celular.* En presencia de oxidantes o electrófilos las cisteínas 151, 273 y 288 de Keap1 se modifican llevando a la disociación de la unión entre Nrf2 y Keap1. Nrf2 escapa así de la ubiquitinización. Por tanto, modificaciones en Keap1 relacionadas con estrés oxidativo llevan a la estabilización de Nrf2, su acumulación en el núcleo y la transcripción de genes que contienen ARE.



El sulforafano, inductor de Nrf2, también es capaz de actuar a este nivel como veremos en un apartado posterior.

- *Señales de localización (NLS) y de exclusión (NES) nuclear contenidas en Nrf2.* Ambas están en equilibrio en condiciones basales <sup>162,165-167</sup>. El estrés oxidativo inactiva una de estas NES por modificación de una cisteína reactiva en el dominio Neh5, lo que facilita la acumulación nuclear de Nrf2<sup>166</sup>. Por tanto, la función de sensor de estrés oxidativo de Keap1 permite la activación de Nrf2, mientras que los efectos directos del estrés oxidativo en Nrf2 podrían modular la velocidad, magnitud y duración de la respuesta antioxidante.
- *Regulación por fosforilación.* Estudios de señalización celular han sugerido que Nrf2 también puede estar regulado por procesos de fosforilación. Entre las cinasas descritas se encuentran la glucógeno sintasa cinasa 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), proteína cinasa C (PKC), las MAPK, etc. En cuanto a GSK3 $\beta$ , se ha descrito que esta es capaz de producir la exclusión nuclear e inactivación de Nrf2 <sup>168-170</sup>. Un gran número de estudios ha demostrado que GSK3 dirige la ubiquitinización y degradación proteasómica de varios factores de transcripción y de otras proteínas como Snail <sup>171</sup>,  $\beta$ -catenina <sup>172</sup>, Gli2 y Gli3 <sup>173-175</sup> entre otras. Según esto, GSK3 fosforila un grupo de residuos de Ser/Thr en las proteínas diana que forman una ubiquitina E3 ligasa completa, el proteasoma lo reconoce y lo degrada. En 2002 se postuló que la fosforilación en la serina 40 de Nrf2 por PKC producía la disociación de Nrf2 y Keap1 y regulaba la expresión de los ARE <sup>176</sup>. Un año después se demostró que dicha fosforilación no es necesaria para que Nrf2 se transloque al núcleo y que solo Nrf2 libre es fosforilado por esa cinasa. <sup>177</sup>. Otras proteínas cinasas, como las MAPKs como p38, ERK, JNK, Fyn, caseína cinasa 2 y la proteína cinasa del retículo endoplasmático se han implicado en la regulación de Nrf2 <sup>178-185</sup>. Además, la cascada de señalizaciones regulada por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) produce la despolimerización de los microfilamentos de actina, facilitando la translocación nuclear del Nrf2<sup>186</sup>.

Una vez en el núcleo, Nrf2 dimeriza con las proteínas sMaf (sMaf: MafG, MafK, y MafF) <sup>187-189</sup>. Se cree que las proteínas cap'n'collar (CNC) como Nrf2 necesitan asociarse a las sMaf para poderse unir a los ARE.

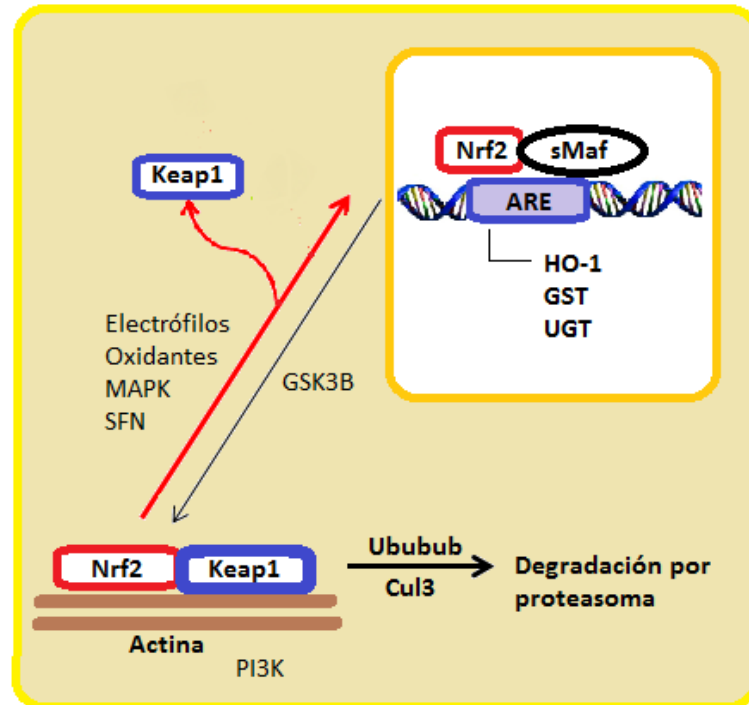


Figura 6. Regulación de Nrf2 para su activación y traslocación al núcleo.

### 2.5.3 Papel protector de Nrf2

La primera evidencia del papel de Nrf2 en protección contra estrés oxidativo proviene del estudio de Venugopal y Jaiswal de 1996 <sup>190</sup> en el que se demostró que la sobreexpresión del ADNc de Nrf1 y Nrf2 aumentaba la expresión de NQO1 (NAD(P)H Quinona-Oxidoreductasa) en respuesta a antioxidantes y xenobióticos. Este papel de Nrf2 se confirmó cuando se obtuvieron los primeros ratones genéticamente modificados y carentes de Nrf2 (-/-). Estos ratones tuvieron un desarrollo aparentemente normal, por lo que se descartó que Nrf2 fuera esencial para la eritropoyesis murina, el crecimiento o el desarrollo. Sin embargo, estos ratones no podía inducir la expresión de los genes responsables de la detoxificación de agentes carcinógenos y de protección contra el estrés oxidativo, en particular de los genes de fase II como los que codifican las enzimas NQO1, GLC (Glutamato Cisteina Ligasa), GST (Glutation S-Transferasa) y HO-1 (Hemo oxigenasa 1) <sup>191</sup>. En estudios más recientes se ha demostrado que Nrf2 también

contribuye a la actividad del proteasoma 26S, lo cual confirma la importante participación de Nrf2 en la protección contra el estrés oxidativo y los xenobióticos. Estudios recientes han demostrado que Nrf2 también está involucrado en la atenuación de la inflamación asociada a distintos procesos patogénicos como las enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, asma, enfisema, gastritis, colitis y la aterosclerosis <sup>186</sup>. Así, la interrupción o pérdida de la señalización por Nrf2 provoca una mayor susceptibilidad no sólo a estrés oxidativo y electrofílico, sino también a lesiones inflamatorias. Este efecto también se ha descrito en el Sistema Nervioso Central. La delección de Nrf2 provoca un aumento de marcadores inflamatorios y microgliales en el hipocampo de ratones tratados con LPS en comparación con ratones salvajes <sup>192</sup>. En ratones Nrf2 (-/-) se produce un aumento en la infiltración leucocitaria en cerebros afectado por hemorragia intracerebral <sup>193</sup>. Otro estudio publicado recientemente demuestra el papel crucial de Nrf2 en la modulación de la dinámica microglial y se apunta a Nrf2 como una diana molecular para controlar la función microglial en la enfermedad de Parkinson <sup>194</sup>. También se ha descrito que hay una exacerbación de las lesiones cerebrales en los ratones deficientes en Nrf2 después de una lesión traumática cerebral, posiblemente por una alteración en la regulación de los niveles de citocinas proinflamatorias <sup>195</sup>. Recientemente, el grupo de Maes ha postulado que Nrf2 podría significar una diana terapéutica frente a la depresión <sup>196</sup>, sin una demostración experimental de tal efecto. La hipótesis se basa en que Nrf2 es capaz de regular seis de las vías que están alteradas en la depresión como son la síntesis aumentada de citocinas proinflamatorias, alteración de la inmunidad celular, aumento de estrés oxidativo y nitrosativo, niveles disminuidos de mediadores antioxidantes (Zn, glutatión, etc.), daño mitocondrial y neurodegeneración <sup>196</sup>.

La activación de Nrf2 produce la inducción de varias proteínas citoprotectoras entre las que se encuentran las siguientes:

- *NAD(P)H quinona-oxidoreductasa (NQO1)*: cataliza la reducción y detoxificación de quinonas altamente reactivas que producen estrés oxidativo<sup>197</sup> a hidroquinonas.

- *Glutamato-cisteina ligasa catalítica (GCLc) y moduladora (GCLm)*: ambas forman un heterodímero que es el paso limitante en la síntesis de glutatión (GSH), cuyo papel antioxidante es fundamental para la homeostasis celular <sup>198</sup>. También participa en el metabolismo del glutamato.
- *Hemo oxigenasa-1 (HO-1)*: cataliza la ruptura del grupo hemo en el antioxidante biliverdina, el antiinflamatorio monóxido de carbono y hierro. HO-1 se ha descrito que protege frente a diversas patologías entre las que se encuentran la sepsis, hipertensión, aterosclerosis, daño pulmonar agudo y dolor <sup>199</sup>.
- *Glutathion S-transferasa (GST)*: es una familia de proteínas de localización citosólica, mitocondrial y microsomal que cataliza la conjugación de GSH con electrófilos endógenos y xenobióticos. La conjugación con GSH catalizada por la GST permite la eliminación de compuestos potencialmente tóxicos o dañinos para el organismo <sup>200</sup>.
- *UDP-glucuronosil transferasa (UGT)*: cataliza la glucuronización, es decir, la conjugación de un residuo de ácido glucurónico con distintas moléculas tanto exógenas como endógenas para hacerlas más solubles en agua y, por lo tanto, más fácilmente eliminables <sup>200</sup>. Este proceso constituye una de las principales reacciones de fase II del metabolismo de tóxicos.
- *Proteínas asociadas a resistencia a drogas*: son transportadores de membrana que movilizan distintos compuestos desde distintos compartimentos desde los órganos hasta la bilis o el plasma, lo que conlleva la excreción por las heces o la orina. Su regulación por Nrf2 se ha descrito que altera dramáticamente la cinética u toxicidad de diversos compuestos <sup>201,202</sup>.

Se han encontrado una gran cantidad de compuestos, tanto sintéticos como provenientes de la dieta, que activan de manera eficiente a Nrf2. Entre ellos están los inductores derivados de origen vegetal que incluyen el sulforafano que se encuentra en el brócoli y describimos en el párrafo siguiente, el 6-

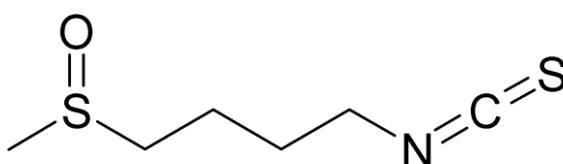
metilsulfinilhexilo en el rábano japonés wasabi (*Wasabia japonica*), el ester fenetilo del ácido caféico (CAPE, un componente fenólico del propolio de la miel de abeja) y la curcumina que es el principio activo del polvo de cúrcuma, un ingrediente esencial del curry.

#### 2.5.4 El sulforafano (SFN)

El sulforafano [1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil) butano] (Fig. 7) es un producto natural obtenido de las crucíferas del género *Brassica*, como el brócoli, las coles de Bruselas y el repollo. El interés en el estudio de esta molécula está aumentando debido a las evidencias que demuestran su efecto beneficioso sobre la salud por sus propiedades anticarcinogénicas y citoprotectoras en modelos *in vivo* e *in vitro*. Entre estos modelos se encuentra la isquemia cerebral focal, la inflamación cerebral, nefrotoxicidad inducida por cisplatino y hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono entre otros.

El SFN es capaz de activar la vía de señalización intracelular Nrf2-ARE de una manera muy potente<sup>38,45,203</sup> mediante un mecanismo dependiente de la rotura del complejo Nrf2-Keap1 al reaccionar el SFN con grupos tiol de Keap1<sup>204,205</sup>. Estas modificaciones específicas realizadas en Keap1, lo liberan de Nrf2 y así este último puede traslocarse al núcleo.

Sin embargo, el SFN posee otros mecanismos de acción. Por ejemplo, el SFN reduce la habilidad de NF- $\kappa$ B de unirse al núcleo, para lo que se han descrito dos mecanismos. El primero, consistiría en la interacción de SFN con residuos Cys de NF- $\kappa$ B fundamentales para su unión con el ADN<sup>206</sup>. El segundo, consistiría en un mecanismo indirecto a través de la interacción con distintos reguladores redox como son el glutatión, tioredoxina o Ref1 que interfieren con la habilidad de NF- $\kappa$ B de unirse al núcleo<sup>207</sup>. Además, el SFN tiene efecto sobre la apoptosis y el ciclo celular observado en modelos celulares de cáncer<sup>48</sup> e inhibe las histonas desacetilasas<sup>46,208</sup>



**Figura 7. Estructura química del sulforafano.**

La importancia de los efectos terapéuticos del SFN estudiados en animales le ha conducido a poner en marcha cuatro ensayos clínicos en los que se está estudiando su utilidad por su efecto sobre la activación de Nrf2 frente a fibrosis quística, asma y/o alergias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), entre otros (<http://www.clinicaltrials.gov>). Existen otros compuestos capaces de activar Nrf2 también en ensayos clínicos, como la bardoxolona de metilo para la insuficiencia renal y la diabetes tipo 2.

### **3. Hipótesis y objetivos**

---





El trabajo de esta tesis doctoral se encuadra dentro de uno de los proyectos realizados en el Instituto Teófilo Hernando de I+D de medicamentos, uno de cuyos objetivos es la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y de principios activos con potencial efecto terapéutico frente a distintas enfermedades.

**Hipótesis de trabajo.**

El factor de transcripción Nrf2 participa en procesos inflamatorios, suponiendo una defensa frente a este tipo de estímulos. Por otro lado, la depresión se ha descrito como una alteración cuyo origen puede ser debido a la inflamación en un subgrupo de pacientes. Así nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente:

*La regulación del factor de transcripción Nrf2 puede suponer una herramienta farmacológica frente a trastornos depresivos en los que exista un componente inflamatorio.*

**Objetivos.**

Para establecer una relación entre Nrf2 y depresión nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar si la delección del factor de transcripción Nrf2 en ratones C57 supone la aparición de un fenotipo depresivo. Estudiarlo a nivel de comportamiento y a nivel molecular.
2. Demostrar que el fenotipo depresivo de los ratones Nrf2 (-/-) es debido a un aumento de parámetros inflamatorios.
3. Evaluar si el sulforafano (SFN), inductor de Nrf2, tiene efecto antidepresivo en un modelo de depresión de origen inflamatorio producido por LPS.
4. Comprobar si el SFN ejerce un efecto antidepresivo en un modelo de depresión inducido por estrés crónico suave.

## **4. Materiales y métodos**

---



## 4.1 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 macho salvajes y con ablación del gen que codifica para Nrf2 (3 - 4 meses, 27-30 g) y ratones Swiss machos (3-4 meses, 30-40 g) los cuales fueron mantenidos a 24 °C con un ciclo luz-oscuridad de 12 h. Los alimentos y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Sanitario La Paz - Instituto de Investigación IdiPAZ, para el cuidado y uso de animales en investigación, de acuerdo con el Consejo de la Comunidad Europea, de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE), y con el Real Decreto de 10 de octubre de 2005 (RD 1201/2005). (Ver anexo 1). Se hicieron todos los esfuerzos por minimizar el sufrimiento de los animales.

## 4.2 Fármacos y tratamientos

El rofecoxib (Toronto Research Chemicals, Canadá) se disolvió en solución salina y se administró por vía intraperitoneal (ip). Se administró en un volumen constante de 10 mL/kg una vez al día durante siete días en una dosis fija de 2 mg/kg. La dosis de rofecoxib fue elegida en base a estudios previos<sup>209,210</sup>. Veinticuatro horas después de la última administración de rofecoxib se llevaron a cabo la prueba de suspensión de la cola, la prueba de sacarosa o la prueba del campo abierto. Finalmente, los animales fueron sacrificados bajo anestesia profunda con isoflorano.

El R, S-sulforafano [(SFN), Laboratorios LKT, Minnesota, EEUU] y el LPS (serotipo O26: B6, Sigma St. Louis, MO, EEUU) se prepararon en solución salina justo antes de su uso. Los ratones recibieron sulforafano (1 mg/kg) durante 7 días consecutivos y al día siguiente se les administró LPS (0,1 mg/kg). Estos compuestos se administraron por vía ip. Una vez que el procedimiento experimental se completó, los animales fueron sacrificados bajo anestesia profunda con isofluorano. Para los experimentos de estrés crónico suave, el SFN se administró vía ip a una dosis de 1 mg/kg/día durante las últimas 5 semanas del protocolo.

## 4.3 Comportamiento

### 4.3.1 Prueba de la natación forzada (PNF)

El método utilizado fue desarrollado por Porsolt en 1977<sup>211</sup> con algunas modificaciones descritas posteriormente<sup>200</sup>. Todas las manipulaciones fueron realizadas entre las 9:00 y 14:00 h. Los ratones fueron forzados individualmente a nadar en un cilindro abierto (diámetro 10 cm, altura 25 cm), con 19 cm de agua a  $25 \pm 1$  °C. Se midió el tiempo total de inmovilidad en un periodo de 6 min. El animal fue considerado inmóvil cuando flotaba o hacía los movimientos necesarios para mantener su cabeza por encima del agua. Los antidepresivos reducen el tiempo de inmovilidad en este prueba<sup>204</sup>.

### ***4.3.2 Prueba de suspensión de la cola (PSC)***

La PSC se ha convertido en uno de los modelos más utilizados para evaluar antidepresivos en roedores. La prueba se basa en que los animales sometidos al estrés inevitable de ser suspendidos por la cola desarrollarán una postura inmóvil. La duración total de la inmovilidad se midió según el método descrito por Steru et al.<sup>212</sup>. Resumidamente, se suspendieron los ratones a 50 cm del suelo con cinta adhesiva colocada aproximadamente a 1 cm de la punta de la cola. Los ratones se mantuvieron aislados tanto visual como sonoramente. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad durante un período de 6 minutos. Los ratones se consideraron inmóviles cuando permanecían completamente pasivos y en ausencia de movilidad.

### ***4.3.3 Prueba del vaporizador de sacarosa (PVS)***

La PVS se realizó según un protocolo descrito previamente con algunas modificaciones<sup>213</sup>. La prueba consistió en pulverizar una solución de sacarosa al 1 % en el lomo de un ratón colocado en un cilindro de vidrio de 14 cm de diámetro. La solución de sacarosa ensucia y endulza la piel del ratón; así, los animales inician un comportamiento de acicalamiento. Este método de evaluación consiste en contabilizar el tiempo que el animal se acicala durante 6 min después de aplicar la solución de sacarosa. Este tiempo es un índice de motivación y ausencia de capacidad de sentir placer (anhedonia).

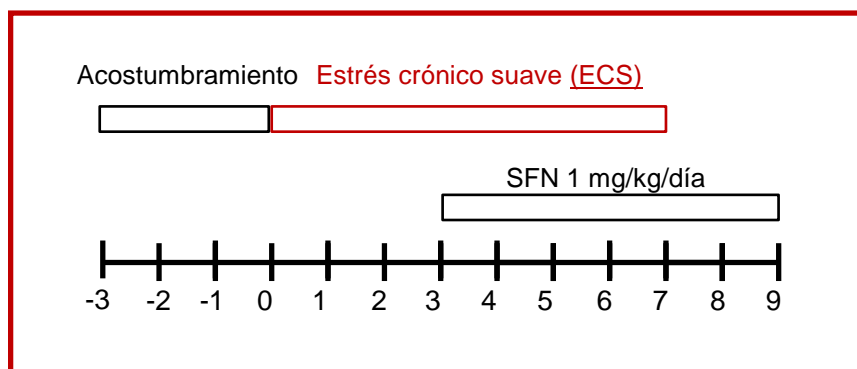
### ***3.3.4 Prueba de campo abierto (PCA)***

Para excluir la posibilidad de que un eventual efecto depresivo (es decir, un aumento de la inmovilidad en la PNF o PSC) sea debido a una disminución en la actividad locomotora, los ratones fueron sometidos a la prueba del campo abierto tal como se ha descrito previamente en la literatura<sup>200</sup>. La prueba se realizó en una caja de plástico opaco de 40x60x50 cm con el suelo dividido en 9 cuadrados iguales. Los parámetros utilizados para evaluar la actividad locomotora fueron el número de cruzamientos y de levantamientos realizados durante los 6 minutos que dura la prueba.

## 4.5 Estrés crónico suave (ECS)

Se siguió el protocolo descrito por Elizalde et al. con ligeras modificaciones<sup>135</sup>. Después de un periodo de adaptación de quince días, se individualizó a los animales y se les acostumbró al consumo de sacarosa. Para ello, se colocaron dos botellas de bebida una con agua y la otra con una solución acuosa de sacarosa al 2,5 % dos o tres veces a la semana durante tres semanas. Después de esta fase preliminar de acostumbramiento, para realizar la monitorización semanal de la anhedonia, se sometió a los animales a privación de comida la vez que se les exponía a la solución de sacarosa manteniendo el agua de bebida. La posición de las dos botellas (izquierda/derecha) se varió semanalmente. Se estableció el consumo basal de sacarosa mediante la media de consumo de tres semanas. La cuantificación de la respuesta anhedónica se realizó mediante el cálculo del consumo de sacarosa relativo, es decir, el consumo de sacarosa entre el peso corporal, ambos expresados en gramos.

Tras las tres primeras semanas de evaluación del consumo de sacarosa, los animales fueron repartidos en dos grupos con valores similares de peso corporal y consumo de sacarosa antes de comenzar el protocolo de estrés crónico suave: ECS y controles no estresados). Al finalizar las tres primeras semanas de inducción de estrés, ambos grupos fueron divididos nuevamente en dos (tratados con sulforafano y sin tratar) de manera que los grupos quedaron distribuidos de la siguiente manera: salino, SFN, ECS y ECS + SFN. El SFN se administró una vez al día por administración intraperitoneal durante seis semanas. De esta manera coincidieron las cuatro últimas semanas de estrés con administración del fármaco y las últimas dos semanas solamente se les administró fármaco o salino pero esta vez sin estímulos estresantes (Fig 6).





---

**Figura 8: Protocolo de estrés crónico suave para la evaluación del sulforafano como antidepresivo.**

El procedimiento de estrés crónico suave consistió en la aplicación de dos o tres de los siguientes estímulos estresantes durante siete semanas <sup>135</sup>: luz estroboscópica (8 h), pitido intermitente (10 db 1 s/10 s) o sonido blanco (4 h), inclinación de la jaula a 45 grados (8 h), cama húmeda (6 h), emparejamiento (2 h), iluminación nocturna, eliminación de serrín (12 h) y confinamiento (1 h). Se evaluó la respuesta anhedónica mediante la monitorización semanal del consumo de sacarosa de 18.00 a 9.00, tiempo durante el cual no se aplicó ningún estímulo estresante.

#### **4.6 Prueba del Rota-Rod**

Para evaluar el posible efecto estimulador o inhibidor del sulforafano, sometimos a los ratones a la prueba del Rota-Rod. Esta prueba consistió en colocar a sujeto de experimentación en un cilindro rotatorio primero a velocidad constante hasta que el sujeto en cuestión aguantase dos minutos sin caerse a 4 rpm/min. Pasado el periodo de aprendizaje, se volvió a colocar al animal en el cilindro, esta vez con una velocidad inicial de 4 rpm con una aceleración uniforme de 1 rpm/8 s. Se contabilizó el tiempo que el animal aguantó sin caerse en el cilindro rotatorio.

#### **4.7 Western blot (WB)**

Los hipocampos y las cortezas se lavaron una vez con tampón fosfato frío y se lisaron con tampón de lisis (1 % de glicerol, 10 % Nonidet P-40, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mg/mL leupeptina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 20 mM NaF, 1 mM NaPPi, y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). La proteína (40 g) de estos lisados celulares se resolvió por electroforesis en gel con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Amersham). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos descritos en la tabla 4. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (1:10000) para detectar las proteínas mediante quimioluminiscencia.

## **4.8 Inmunofluorescencia de GFAP e Iba1**

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y perfundidos transcardíacamente con solución salina seguida de una solución fijadora recién preparada consistente en paraformaldehído 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Los cerebros fueron extraídos y sumergidos en el mismo fijador a 4 °C, incluidos en parafina y seccionados en un micrótopo rotatorio (RM2255, Leica, Wetzlar, Alemania) en secciones de 10 micras. Después de desparafinar y rehidratar las secciones, se sumergieron en tampón citrato 0,01 M, pH 6,0 y se hirvieron durante 20 minutos. Las secciones fueron bloqueadas con un 10% suero normal de cabra y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios (anti-GFAP y anti-Iba1). Los cortes fueron incubados finalmente con el anticuerpo secundario conjugados con un fluorocromo (Alexa 488 y Rodamina) y con Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA) como contratinción. Se incubaron los cortes sin los anticuerpos primarios (control negativo). Los cortes fueron montados y analizados en un microscopio confocal (TCS SPE, Leica, Wetzlar, Alemania).

**Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados, diluciones, casas comerciales y técnica en la que se usó**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Uso</b>
anti-fosfo-Ser-9-GSK3 $\beta$	1:1000	Cell Signaling	WB
anti- $\beta$ -actina	1:100000	Sigma	WB
anti-VEGF	1:1000	Sigma	WB
Anti-sinaptofisina	1:1000	Sigma	WB
anti-BDNF anti-proBDNF	1:1000	Santa Cruz	WB
anti-GR	1:1000	Santa Cruz	WB
anti-mouse	1:10000	Santa Cruz	WB
anti-rabbit	1:10000	Santa Cruz	WB
anti-HO-1	1:1000	Chemicon	WB
Anti-GCLm	1:1000	Generado	WB
anti-iNOS	1:1000	BD Biosciences	WB
anti-GSK3 $\beta$	1:1000	BD Biosciences	WB
anti-GFAP	1:500	Chemicon	IF
anti-F4/80	1:1000	Santa Cruz	WB
Rodamina anti-rabbit	1:100	Jackson ImmunoResearch	IF
Alexa 488-anti-mouse	1:100	Invitrogen	IF

## **4.9 Análisis de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real**

El ARN total se extrajo del tejido utilizando el reactivo TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se trató un microgramo de ARN de las diferentes muestras con ADNsa (Invitrogen) y se realizó la transcripción inversa durante 30 min a 42 °C con 4  $\mu$ L el tampón *High capacity ARN-to-cADN Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para el análisis por qPCR, la reacción se realizó en 25  $\mu$ L con la sonda fluorescente *Power SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU) y una mezcla de 5 pmol de

cebadores directos y reversos. Las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla II.

**Tabla 5. Genes y cebadores para amplificación por qPCR**

<b>Producto génico</b>	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador reverso</b>
Mac-1	5' TCGATTAACCCGPCAAAGTACAAA 3'	5' TTTTTCCTTGCCTTGGTTTT 3'
F4/80	5' TGCCTTACAACCTATGAAGCTCCAC 3'	5' ACACCAGAAGAAAGTGCATAGGAA 3'
β-actina	5' TCCTTCCTGGGCATGGAG 3'	5' AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT 3'

La cuantificación se realizó en un sistema de detección de StepOne (Applied Biosystem, Foster City, CA). Para los ciclos de la qPCR se realizaron los siguientes pasos: desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, luego 40 ciclos de desnaturalización (15 s, 95 °C), hibridación (30 s, 60 °C), y extensión (30 s, 60 °C). El análisis de la ‘*melting curve*’ mostró la especificidad de la amplificaciones. El análisis de datos se basa en el método de  $\Delta\Delta C_t$  normalizando los datos respecto al del gen constitutivo β-actina en la misma muestra como se describe en el manual del fabricante (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **4.10 Determinación de aminas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Las concentraciones de dopamina, serotonina y sus metabolitos, ácido dihidroxifenil acético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica. Para ello nos basamos en un método descrito por Perez-Otaño et al.<sup>203</sup>. La cuantificación de las concentraciones se realiza sobre la base de patrones de concentración conocida y como patrón interno se utilizó dihidroxibencilamina.

Las muestras de tejido, una vez pesadas, se homogenizan por sonicación (Branson Sonifier, 140) en 20 volúmenes del siguiente líquido de extracción<sup>214</sup> denominado PCA: 0,4N ácido perclórico, 1mM EDTA, 0,1% metabisulfito sódico. El sonificado se centrifuga a 12.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos en una microcentrífuga

Heraeus (modelo Biofuge B). Se decanta el sobrenadante y se pinchan 20  $\mu\text{L}$  en el HPLC.

El equipo cromatográfico consiste en:

- Bomba de alta presión (Waters 515).
- Inyector automático (Waters 712 Wisp), dotado de una unidad de refrigeración.
- Pre-columna (Spherisorb ODS2, tamaño de partícula 10  $\mu\text{m}$ ).
- Columna de fase reversa (Spherisorb ODS 2, 25 x 0,46 cm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ).
- Detector amperométrico (Digital Electrochemical Amperometric Detector, DECADE).
- Estación de datos (Millenium 32 Versión 3.05.01).

Como base para la preparación de fase móvil se utiliza un tampón citrato-fosfato y metanol. Mediante variaciones en el porcentaje de metanol, pH y contenido en ácido octansulfónico se modifican los tiempos de retención de los diferentes componentes.

La composición de la fase móvil utilizada es la siguiente: 0,1M fosfato disódico; 0,1 M ácido cítrico; 0,74 mM ácido octansulfónico; 1 mM EDTA; 14 % metanol. Esta solución se ajusta a pH 3.

La separación cromatográfica se realiza de forma isocrática a un flujo constante de 1 mL/min y el potencial de oxidación se mantiene a 650 mV. La sensibilidad para la detección de las aminos en la corteza y en el hipocampo es de 20 nA.

#### **4.11 Determinación de GABA y glutamato por HPLC**

Las concentraciones de glutamato y GABA se determinan mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica. Para ello nos basamos en un método descrito por Roettger et al. <sup>215</sup>. Los niveles de glutamato y GABA fueron calculados mediante comparación con estándares (5 ng).

Las muestras de tejido, una vez pesadas, se homogenizan por sonicación (Branson Sonifier, 140) en 100 volúmenes de una solución de tetraborato de sodio 0.1 M pH=9. El sonicado se centrifuga a 12.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos en una microcentrífuga Heraeus (modelo Biofuge B). Se decanta el sobrenadante y se pinchan 10 µL en el HPLC.

El equipo cromatográfico consiste en:

- Bomba de alta presión (Waters 515). Flujo 1,4 mL/min
- Inyector automático (717 plus Autosampler), dotado de una unidad de refrigeración.
- Columna (Biophase ODS, tamaño de partícula 5 µm, 4,6 mm x 25 cm).
- Detector amperométrico (Digital Electrochemical Amperometric Detector, DECADE (Antec-Leyden).
- Estación de datos (Millenium 32 Versión 3.05.01).

Los niveles de glutamato y GABA se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (Waters Spheribor® 5µ ODS2 4.6x150 mm).

Las muestras fueron sonicadas en una solución de tetraborato de sodio 0,1 M, pH 9,1 (1 mg tejido/100 µL) y centrifugados a 12000 rpm a 4 °C, de lo que se conserva el sobrenadante.

Se utiliza una precolumna para su derivatización con o-ftalaldeido (OPA) y β-mercaptoetanol (BME) con el fin de poder cuantificarlos con un detector amperométrico. La preparación de la solución OPA-BME se hizo de la siguiente manera: 9 mL de bufer tetraborato de sodio 0,1 M pH 9,1; 1 mL de OPA (27 mg/mL de etanol) ; 11 µl de solución BME ( 10 µl BME en 90 µl de tetraborato de sodio).

La fase móvil utilizada fue una mezcla de tampón fosfato (0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5) y metanol en proporciones 72/28 (V/V). El inyector se programó para mezclar la solución OPA-BME con el estándar o la muestra en proporción 1:1 .A continuación se dejó reaccionar durante 1,5 min tras lo cual la muestra se inyecta en la columna.

El potencial de trabajo del electrodo se estableció a 0,7 V, sensibilidad 50 nA y temperatura del horno que contiene la columna se programa a 40 °C. Los resultados se expresan en pg/mg de tejido.

#### **4.12 Análisis estadístico**

Todos los resultados experimentales se expresan como media  $\pm$  EEM. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante t de Student, U de Mann-Whitney, ANOVA de una vía seguida de Newman-Keuls o ANOVA de dos vías seguida de Bonferroni según el caso. Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado significativo. En caso de presencia de interacción entre grupos experimentales en el análisis de ANOVA de dos vías, se procedió a analizar los resultados mediante t de Student o U de Mann-Whitney. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5 para Windows.





## **5. Resultados**

---

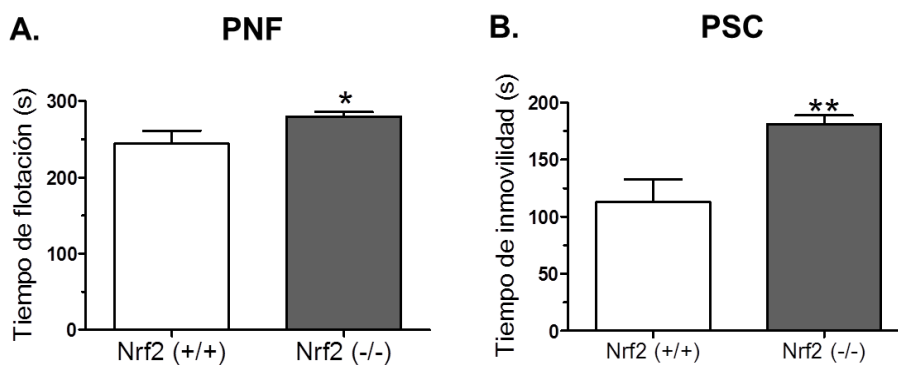


Descritos ya los antecedentes bibliográficos y la metodología a utilizar, en esta sección describimos los principales resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis doctoral.

## **5.1 Los ratones Nrf2 (-/-) presentan un comportamiento depresivo**

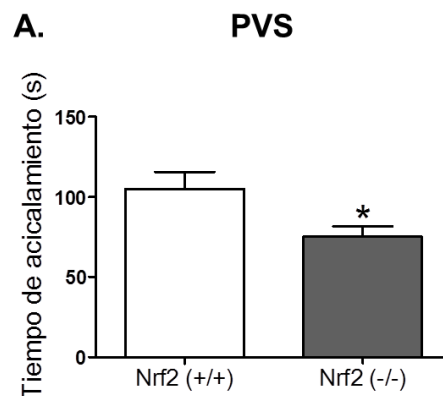
Basándonos en los siguientes dos hechos: (i) que existen datos de la literatura de los últimos 25 años que relacionan la inflamación con la depresión y (ii) que el factor de transcripción Nrf2 se relaciona con el control de la inflamación, nos planteamos la hipótesis de que Nrf2 podría estar participando en la patogénesis de la depresión. Para demostrar este primer objetivo, realizamos distintas pruebas de comportamiento que se emplean comúnmente en estudios de depresión y se describen a continuación.

Las pruebas de la natación forzada (PNF) y de la suspensión de la cola (PSC) son pruebas ampliamente utilizadas y aceptadas para la evaluación de la conducta depresiva o antidepresiva. Estas pruebas se basan en la ausencia de lucha cuando se somete a los animales a situaciones incómodas de la que tienden a intentar escapar. Así, cuando se les obliga a nadar (PNF), el ratón que abandona antes la actividad natatoria y permanece flotando inmóvil se considera que presenta un comportamiento depresivo. En la prueba de suspensión de la cola (PSC) ocurriría algo similar, solo que el animal permanecería colgado inmóvil. Al realizar estas dos pruebas observamos que los ratones Nrf2 (-/-) presentaron un aumento de un 20 % en el tiempo de flotación en la PNF (Fig. 9 A) y del 60% en la PSC (Fig. 9 B).



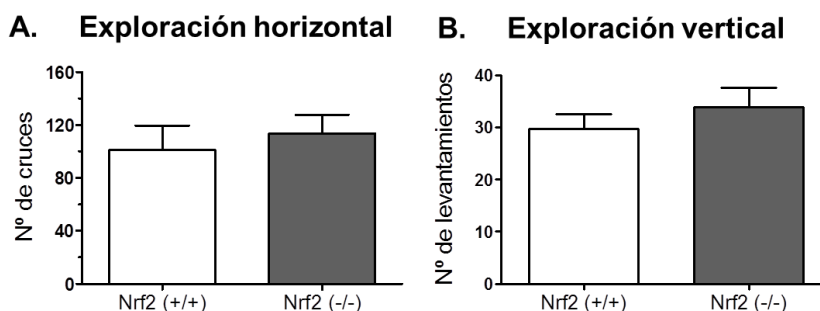
**Figura 9. Los ratones Nrf2 (-/-) presentan un fenotipo depresivo.** Ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-) se sometieron a la prueba de natación forzada (PNF) (A) y a la de suspensión de la cola (PSC) (B). Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). El símbolo \*\* representa  $p < 0,01$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba estadística utilizada: t de Student.

Otra de las características observadas en trastornos depresivos es la ausencia de capacidad para disfrutar de estímulos que normalmente son placenteros (anhedonia) y la falta de cuidado/aseo personal. Estas dos características se pueden estudiar mediante la prueba del vaporizador de sacarosa (PVS). En esta prueba se mide el tiempo de acicalamiento después de rociar el lomo del animal con una solución de sacarosa al 1 %. Los ratones Nrf2 (-/-) presentaron una reducción del 30 % en el tiempo de acicalamiento en comparación con los ratones controles; esta observación se interpreta como presencia de anhedonia y disminución de la higiene en los ratones nulos para Nrf2 (Fig. 9).



**Figura 10. Los ratones Nrf2 (-/-) presentan anhedonia.** Ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-) se sometieron al prueba de la sacarosa. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba estadística utilizada: t de Student.

Sin embargo, tanto la PNF como la PSC pueden presentar un falso positivo si la actividad locomotora se encuentra alterada. Así, una menor actividad locomotora produciría una disminución del tiempo de flotación y del tiempo de inmovilidad. Para descartar un posible falso positivo se realizó la prueba de campo abierto (PCA) contabilizando el número de cruces de las líneas dibujadas en el fondo del cajón donde se realizan las pruebas (véase sección de materiales y métodos 4.3.4). Además, se contó el número de veces que el animal se levantaba sobre las patas traseras, como indicador de exploración vertical. Ni los ratones Nrf2 (+/+) ni (-/-) presentaron alteración ni en la actividad motora horizontal (Fig. 11 A) ni en la vertical (Fig. 11 B).

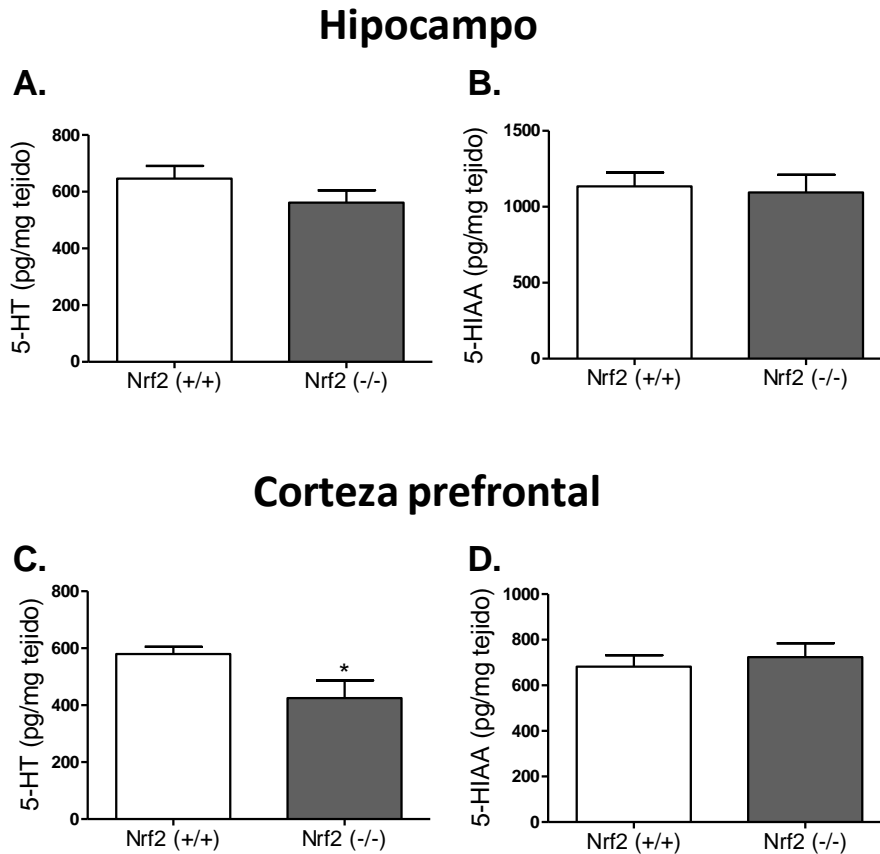


**Figura 11. Los ratones Nrf2 (-/-) no presentan alteraciones locomotoras.** Ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-) se sometieron al prueba del campo abierto. **A** muestra la exploración horizontal y **B** la exploración vertical. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7). Prueba estadística utilizada: t de Student.

## **5.2. La ablación de Nrf2 conduce a una modificación de los niveles de neurotransmisores**

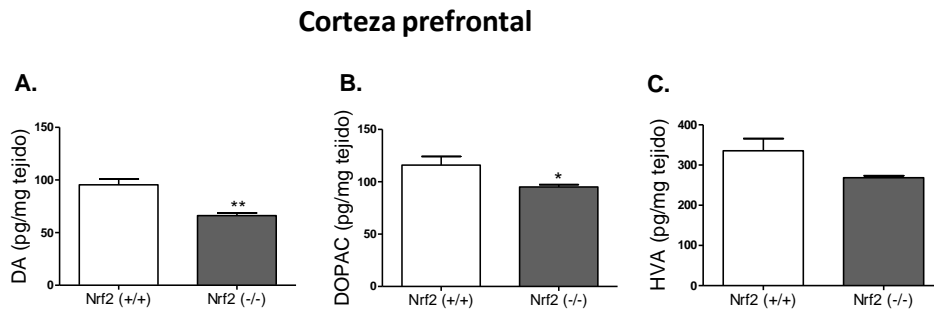
Una de las primeras teorías que trataron de explicar el origen de la depresión fue la teoría monoaminérgica en la que los niveles de 5-HT se encontrarían disminuidos. Posteriormente, se describió que existe también una disminución en la dopamina, además de un aumento del glutamato y una disminución del GABA. Por ello, se decidió medirlos en dos de las zonas cerebrales afectadas en la depresión como son la corteza prefrontal y el hipocampo.

En la figura 12 C se puede observar que la concentración de 5-HT está disminuida en homogenados de corteza prefrontal de los ratones Nrf2 (-/-) en comparación con sus controles. Sin embargo, no se observó esta disminución en el hipocampo. (Fig 12 A). Por otro lado, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), uno de los metabolitos de 5-HT, no sufrió modificación alguna. (Fig 12 B y D).



**Figura 12. Los ratones Nrf2 presentan una disminución de 5-HT en la corteza prefrontal.** Se disecaron tanto las cortezas prefrontales como los hipocampos de ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). Tras la extracción de las monoaminas de los tejidos, se analizaron los homogenados mediante HPLC-EQ para la detección de 5-HT (**A** y **C**) y 5-HIAA (**B** y **D**). Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7-8). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba estadística utilizada: t de Student.

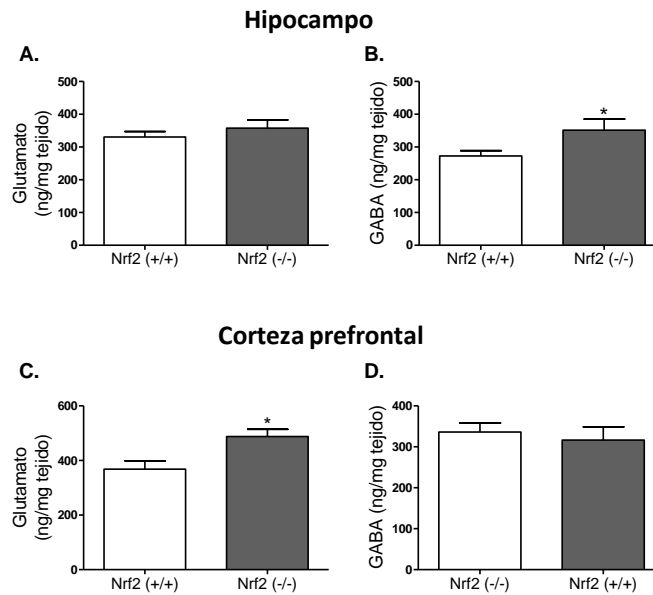
Además del metabolismo de 5-HT, también estudiamos los niveles de dopamina (DA), del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y del ácido homovanílico (HVA). Como se observa en la figura 13 A, B y C tanto la DA como sus metabolitos el DOPAC y el HVA se encontraron disminuidos en la corteza prefrontal en un 30 %, 20 % y 20 % respectivamente a pesar de la ausencia de significancia estadística en el caso del HVA. Con el método utilizado, no se detectaron niveles de DA ni DOPAC en el hipocampo.



**Figura 13. Los ratones Nrf2 (-/-) presentan una disminución de DA, DOPAC y HVA en la corteza prefrontal.** Se disecaron las cortezas prefrontales de ratones C57BL/6 salvajes y nulos para Nrf2. Tras la extracción de las monoaminas de los tejidos, se analizaron los homogenados mediante HPLC-EQ para la detección de DA (A), DOPAC (B) y HVA (C). Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7-8). El símbolo \*\* representa  $p < 0,01$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba estadística utilizada: t de Student.

Finalmente, se estudiaron los niveles de los aminoácidos glutamato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo de los ratones salvajes y Nrf2 (-/-). En los ratones con ablación de Nrf2 hubo un aumento de GABA en el hipocampo (Fig 14 B) y un aumento de glutamato en la corteza prefrontal en comparación con los niveles detectados en ratones C57BL/6 controles (Fig 14 C). No se observaron modificaciones en la concentración de glutamato en el hipocampo ni de GABA en la corteza (Fig. 14 A y D)





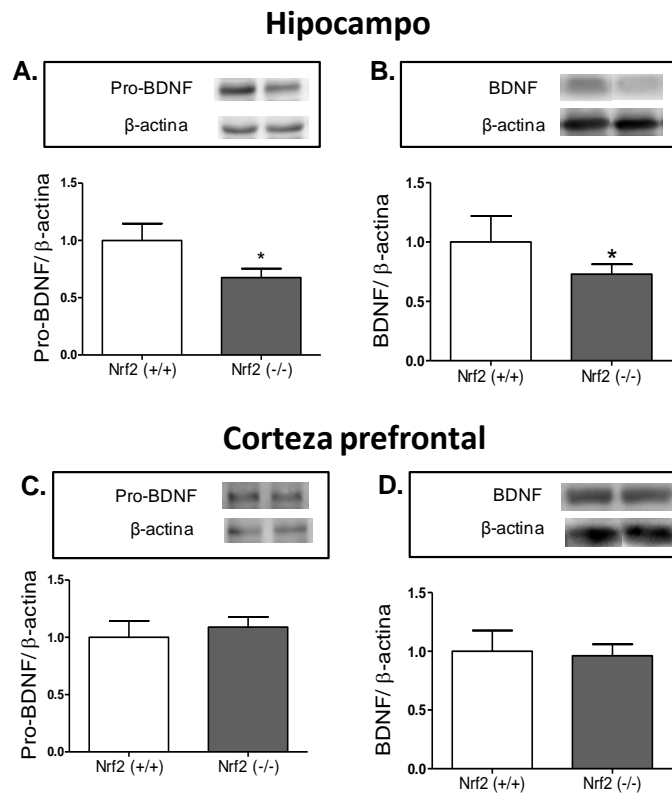
**Figura 14. Los ratones Nrf2 (-/-) muestran un aumento de GABA en el hipocampo y de glutamato en la corteza prefrontal.** Se disecaron las cortezas prefrontales y los hipocampos de ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). Tras la extracción de los aminoácidos de los tejidos, se analizaron los homogenados mediante HPLC-EQ para la detección de glutamato (A y C) y GABA (B y D). Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7-8). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba estadística utilizada: t de Student.

### 5.3 Disminución de la neuroplasticidad en ratones Nrf2 (-/-)

Una vez demostrado el comportamiento depresivo y la alteración de los neurotransmisores de los ratones Nrf2 (-/-), estudiamos otros parámetros que se encuentran alterados en modelos de depresión y en pacientes que sufren esta enfermedad. La alteración de la neuroplasticidad dio origen, como ya se ha explicado en la introducción (apartado 2.2.2), a otra de las teorías que intentan explicar la etiología de la depresión. Por lo tanto, se evaluó si factores neurotróficos como BDNF o VEGF podrían estar alterados en estos animales.

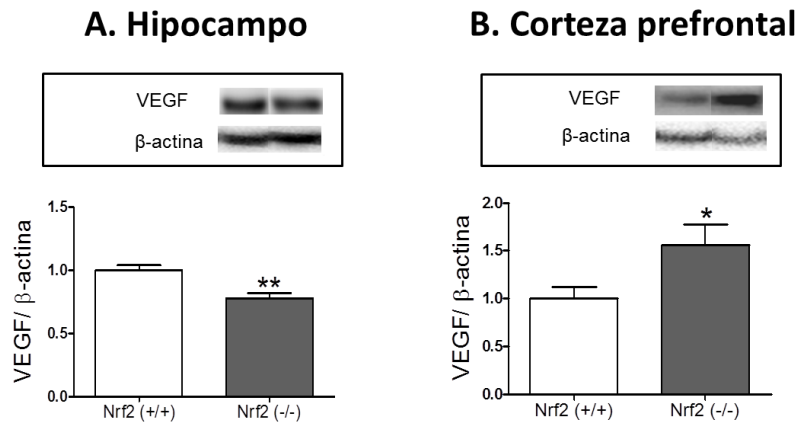
Como se puede observar en la figura 15, los niveles de pro-BDNF y BDNF se encontraron disminuidos en el hipocampo de los ratones Nrf2 (-/-) en comparación con sus controles (Fig. 8 A y B), ambos en

aproximadamente un 30 %. Sin embargo, no se observaron estas alteraciones en la corteza prefrontal (Fig. 15 C y D).



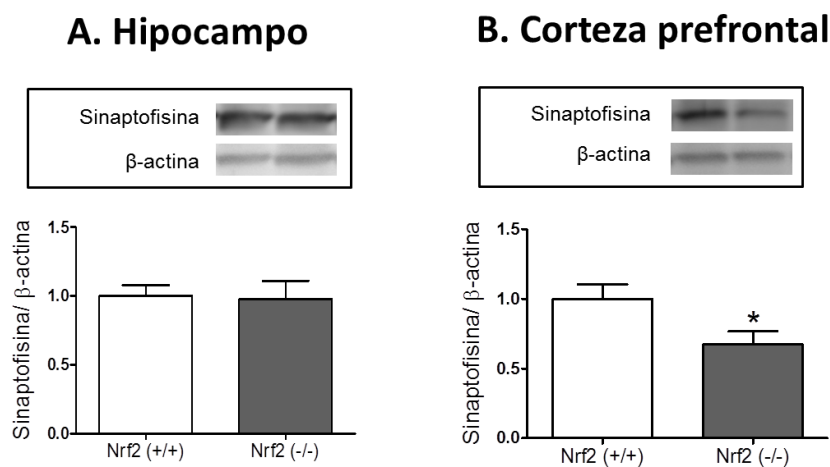
**Figura 15. Los ratones Nrf2 (-/-) presentan disminución en la expresión de pro-BDNF y BDNF.** Se estudió la expresión del factor trófico BDNF por WB en ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). **A** y **B** representan los niveles de pro-BDNF y de BDNF, respectivamente, en el hipocampo. **C** y **D** representan los niveles de pro-BDNF y de BDNF en la corteza prefrontal. Las imágenes que acompañan a los gráficos son un ejemplo representativo de los WB realizados para cada proteína en la parte superior y la β-actina como control de carga en la parte inferior. Las barras representan la media ± EEM (n=7-11). La barra con el símbolo \* representa p<0,05 vs. Nrf2 (+/+). Prueba utilizada: t de Student.

Seguido de esto, se midió medimos la expresión de VEGF en el hipocampo y en la corteza prefrontal. Nuevamente, se observó una disminución de un 20 % en los niveles de VEGF en el hipocampo (Fig 16 A). Curiosamente, la expresión de VEGF fue mayor en los ratones Nrf2 (-/-) en la corteza prefrontal en comparación con los ratones salvajes; esta diferencia fue de un 60 % (Fig. 16 B).



**Figura 16. Los ratones Nrf2 (-/-) presentan una disminución en la expresión de VEGF en el hipocampo y un aumento en la corteza prefrontal.** Se estudio la expresión de VEGF por WB en ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). En (A) se representa los niveles de VEGF en el hipocampo y en (B) en la corteza prefrontal. Las imágenes que acompañan a los gráficos son un ejemplo representativo de los WB realizados para cada proteína en la parte superior y la  $\beta$ -actina como control de carga en la parte inferior. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n=7). La barra con el símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). La barra con el símbolo \*\* representa  $p < 0,01$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba utilizada: t de Student.

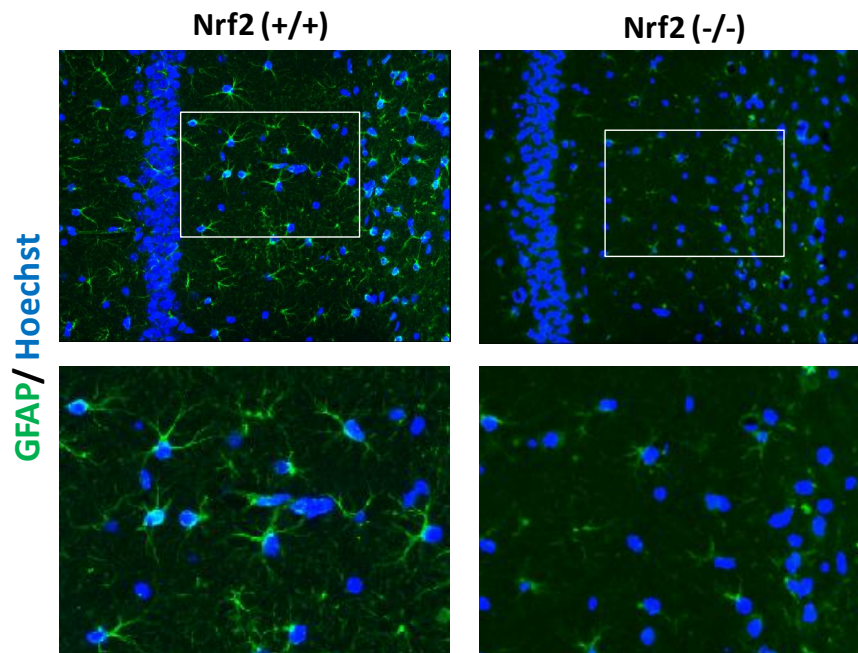
Otro marcador muy estudiado dentro del contexto de la neuroplasticidad es la sinaptofisina. La sinaptofisina es un marcador presináptico relacionado con la liberación de neurotransmisores<sup>216</sup>. Al estudiar su expresión por WB, encontramos una disminución de un 30 % en la zona de la corteza prefrontal y no se halló alteración en el hipocampo (Fig. 17 A y B).



**Figura 17. Alteraciones en los niveles de sinaptofisina en ratones salvajes y Nrf2 (-/-).** Se estudio la expresión sinaptofisina por WB en ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). En (A) se representa los

niveles sinaptofisina en el hipocampo y en **(B)** en la corteza prefrontal. Las imágenes que acompañan a los gráficos son un ejemplo representativo de los WB realizados para sinaptofisina en la parte superior y para  $\beta$ -actina como control de carga en la parte inferior. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n= 7-12). La barra con el símbolo \* representa  $p>0,05$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba estadística utilizada: t de Student.

Viendo que los factores neurotróficos se encuentran alterados en el hipocampo y que los astrocitos suponen uno de los principales sintetizadores de factores tróficos en el SNC, realizamos una inmunotinción frente a GFAP, un marcador astrocitario y se contratiñeron los núcleos con Hoechst (azul). Como se puede observar en la siguiente figura (Fig. 18), el marcaje de GFAP (verde) en los ratones Nrf2 (-/-) fue menos intenso y los astrocitos presentaron menos prolongaciones, siendo éstas más cortas; el conjunto de estas características son compatibles con una atrofia astrocitaria y explicaría la disminución de factores tróficos observados en este área. En la figura se muestra la zona CA1 del hipocampo, aunque se observaron los mismos resultados tanto en la zona CA3 como en el giro dentado.

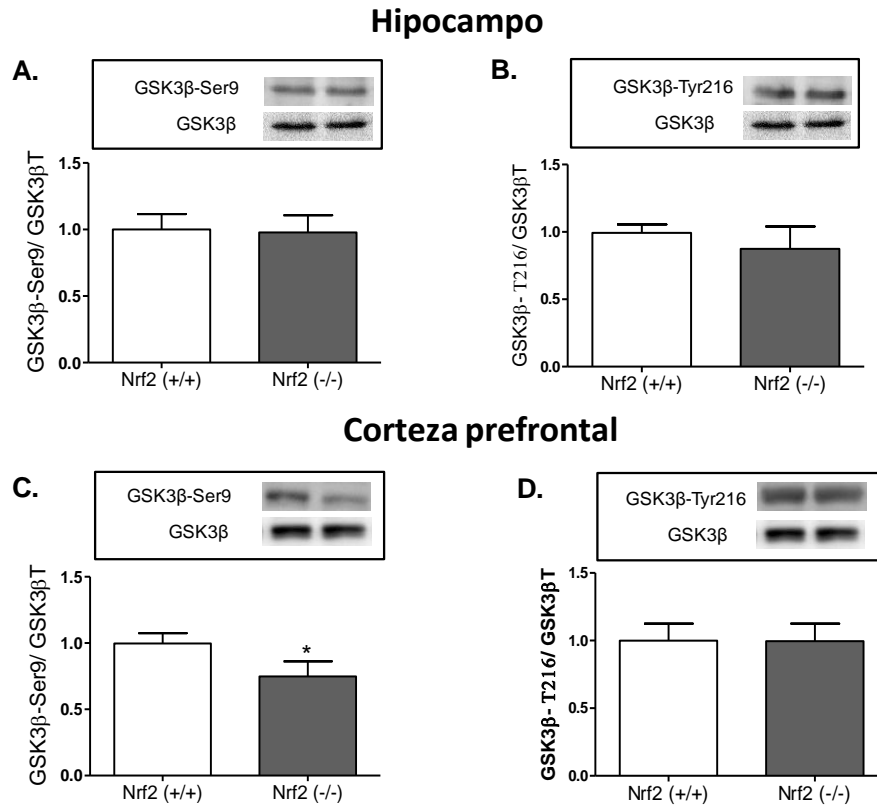


**Figura 18. La delección del gen de Nrf2 produce atrofia astrogliar en el hipocampo.** Se realizó una inmunofluorescencia frente a GFAP (verde) en la región CA1 del hipocampo. Los tejidos se marcaron con Hoechst como contratinción (azul). Las imágenes superiores representan microfotografías a 20X aumentos. En la parte izquierda se representan las imágenes de los ratones salvajes y en la derecha las imágenes de los Nrf2 (-/-). Las imágenes inferiores representan un aumento de las imágenes inmediatamente superiores. Resultados similares se obtuvieron en otros 3 animales de cada grupo.

## 5.4 Aumento de la actividad de GSK3 $\beta$ en los ratones Nrf2 (-/-)

Además de la neuroplasticidad, otro parámetro muy estudiado en la depresión es la cinasa de señalización intracelular GSK3 $\beta$  desde que se describiera que el estabilizador del humor litio era un inhibidor de esta enzima. Además se ha descrito que es una diana de las rutas de señalización activadas por receptores serotoninérgicos y que los inhibidores de GSK3 $\beta$  han mostrado propiedades antidepressivas. La actividad de esta cinasa es dependiente de distintas fosforilaciones: así, la fosforilación en el residuo serina 9 la inactiva, mientras que la fosforilación en el residuo tirosina 216 la activa. Al realizar un estudio de la fosforilación de estos residuos frente a la proteína total, se observó

únicamente una disminución de un 25 % en la fosforilación de la serina 9 en la corteza prefrontal de los ratones Nrf2 (-/-) (Fig. 19 A y C). La tirosina 216 no presentó alteraciones (Fig. 19 B y D).

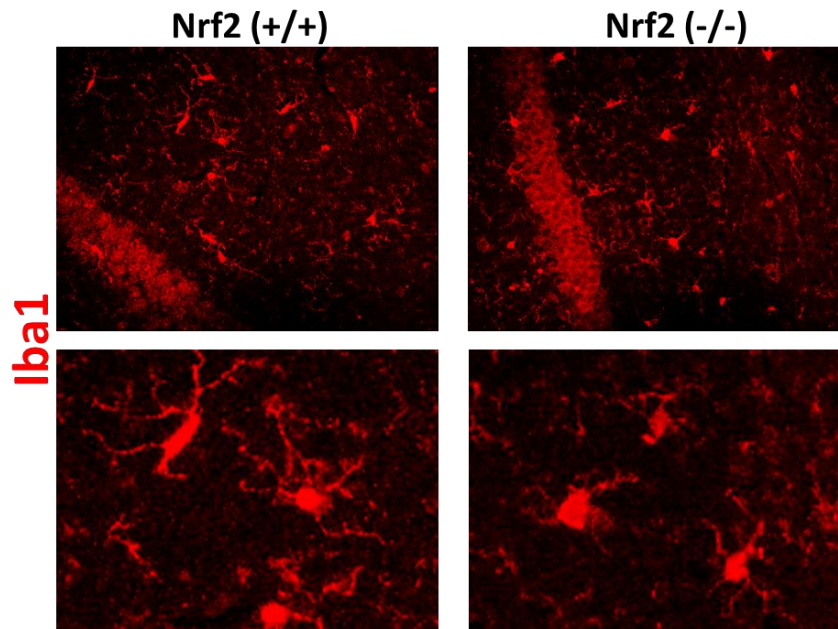


**Figura 19. Alteración de la fosforilación de GSK3β en la serina 9 en la corteza prefrontal de ratones Nrf2 (-/-).** Se estudió la fosforilación de GSK3β por WB en ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). **A y B** representan los niveles de p-GSK3β-Ser9 y p-GSK3β-Tyr216, respectivamente, en el hipocampo. **C y D** representan los niveles de p-GSK3β-Ser9 y p-GSK3β-Tyr216, respectivamente, en la corteza prefrontal. Las imágenes que acompañan a los gráficos son un ejemplo representativo de los WB realizados para cada fosfoproteína en la parte superior y la proteína total como control de carga en la parte inferior. Las barras representan la media ± EEM (n= 7-8). La barra con el símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba utilizada: t de Student.

## 5.5 Participación de la inflamación en el fenotipo depresivo de ratones Nrf2 (-/-)

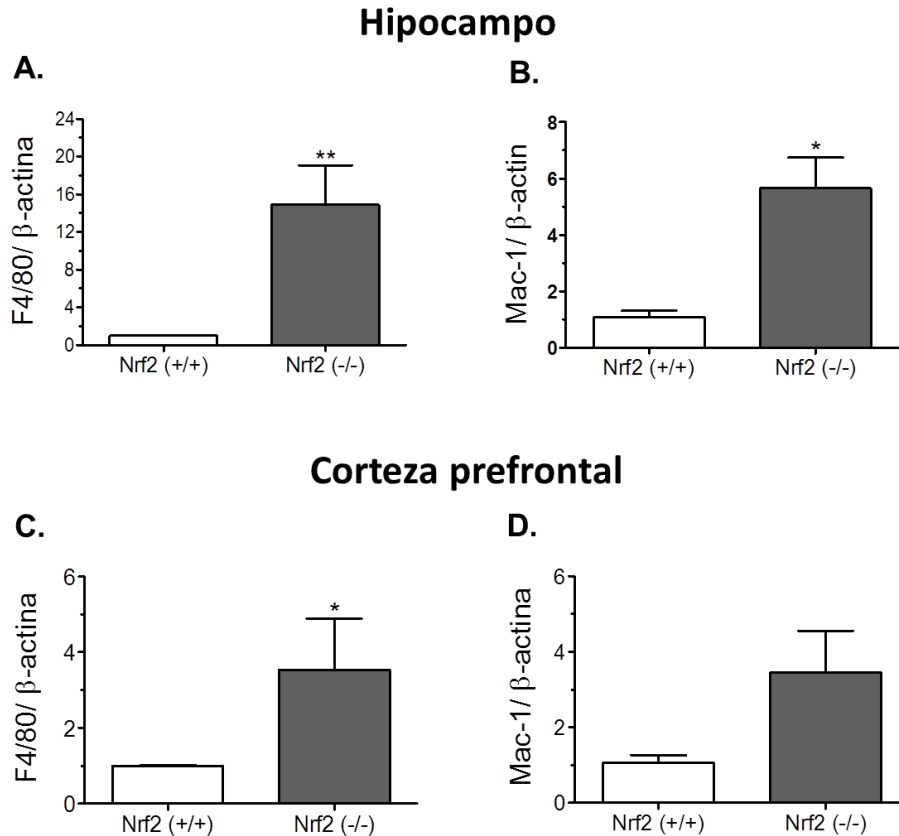
Para la consecución del objetivo 2, es decir, estudiar si la inflamación es la responsable del fenotipo depresivo de los ratones Nrf2 (-/-), estudiamos primero el estado de la microglía en el hipocampo de los ratones controles y de los transgénicos. Realizamos una tinción frente a

Iba1 por inmunofluorescencia. Los ratones Nrf2 (-/-) presentaron la microglía con los cuerpos ligeramente engrosados y las prolongaciones retraídas, signo de microgliosis (Fig. 20). Estos mismos efectos se observaron también en CA3 y giro dentado (datos no mostrados).



**Figura 20. Activación microglial suave en el hipocampo de ratones Nrf2 (-/-).** Se realizó una tinción frente a Iba1 por inmunofluorescencia en la zona CA1 del hipocampo. Las imágenes superiores representan microfotografías a 20X aumentos y las inferiores un aumento de las inmediatamente superiores (n=3).

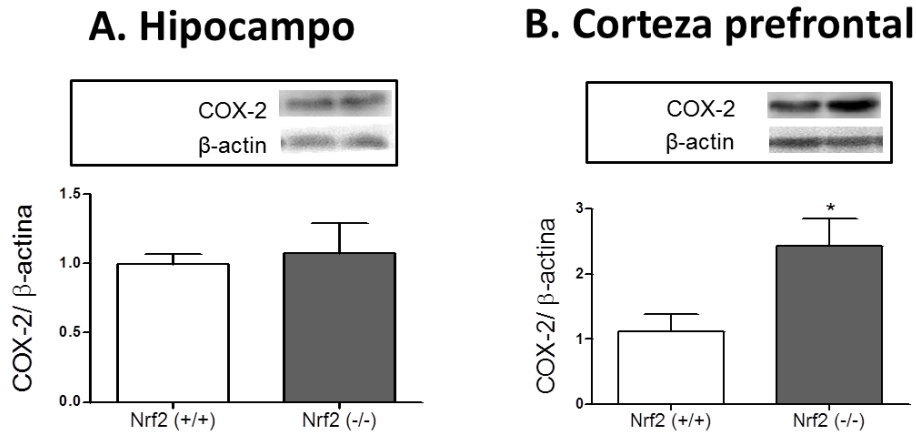
Los efectos encontrados mediante la inmunofluorescencia fueron tenues, por lo que se intentó corroborar este hecho mediante qPCR frente a F4/80 y Mac-1, otros dos marcadores microgliales. Como se puede observar en la figura 21, los niveles de ARNm tanto de F4/80 como de Mac-1 se encontraron aumentados en esta zona cerebral (15 y 6 veces mayor respectivamente, figura 21 A y B). Estos parámetros se encontraron aumentados también en la corteza prefrontal (Fig. 21 C y D).



**Figura 21. Los niveles de ARNm de F4/80 y Mac-1 están aumentados en ratones Nrf2 (-/-).** Se estudiaron los niveles de ARNm de F4/80 y Mac-1 por qPCR en ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). En la parte izquierda (**A** y **C**), se representa los niveles de F4/80 y en la derecha (**B** y **D**) los de Mac-1. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n= 4-5). La barra con el símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). La barra con el símbolo \*\* representa  $p < 0,01$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba utilizada: U de Mann-Whitney.

A continuación realizamos un análisis de la expresión de COX-2, una enzima inducible cuya expresión aumenta en estados inflamatorios. Así, observamos que la expresión de esta proteína se encuentra aumentada 2,5 veces en la corteza prefrontal, pero no en el hipocampo (Fig 22 C y D).





**Figura 22. Aumento de la expresión de COX-2 en ratones Nrf2 (-/-).** Se analizó la expresión de COX-2 mediante WB en ratones C57BL/6 salvajes y Nrf2 (-/-). **A** y **B** muestran la expresión de COX-2 en el hipocampo y la corteza prefrontal respectivamente. Las imágenes que acompañan a los gráficos son un ejemplo representativo de los WB realizados para COX-2 en la parte superior de y para  $\beta$ -actina como control de carga en la parte inferior. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (n= 5-10). La barra con el símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). Prueba utilizada: t de Student.

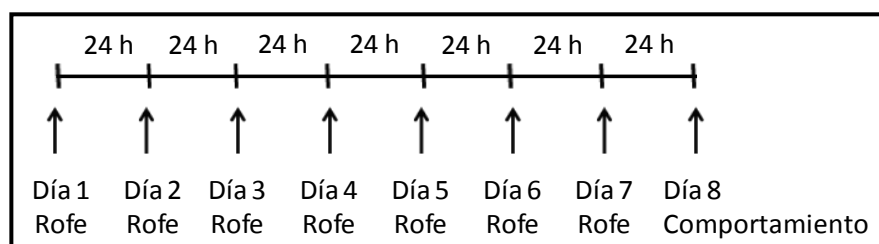
A continuación se muestra una tabla resumen (Tabla 6) de los marcadores estudiados hasta ahora comparando los ratones Nrf2 (-/-) con sus controles.

**Tabla 6. Resumen de los datos bioquímicos obtenidos en ratones Nrf2 (-/-) comparando con los controles.**

Marcador	Hipocampo	Cortex prefrontal
5-HT	=	<
DA	=	<
Glutamato	=	>
GABA	>	=
Pro-BDNF	<	=
BDNF	<	=
VEGF	<	>
SF	=	<
P-GSK3 $\beta$ -Ser9	=	<
P-GSK3 $\beta$ -Tyr216	=	=
COX-2	=	>
Iba1	>	ND
F4/80	>	>
Mac-1	>	>

Una vez demostrado que existía aumento de parámetros inflamatorios, se diseñaron una serie de experimentos para comprobar si el comportamiento depresivo se revertía al administrar un antiinflamatorio. Así, administramos rofecoxib durante siete días a una

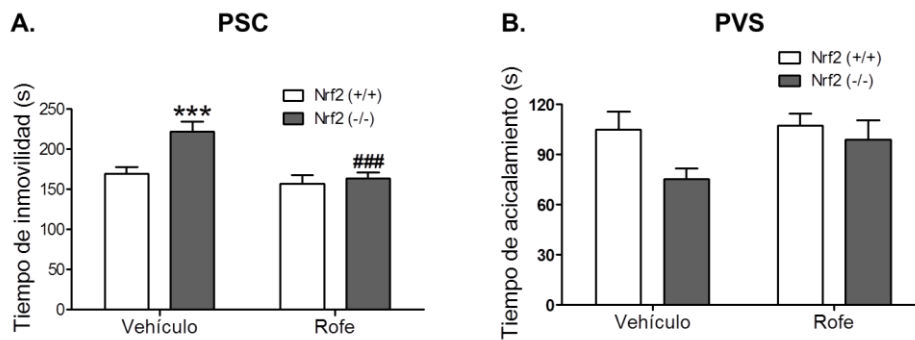
dosis de 2 mg/kg por vía intraperitoneal. La dosis fue elegida por datos de la literatura en los que el rofecoxib revertía los efectos depresogénicos inducidos por LPS <sup>209,210</sup>. A las 24 h de la última administración se realizaron las distintas pruebas de comportamiento: la prueba de suspensión de la cola, la prueba del vaporizador de sacarosa y la prueba del campo abierto (Fig. 23).



**Fig. 23. Procedimiento experimental empleado en los experimentos con rofecoxib.** Se administró el rofecoxib a 2 mg/kg/día ip durante 7 días. El día 8 se realizaron la PSC, la PVS o la PCA.

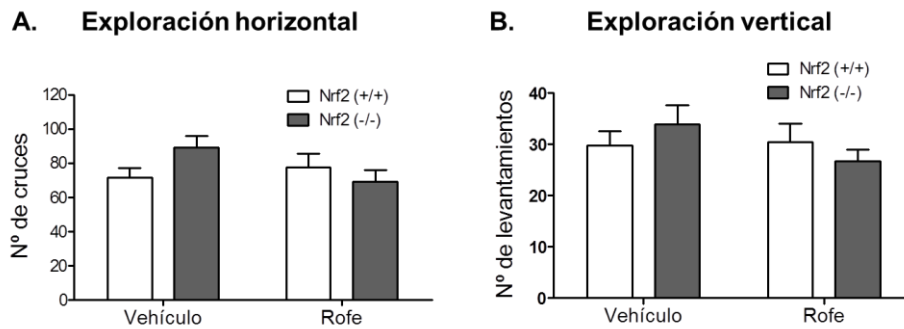
El tratamiento con rofecoxib previno el aumento del tiempo de inmovilidad en los ratones Nrf2 (-/-) en un 75 % en la prueba de suspensión de la cola (Fig. 24 A). El rofecoxib no tuvo ningún efecto en los ratones salvajes. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del rofecoxib [ $F_{1,35}=14,30$ ,  $p<0,001$ ], un efecto significativo del genotipo [ $F_{1,35}=10,03$ ,  $p<0,01$ ] e interacción tratamiento x genotipo [ $F_{1,35}=5,92$ ,  $p<0,05$ ].

Por otro lado, al realizar la prueba del vaporizador de sacarosa, se observó una clara tendencia a la reversión de la disminución del tiempo de acicalamiento al administrar rofecoxib, pero este efecto no fue estadísticamente significativo. La ANOVA de dos vías mostró una ausencia de efecto del rofecoxib [ $F_{1,35}=1,979$ ,  $p>0,05$ ], un efecto significativo del genotipo [ $F_{1,35}=4,332$ ,  $p<0,05$ ] y ausencia de interacción tratamiento x genotipo [ $F_{1,35}=1,334$ ,  $p>0,05$ ].



**Figura 24. El rofecoxib, inhibidor de COX-2, previene el comportamiento depresivo de los ratones Nrf2 (-/-).** Se trataron ratones C57BL/6 Nrf2 (+/+) y Nrf2 (-/-) con rofecoxib a 2 mg/kg/día ip durante 7 días. Al día siguiente se realizó (A) la prueba de suspensión de la cola (PSC) y (B) la prueba del vaporizador de sacarosa (PVS). Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=9-10). La barra con el símbolo \*\*\* representa  $p < 0,001$  vs. Nrf2 (+/+). La barra con el símbolo ### representa  $p < 0,001$  vs. Nrf2 (-/-). ANOVA de dos vías + post hoc Bonferroni.

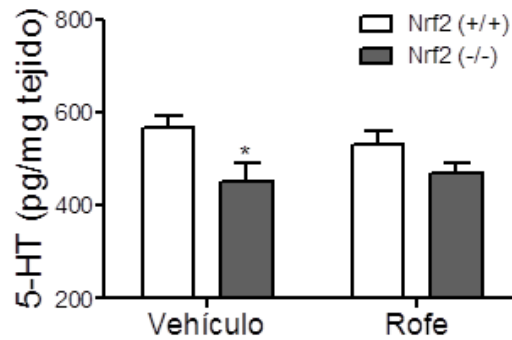
Después de realizar estos estudios, se comprobó que no hubiera alteración en la locomoción que podría producir un falso positivo en los resultados de la prueba de suspensión de la cola. La locomoción no se alteró en ninguno de los grupos midiendo tanto la actividad locomotora horizontal (Fig. 25 A) como la vertical (Fig. 25 B). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la exploración horizontal mostró ausencia de efecto del rofecoxib [ $F_{1,35}=3,568$ ,  $p > 0,05$  ], ausencia de efecto del genotipo [ $F_{1,35}=0,4462$ ,  $p > 0,05$  ] y ausencia de interacción tratamiento x genotipo [ $F_{1,35}=0,9968$ ,  $p > 0,05$  ]. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la exploración vertical mostró ausencia de efecto del rofecoxib [ $F_{1,35}=1,528$ ,  $p > 0,05$  ], ausencia de efecto del genotipo [ $F_{1,35}=0,004$ ,  $p > 0,05$  ] y ausencia de interacción tratamiento x genotipo [ $F_{1,35}=1,029$ ,  $p > 0,05$  ].



**Figura 25. La locomoción no se altera tras el tratamiento con rofecoxib.** Se trataron ratones C57BL/6 Nrf2 (+/+) y Nrf2 (-/-) con rofecoxib a 2 mg/kg/día durante 7 días. Al siguiente día se realizó la prueba del campo abierto y se analizó la exploración horizontal (A) y la vertical (B). Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=9-10). ANOVA de dos vías + post hoc Bonferroni.

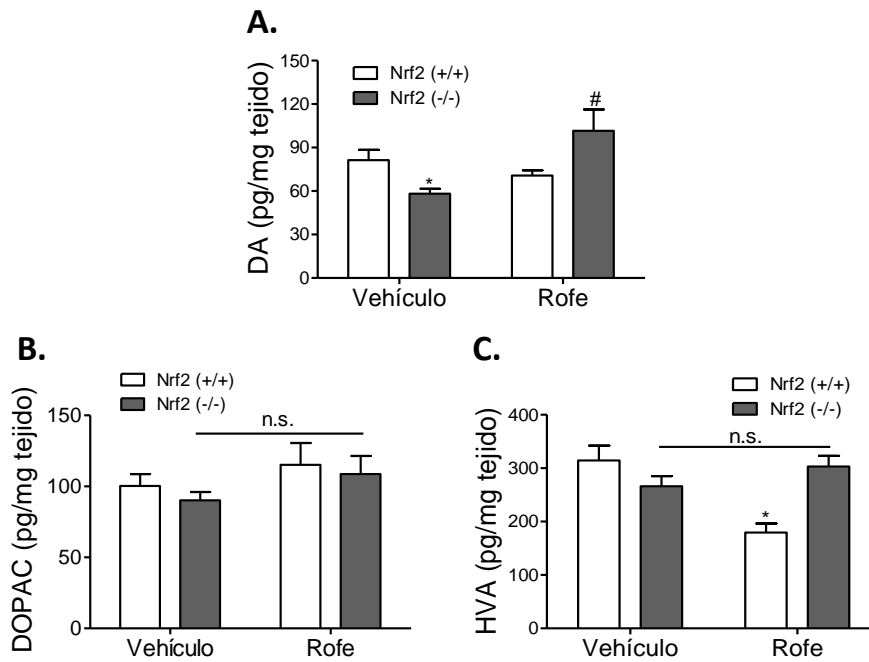
Finalmente, se estudió el efecto del tratamiento antiinflamatorio con rofecoxib sobre el metabolismo de neurotransmisores en la corteza prefrontal con el objeto de evaluar si las alteraciones descritas en el punto 4.2 se revertían conjuntamente con la reversión del comportamiento depresivo.

La figura 26 muestra que el tratamiento con rofecoxib no tuvo ningún efecto sobre la concentración de serotonina, ni en los ratones salvajes ni en los Nrf2 (-/-). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la concentración de serotonina mostró un efecto no significativo del rofecoxib [ $F_{1,44}=0,7698$ ,  $p>0,05$ ], efecto significativo del genotipo [ $F_{1,44}=8,930$ ,  $p<0,05$ ] y ausencia de interacción tratamiento x genotipo [ $F_{1,44}=0,1132$ ,  $p>0,05$ ].



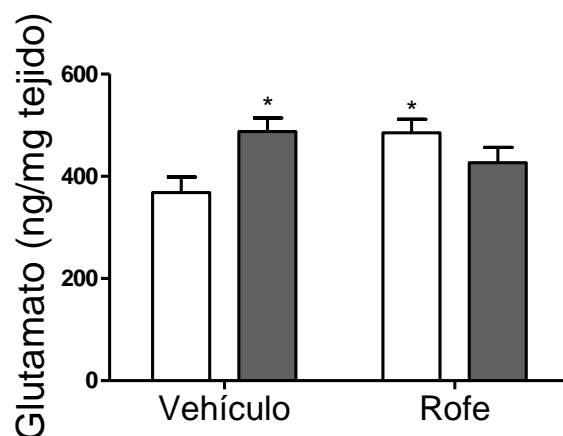
**Figura 26.** El tratamiento a dosis repetidas con rofecoxib no modifica la concentración de serotonina en la corteza prefrontal. Se trataron ratones C57BL/6 Nrf2 (+/+) y Nrf2 (-/-) con rofecoxib a 2 mg/kg/día durante 7 días. Al siguiente día se disecaron las cortezas prefrontales y se analizó la concentración de serotonina por HPLC-EQ. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=12). La barra con el símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). ANOVA de dos vías + post hoc Bonferroni.

Al estudiar los niveles de DA, DOPAC y HVA en la corteza prefrontal bajo las mismas condiciones experimentales, se observó que el tratamiento con rofecoxib fue capaz de restaurar los niveles de DA pero no afectó los niveles de DOPAC (Fig. 27 A y B). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la concentración de DA mostró un efecto no significativo del rofecoxib [ $F_{1,46}=0,1450$ ,  $p > 0,05$ ], efecto no significativo del genotipo [ $F_{1,46}=2,587$ ,  $p < 0,05$ ] e interacción significativa tratamiento x genotipo [ $F_{1,46}=7,039$ ,  $p < 0,05$ ]. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la concentración de DOPAC mostró un efecto no significativo del rofecoxib [ $F_{1,46}=2,3838$ ,  $p > 0,05$ ], efecto no significativo del genotipo [ $F_{1,46}=0,5848$ ,  $p < 0,05$ ] y ausencia de interacción tratamiento x genotipo [ $F_{1,46}=0,0298$ ,  $p > 0,05$ ]. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la concentración de HVA mostró un efecto significativo del rofecoxib [ $F_{1,46}=4,989$ ,  $p < 0,05$ ], efecto no significativo del genotipo [ $F_{1,46}=2,938$ ,  $p > 0,05$ ] e interacción significativa tratamiento x genotipo [ $F_{1,46}=25,19$ ,  $p < 0,001$ ].



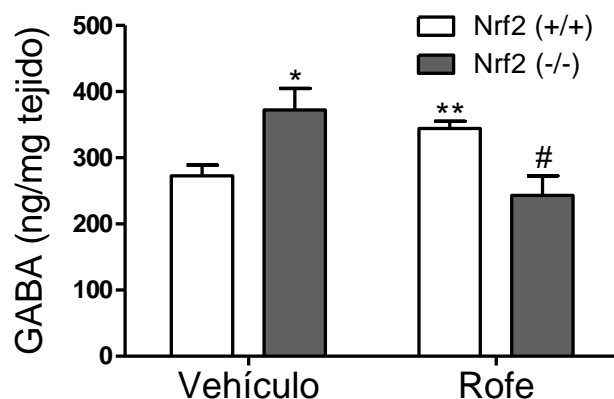
**Figura 27. El tratamiento a dosis repetidas con rofecoxib restaura los niveles de DA sin afectar a la concentración de DOPAC ni HVA en la corteza prefrontal de ratones Nrf2 (-/-).** Se trataron ratones C57BL/6 Nrf2 (+/+) y Nrf2 (-/-) con rofecoxib a 2 mg/kg/día durante 7 días. Al siguiente día se disecaron las cortezas prefrontales y se analizó la concentración de DA, DOPAC y HVA por HPLC-EQ. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=12-13). La barra con el símbolo \*representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). La barra con el símbolo # representa  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (-/-). ANOVA de dos vías + post hoc Bonferroni. t de Student para diferencias entre grupos en la figura 27 A y C debido a interacción genotipo x tratamiento.

Por otro lado, el aumento de la concentración de glutamato observada en las cortezas de los ratones Nrf2 (-/-) tampoco se revirtió con el tratamiento a dosis repetidas con rofecoxib, mientras que sí tuvo un efecto sobre los ratones Nrf2 (+/+) en los que se observó un aumento (Fig. 28). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la concentración de glutamato mostró un efecto no significativo del rofecoxib [ $F_{1,35}=1,087$ ,  $p > 0,05$ ], efecto no significativo del genotipo [ $F_{1,35}=0,9174$ ,  $p > 0,05$ ] e interacción significativa tratamiento x genotipo [ $F_{1,35}=9,153$ ,  $p < 0,001$ ].



**Figura 28. El tratamiento a dosis repetidas con rofecoxib no restaurará los niveles de glutamato en la corteza prefrontal de ratones Nrf2 (-/-).** Se trataron ratones C57BL/6 Nrf2 (+/+) y Nrf2 (-/-) con rofecoxib a 2 mg/kg/día durante 7 días. Al siguiente día se disecaron las cortezas prefrontales y se analizó la concentración de DA y DOPAC por HPLC-EQ. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=9-10). Las barras con el símbolo \* representan  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). ANOVA de dos vías + post hoc Bonferroni. t de Student para diferencias entre grupos debido a interacción genotipo x tratamiento.

Finalmente, se determinó el efecto del tratamiento con rofecoxib sobre la concentración de GABA en el hipocampo. Como se puede observar en la figura 29 el aumento de GABA observado en los ratones Nrf2 (-/-) se normalizó al administrar rofecoxib hasta niveles basales. Por otro lado, la concentración de GABA aumentó en los ratones Nrf2 (+/+) tratados con rofecoxib en comparación con los ratones Nrf2 (+/+) a los que se les administró suero salino. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías de la concentración de GABA mostró un efecto no significativo del rofecoxib [ $F_{1,35}=1,502$ ,  $p > 0,05$ ], efecto no significativo del genotipo [ $F_{1,35}=0,0011$ ,  $p > 0,05$ ] e interacción significativa tratamiento x genotipo [ $F_{1,35}=18,31$ ,  $p < 0,001$ ].



**Figura 29. El tratamiento a dosis repetidas con rofecoxib restaura los niveles de GABA en el hipocampo de ratones Nrf2 (-/-).** Se trataron ratones Nrf2 (+/+) y Nrf2 (-/-) con rofecoxib a 2 mg/kg/día durante 7 días. Al siguiente día se disecaron los hipocampos y se analizó la concentración de DA y DOPAC por HPLC-EQ. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=9-10). Las barras con el símbolo \*representan  $p < 0,05$  vs. Nrf2 (+/+). ANOVA de dos vías + post hoc Bonferroni, t de Student para el estudio de diferencias entre grupos debido a la presencia de interacción genotipo x tratamiento.

A continuación se muestra una tabla resumen (Tabla 7) con los resultados del comportamiento y de los niveles de neurotransmisores en los ratones Nrf2 (-/-) en comparación con los controles y el efecto del tratamiento con rofecoxib.

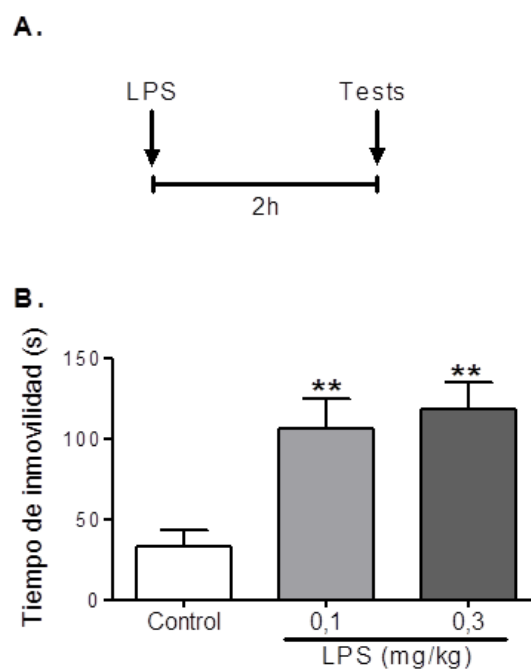
**Tabla 7. Resumen de comportamiento y niveles de neurotransmisores obtenidos con ratones Nrf2 (-/-) y el tratamiento con rofecoxib.**

Prueba	Efecto en Nrf2 (-/-)	Tratamiento con Rofe
PNF	>	ND
PSC	>	Revierte
TS	<	Tendencia a revertir
PCA	=	=
PCA	=	=
5HT	<	No
DA	<	R
Glut.	>	No
GABA	>	Revierte



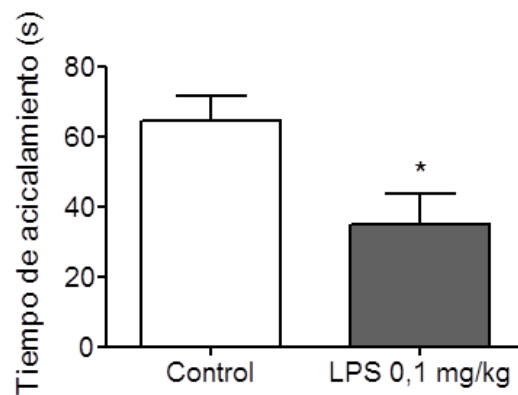
## 5.6 El LPS administrado intraperitonealmente induce cambios en el comportamiento

Para la consecución del objetivo 4, consistente en el estudio del posible papel antidepressivo del sulforafano en un modelo inflamatorio de depresión, se comprobó la reproducibilidad de los datos existentes en la bibliografía sobre el efecto del LPS en el comportamiento. Para ello se realizó un estudio en ratones Swiss macho adultos a los que se les administró LPS a las dosis de 0,1 y 0,3 mg/kg y, a las dos horas, evaluamos el comportamiento (Fig. 30 A). El tratamiento con LPS produjo un aumento significativo del tiempo de inmovilidad a las dos dosis empleadas, no observándose diferencias entre ambas (Fig. 30 B).



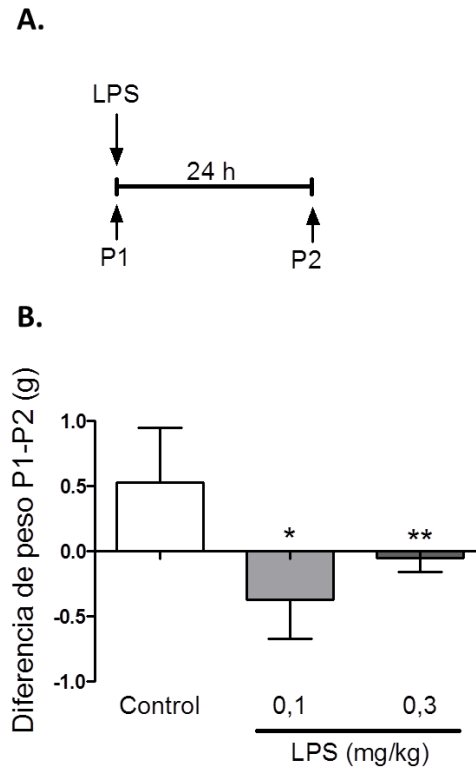
**Figura 30. El LPS aumenta el tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola** En la parte superior (A) se muestra el protocolo de administración del LPS. B muestra el efecto de la administración intraperitoneal de LPS (0,1 y 0,3 mg/kg) en ratones Swiss macho de 3-4 meses en la prueba de suspensión de la cola. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. (n=6). Las barras con el símbolo \*\* representan  $p < 0,01$  vs. Control. ANOVA de una vía + post hoc Newman-Keuls.

Al evaluar la anhedonia en este modelo, se observa una disminución del tiempo de acicalamiento de un 45 % con la dosis de 0,1 mg/kg (Fig. 31) lo que viene a reforzar el efecto depresivo mostrado en la figura 30 B.



**Figura 31. El LPS produce una disminución del tiempo de acicalamiento en ratones Swiss macho.** Se estudió el efecto de la administración intraperitoneal de LPS a 0,1 mg/kg en ratones swiss macho de 3-4 meses en la prueba de suspensión de la cola. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. (n=6). La barra con el símbolo \* representan  $p < 0,05$  vs. Control. Prueba empleada: t de Student.

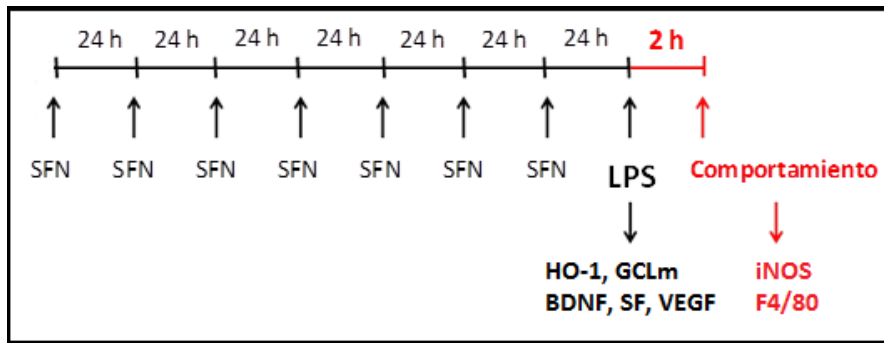
Finalmente, medimos la pérdida de peso de los ratones a las 24 h de administrar el LPS (Fig. 32 A), ya que éste induce anorexia que finalmente se traduce en una pérdida de peso. Se produjo una pérdida de peso de los ratones tratados con LPS en comparación con sus controles. Esta diferencia fue de casi un gramo para los ratones tratados con LPS a 0,1 mg/kg y de medio gramo para los tratados con 0,3 mg/kg (Fig. 32 B).



**Figura 32. El LPS produce pérdida de peso a las 24 horas después de su administración.** Se estudió el efecto de la administración intraperitoneal de LPS (0,1 y 0,3 mg/kg) en ratones swiss macho de 3-4 meses sobre el peso corporal. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. (n=6). La barra con el símbolo \* representan  $p < 0,05$  vs. control. La barra con el símbolo \*\* representan  $p < 0,01$  vs. control. ANOVA de una vía + post hoc Newman-Keuls.

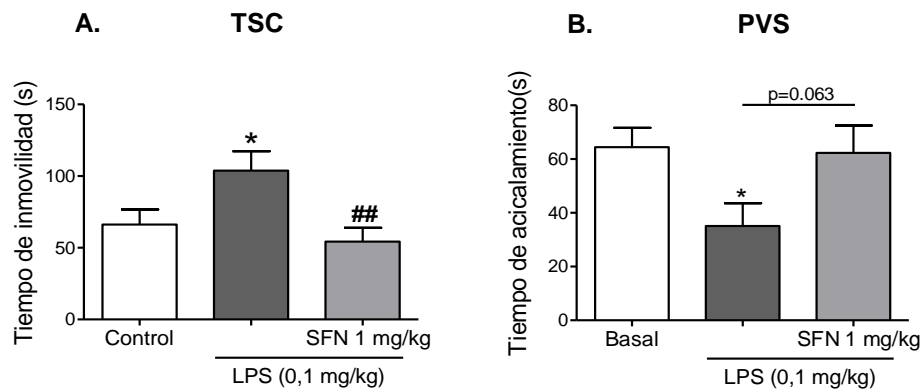
## 5.6 El sulforafano, inductor de Nrf2, previene la depresión inducida por LPS

Tras haber validado el modelo, se planificaron la siguiente serie de experimentos con el objetivo de evaluar el posible efecto antidepresivo del sulforafano en el modelo de depresión inflamatoria inducida por LPS. Así, administramos el SFN a la dosis de 1 mg/kg/día ip durante 7 días. El día 8 administramos el LPS y a las 2 h evaluamos el comportamiento. Además, se estudio la expresión de distintas proteínas como se muestra en la figura 33.



**Fig. 33. Procedimiento experimental empleado en los experimentos con SFN.** Se administró el SFN a 1 mg/kg/día ip durante 7 días. Para estudiar la expresión de HO-1, GCLm, BDNF, SF y VEGF el día 8 se disecaron los hipocampos antes de administrar LPS. Para el estudio del comportamiento, el día 8 se administró el LPS, a las 2 h realizamos la PSC y la PVS e inmediatamente después disecamos hipocampos para estudiar la expresión de iNOS y F4/80

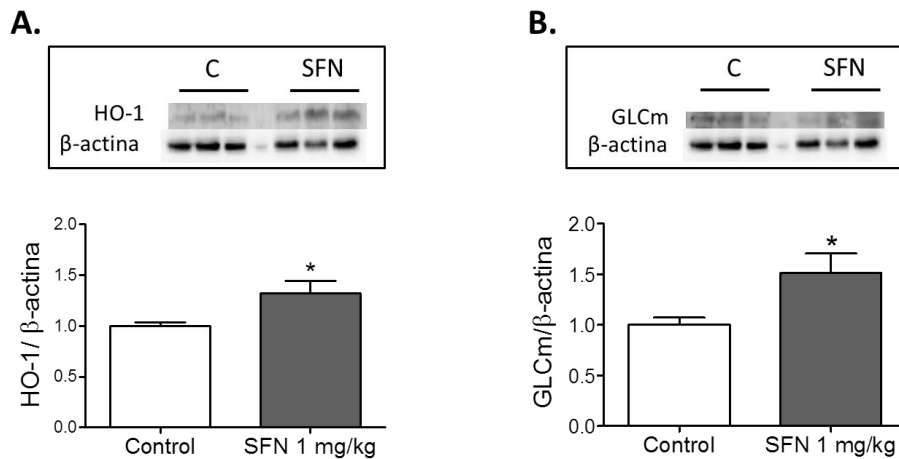
Se realizó un estudio piloto con SFN a 50, 25, 5 y 1 mg/kg. Finalmente, se seleccionó la dosis de 1 mg/kg ya que fue la que produjo mejores efectos y de esta manera se disminuyeron el número de animales utilizados en el estudio. Como se puede observar en la figura 34 A, el LPS nuevamente produjo un aumento del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola; el SFN fue capaz de revertir este efecto a nivel de la basal. En la PVS (Fig. 34 B), el LPS disminuyó el tiempo de acicalamiento y el SFN lo incrementó; sin embargo, dicho incremento no alcanzó la significancia estadística ( $p=0,063$ ).



**Figura 34. EL SFN previene el efecto depresivo del LPS.** Se administró SFN a 1 mg/kg/día ip durante 7 días. Al octavo día se administró LPS (0,1 mg/kg) y tras 2 h se realizaron la prueba de suspensión de la cola (A) o el de la sacarosa (B). Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=15). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. control. El símbolo ## representa  $p < 0,01$  vs. LPS. Fig. 33 A: ANOVA dos vías + post hoc Newman-Keuls. Test estadístico utilizado en Fig. 34 B: t de Student.

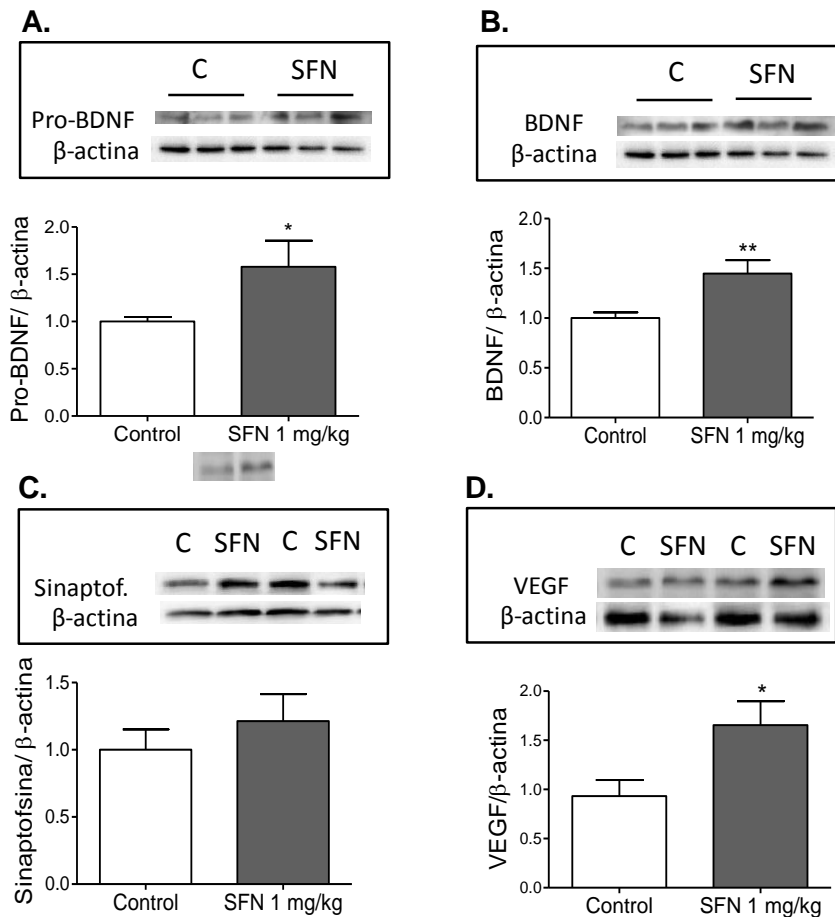
## 5.7 El sulforafano activa Nrf2, induce neuroplasticidad y previene la inflamación

Después de observar el efecto del SFN en el comportamiento, se analizó el mecanismo de acción de SFN en el modelo de LPS. Para demostrar que el SFN estaba induciendo Nrf2 se midió la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1) y glutamato cisteína ligasa moduladora (GCLM), ya que ambas enzimas son inducidas por la acción de Nrf2. Así, administramos el SFN durante 7 días a 1 mg/kg y al octavo día en vez de administrar el LPS, se sacrificaron los animales bajo anestesia profunda con isoflurano y se disecaron los hipocampos. El tratamiento con SFN aumentó la expresión de HO-1 en un 30 % (Fig. 34A) y la GCLM en un 50 % (Fig. 35 B).



**Figura 35. El sulforafano a 1 mg/kg induce HO-1 y GLCm.** Se administró SFN durante 7 días a 1 mg/kg/día a ratones Swiss macho de 3-4 meses; el día 8 se sacrificaron los animales bajo anestesia profunda con isoflurano, se disecaron los hipocampos y se estudio la expresión de HO-1 (A) y GLCm (B) mediante WB. Las imágenes que acompañan cada gráfico muestran una imagen representativa de los inmunoblots realizados, siendo las imágenes superiores las correspondientes a HO-1 y GLCm y la inferior a β-actina usada como control de carga. Las barras representan la media ± SEM (n=9). El símbolo \*\* representa  $p < 0,01$  vs. control. El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. control. Prueba estadística empleada: t de Student.

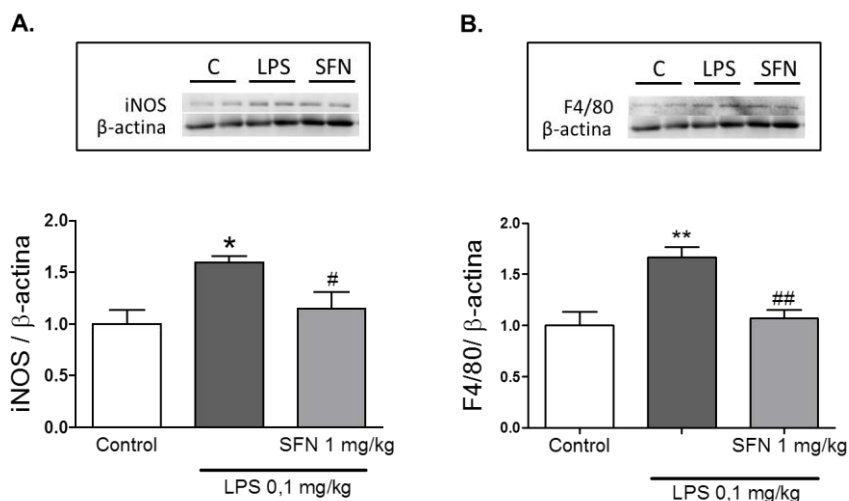
Después, analizamos la expresión de pro-BDNF, BDNF, sinaptofisina y VEGF en estas mismas condiciones y encontramos que la administración de SFN a 1 mg/kg/día durante 7 días produce un aumento de la expresión de pro-BDNF, BDNF y VEGF en un 60 %, 45 % y un 65 %, respectivamente (Fig. 36 A, B y D). Sin embargo, la expresión de sinaptofisina no se vio alterada (Fig. 36 C)



**Figura 36. El SFN induce pro-BDNF, BDNF y VEGF en el hipocampo de ratones Swiss macho.** Se administró SFN durante 7 días a 1 mg/kg/día a ratones Swiss macho de 3-4 meses; el día 8 se sacrificaron los animales bajo anestesia profunda con isoflurano, se disecaron los hipocampos y se estudio la expresión de (A) pro-BDNF, (B) BDNF, (C) sinaptofisina y (D) VEGF mediante WB. Las imágenes que acompañan cada gráfico muestran una imagen representativa de los inmunoblots realizados, siendo la imagen superior la correspondiente a Pro-BDNF, BDNF, sinaptofisina o VEGF y, las imágenes inferiores a  $\beta$ -actina usada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=8). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. control. Prueba estadística: t de Student.

Finalmente se evaluó si el SFN a la dosis estudiada estaba teniendo un efecto antiinflamatorio. Para ello, después de realizar el estudio del comportamiento, se sacrificó a los animales bajo anestesia profunda con isoflurano y se disecaron los hipocampos. Se estudió la inducción de iNOS, una enzima que se induce tras la administración de LPS, y de F4/80 como marcador de microglía/macrófagos infiltrados. En la figura 37 A se observa como el LPS produce una inducción de iNOS en un 50

% y el SFN lo revierte hasta niveles basales. En el caso de F4/80, la inducción producida por LPS fue de casi un 70 % y el SFN también en este caso fue capaz de revertirlo (Fig 37 B).



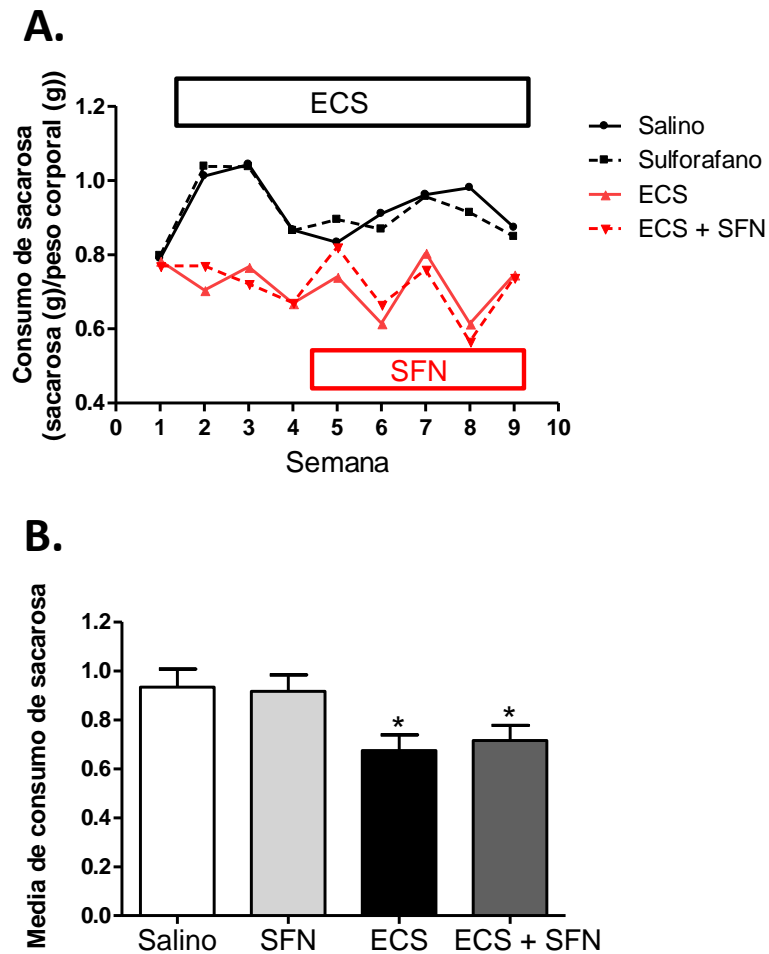
**Figura 37. El sulforafano a 1 mg/kg revierte la inducción de iNOS y F4/80 producida por LPS.** Se administró SFN durante 7 días a 1 mg/kg/día a ratones swiss macho de 3-4 meses; el día 8 se administró LPS a 0,1 mg/kg y a las 2,5 h se sacrificaron los animales bajo anestesia profunda con isofluorano, se disecaron los hipocampos y se estudió la expresión de iNOS (A) y F4/80 (B) mediante WB. Las imágenes que acompañan cada gráfico muestran una imagen representativa de los inmunoblots realizados, siendo la imagen superior la correspondiente iNOS o F4/80 y la inferior  $\beta$ -actina, usada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=4). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. control. El símbolo # representa  $p < 0,05$  vs. LPS. El símbolo \*\* representa  $p < 0,01$  vs. control. El símbolo ## representa  $p < 0,01$  vs. LPS. El símbolo ## representa  $p < 0,01$  vs. LPS. ANOVA de una vía + Newman-Keuls.

## 5.8 El sulforafano no revierte la anhedonia inducida por estrés crónico suave a pesar de ejercer un efecto antiinflamatorio.

Como parte final de esta tesis doctoral, se evaluó si la activación de Nrf2 podría ejercer un efecto beneficioso en un modelo de depresión inducido por estrés crónico denominado ‘estrés crónico suave’ (ECS)



descrito en la sección de materiales y métodos (apartado 4.5). Se monitorizó el consumo de sacarosa semanalmente para evaluar la presencia o ausencia de anhedonia y se observó que los ratones del grupo ECS presentaron una clara disminución del consumo de sacarosa con respecto a los ratones control. El SFN administrado una vez al día a 1 mg/kg tras la semana 3 de haber comenzado el estrés, no tuvo ningún efecto ni en los ratones sin estrés ni en los sometidos a ECS a pesar de que tras la primera semana de administración hubo una tendencia a la mejoría (Fig. 38 A). En la figura 38 B, se representa la media de consumo de sacarosa de todas las semanas. Los ratones sometidos a estrés presentaron una disminución en el consumo de sacarosa de un 30 % respecto al control. Sin embargo, el tratamiento con SFN no modificó esta disminución de la consumo de sacarosa.

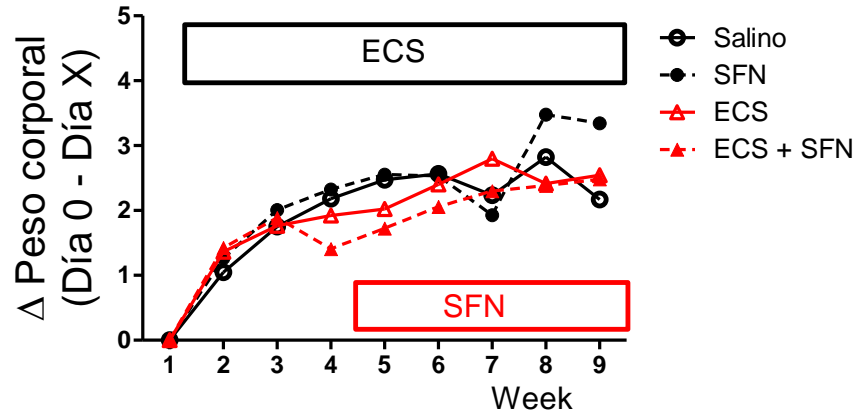


**Fig 38. El sulforafano no es capaz de revertir la anhedonia inducida por estrés crónico suave.** Se indujo depresión mediante ECS en ratones C57BL/6/J durante 8 semanas. Las últimas 5 semanas se trató a dos grupos de animales con SFN 1 mg/kg/día por vía ip de manera que existieron 4 grupos: salino, SFN, ECS y ECS + SFN. Se monitorizó semanalmente el consumo de una solución de sacarosa al 1 % representado respecto al peso corporal. El panel **A** muestra la evolución de la monitorización semanal de la anhedonia. En el panel **B** se representa la media de consumo de sacarosa por grupo. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=15 por grupo). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. salino. ANOVA de una vía + Newman-Keuls.

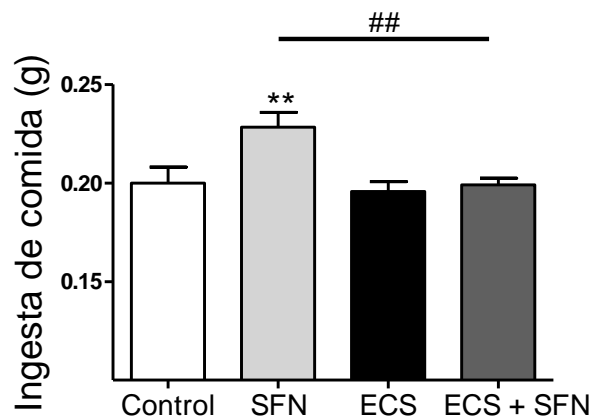
Por otro lado, los ratones tratados con SFN presentaron una tendencia a aumentar el peso, que se perdió en los ratones del grupo ECS + SFN (Fig. 39 A). Este aumento del peso corporal de los ratones tratados con SFN se puede atribuir a un aumento de la ingesta de comida, ya que como se muestra en la figura 39 B los ratones tratados únicamente con SFN mostraron un aumento de la ingesta. Por otro lado, el protocolo de

ECS no indujo pérdida de peso en comparación con los controles (Fig. 39 A).

**A.**



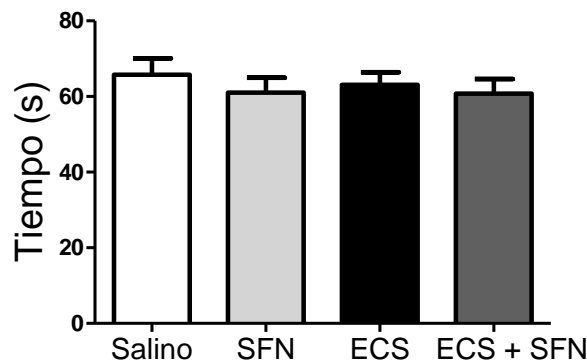
**B.**



**Fig 39. El sulforafano aumenta la ingesta *per se*.** Se indujo depresión mediante ECS en ratones C57BL/6/J durante 8 semanas. Las últimas 5 semanas se trató a dos grupos de animales con SFN 1 mg/kg/día por vía ip de manera que existieron 4 grupos: salino, SFN, ECS y ECS + SFN. Se monitorizó la evolución del peso corporal semanalmente. (A) Incremento de peso corporal monitorizado semanalmente. (B) Ingesta de comida relativo al peso corporal. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=15 por grupo). El símbolo \* representa  $p < 0,05$  vs. salino. ANOVA de una vía + Newman-Keuls.

Con el objetivo de estudiar la posible inhibición del SNC en los animales tratados con SFN, se evaluó la habilidad motora de los animales mediante el Rota-Rod. Cómo se puede observar en la

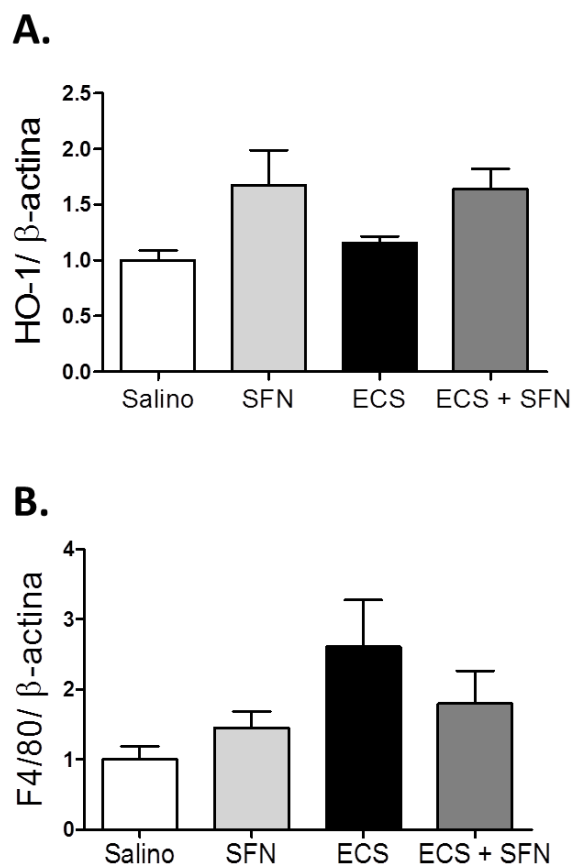
figura 40, no existieron diferencias entre los distintos grupos en esta prueba de comportamiento.



**Fig 40. El sulforafano no ejerce ningún efecto sobre la habilidad motora.** Se indujo depresión mediante ECS en ratones C57BL/6/J durante 8 semanas. Las últimas 5 semanas se trataron dos grupos de animales con SFN 1 mg/kg/día por vía ip de manera que existieron 4 grupos: salino, SFN, ECS y ECS + SFN. A las 19 h de la última administración de SFN se evaluó la habilidad motora mediante el Rota-Rod. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=15 por grupo).

A la vista de la ausencia de efecto sobre el comportamiento anhedónico del SFN se analizó por WB si el SFN estaba realmente induciendo Nrf2. Para ello, se disecaron los hipocampos de los ratones al final del experimento, 19 horas después de la última administración de SFN, y medimos la expresión de HO-1. Bajo estas condiciones experimentales el SFN aumentó la expresión de HO-1 en un 60 % tanto en los ratones sin estrés como los estresados. Por otro lado, el someter a los animales a ECS no indujo la expresión de HO-1 (Fig. 41 A).

Posteriormente se estudió si el ECS inducía inflamación a nivel del SNC. Para ello se midió la expresión de F4/80 al final del experimento. Como se muestra en la figura 41 B, el ECS cuadruplicó la expresión de F4/80 y el SFN fue capaz de reducirlo en un 80 %.



**Fig 41. El sulforafano a 1 mg/kg/día durante 5 semanas induce HO-1 y revierte la inducción de F4/80 producida por ECS.** Se sometió a ECS a ratones C57BL/6 durante 8 semanas. Las últimas 5 semanas se trató a dos grupos de animales con SFN 1 mg/kg/día por vía ip de manera que existieron 4 grupos: salino, SFN, ECS y ECS + SFN. 19 h después de la última administración de SFN se disecaron los hipocampos y se analizó la expresión de HO-1 (**A**) y F4/80 (**B**) por WB. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=8 por grupo).



## **6. Discusión**

---





Mediante los resultados de esta tesis doctoral hemos demostrado experimentalmente por primera vez que Nrf2, un factor de transcripción descrito recientemente como una diana terapéutica contra la inflamación a nivel del SNC<sup>192</sup>, está implicado en la depresión. La delección de Nrf2 conduce a un comportamiento depresivo, disminución de DA y 5-HT, aumento de glutamato y GABA, disminución de la neuroplasticidad, atrofia astrogial, alteraciones en la actividad de GSK3 $\beta$  y microgliosis. El comportamiento depresivo de los ratones Nrf2 (-/-) se revierte tras la administración de rofecoxib, un antiinflamatorio no esteroideo. Además, el tratamiento con sulforafano, un inductor de Nrf2, previno las alteraciones del comportamiento inducidas por el LPS, utilizado como modelo inflamatorio de depresión.

La implicación de la inflamación en la etiología de la depresión ha ganado importancia en los últimos años. La relación causal no está totalmente elucidada pero parece que esta situación podría estar ocurriendo en un subgrupo de

pacientes, dado que la depresión es una enfermedad heterogénea. La depresión puede ocurrir por la interferencia de la inflamación con los sistemas tradicionalmente relacionados con la depresión, tales como los sistemas monoaminérgicos, glutamatérgico y neurotróficos, según la teoría propuesta por Maes y McNally<sup>217,218</sup>. También se ha planteado la hipótesis de que una alteración en los mecanismos de regulación de la inflamación son deficientes en la depresión<sup>218,219</sup>. En este sentido, se ha documentado que los pacientes que sufren depresión refractaria al tratamiento (30-40 %) presentan mayores niveles de marcadores de respuesta de fase aguda (IL-6, proteína C reactiva, el número de monocitos)<sup>220,221</sup>. Además, variantes alélicas de los genes que codifican IL1 $\beta$  y TNF aumentan el riesgo de depresión y también se asocian con una disminución en la respuesta al tratamiento antidepresivo<sup>222,223</sup>.

El efecto de la ablación de Nrf2 sobre el comportamiento fue estudiado en tres pruebas de evaluación de la depresión independientes. En la PNF y en la PSC se observó un aumento en el tiempo de flotación (Fig. 9 A) y en el tiempo de inmovilidad (Fig. 9 B) respectivamente; mientras que en la PVS se observó una disminución en el tiempo de acicalamiento (Fig. 10). Los ratones Nrf2 (-/-) no mostraron una variación significativa en la locomoción en comparación con ratones control, ni en la exploración vertical ni en la horizontal (Fig.11 A y B). Por lo tanto, los resultados obtenidos en la PNF y PSC no se deben a una alteración en su actividad locomotora. En general, la PSC presenta mayor sensibilidad que la PNF, por esta razón se observó que proporcionalmente el aumento de los tiempos en los ratones Nrf2 (-/-) en estas dos pruebas no son similares. Además, se ha demostrado experimentalmente que el hecho de que un fármaco presente efecto antidepresivo en una de las pruebas no tiene por qué presentarlo en la otra<sup>36,224,225</sup>, a pesar de basarse ambas en un mecanismo de desesperación conductual. Otra de las ventajas de la PSC frente a la PNF es que los requerimientos experimentales son mucho menos engorrosos y más sencillos por la ausencia de agua, además del estrés que supone para el animal el frío y la humedad al terminar la prueba. Por todas estas razones, para los estudios de comportamiento posteriores nos decantamos por la PSC frente a la PNF.

La teoría monoaminérgica de la depresión fue postulada por Schildkraut en 1965<sup>25</sup>, la cual señalaba la disminución de la serotonina como mecanismo etiológico de

la depresión. Tras esto, se describió también un aumento en los niveles de glutamato y una disminución en los de DA <sup>226-229</sup>. En los ratones Nrf2 (-/-) se encontraron las siguientes alteraciones: disminución de 5-HT (Fig. 12 A) y DA (Fig. 13 A) en la corteza prefrontal, un aumento de glutamato en la corteza prefrontal (Fig. 14 C) y un incremento de GABA en el hipocampo (Fig 14 B). El aumento de GABA en el hipocampo resulta llamativo, dado que generalmente se ha descrito una disminución de GABA o un aumento del balance glutamato/GABA en la depresión <sup>230-233</sup>. Este incremento concretamente en el hipocampo podría estar relacionado con una disminución de la memoria espacial. Además, se considera que esta zona cerebral participa en la integración de los procesos relacionados con la emoción (humor, ansiedad, miedo, recompensa y motivación) y la cognición (atención, resolución de problemas y memoria) <sup>234</sup>; por lo tanto este proceso podría ser que se encontrase inhibido debido al incremento de GABA existente en los ratones Nrf2 (-/-). El análisis de los niveles de los metabolitos de 5-HT y DA ayuda a entender en qué punto se encuentra alterada la ruta metabólica de estas monoaminas. Si estuviera aumentada la degradación, se encontrarían mayores niveles de 5-HIAA en el caso de la serotonina y de HVA y DOPAC en el caso de la DA. Sin embargo, se observa que los niveles de metabolitos se encuentran igual o ligeramente disminuidos, por lo que probablemente esté afectada la síntesis. Precisamente, se ha descrito que la inflamación afecta a la síntesis de 5-HT mediante el incremento de la actividad de la indolamino-2,3-dioxigenasa <sup>38,87</sup> de manera que queda menos triptófano disponible para la síntesis de serotonina. Además, la inflamación también afecta a la síntesis de tetrahidrobiopterina (BH4) <sup>7,41</sup>, cofactor de la enzima limitante de la síntesis de DA y NA, la tirosina hidroxilasa. Por esta razón, si se midieran los niveles de NA probablemente también estarían disminuidos.

Durante los últimos 10 años, la investigación de los mecanismos moleculares y celulares de los trastornos del estado de ánimo se ha movido de la teoría monoaminérgica a la teoría de la neuroplasticidad. La teoría de la neuroplasticidad se planteo al observarse una disminución del volumen de distintas zonas cerebrales, principalmente el hipocampo, en pacientes con depresión. Sin embargo, se han publicado artículos que defienden que la neuroplasticidad no es

responsable del efecto de los antidepresivos <sup>43</sup>, poniendo en entre dicho la validez de esta teoría. Entre los factores neurotróficos más estudiados en el contexto de la depresión, se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) <sup>235</sup>, el BDNF <sup>236,237</sup>, el VEGF <sup>238,239</sup> y el factor de crecimiento nervioso (VGF) <sup>240</sup>. Los niveles tanto de ARNm como de proteína de BDNF han sido estudiados en el hipocampo y en la corteza prefrontal de cerebros post mortem de víctimas de suicidio y se observó que se encontraban disminuidos <sup>236</sup>. Por otro lado, en modelos animales de depresión se ha demostrado que la expresión de VEGF en el hipocampo es inducida por distintas clases de antidepresivos (fluoxetina, sertralina, amitriptilina, venlafaxina y la desipramina) <sup>241</sup> y por terapia electroconvulsiva. Dados estos antecedentes, se estudió la expresión de pro-BDNF, BDNF y VEGF en ratones salvajes y Nrf2 (-/-) mediante WB. Tanto pro-BDNF como BDNF y VEGF se encuentran disminuidos en el hipocampo de ratones Nrf2 (-/-) en comparación con los ratones salvajes (Fig. 15 A, B y Fig. 16 A). La disminución de pro-BDNF y BDNF probablemente se acompañe de una alteración de CREB, ya sea de una disminución de su expresión o de una reducción de su fosforilación, ya que, al fosforilarse se activa, se une al DNA y finalmente transcribe para BDNF. Sorprendentemente, y siguiendo con la discusión de los resultados de la expresión de neurotrofinas, se observó un aumento en la expresión de VEGF en la corteza prefrontal (Fig. 16 B). Este aumento podría ser desconcertante, sin embargo en el caso de la expresión de BDNF se ha descrito que se encuentra disminuida en el hipocampo, pero aumenta en el núcleo accumbens de tejidos post-mortem de pacientes deprimidos <sup>242</sup>. Por lo tanto, se puede observar una disminución o un aumento de la expresión de neurotrofinas dependiendo del área cerebral.

Para terminar con el estudio de la neuroplasticidad, se analizó también la expresión de sinaptofisina. La sinaptofisina se emplea como marcador de sinapsis, ya que se trata de una proteína integral presente en vesículas presinápticas. Es interesante observar que la disminución de sinaptofisina se observa en la corteza prefrontal (Fig 17 B), zona en la que también se encontró una disminución de la concentración de serotonina y dopamina. La técnica de extracción de aminas empleada en esta tesis no permite cuantificar la cantidad de estas en el espacio sináptico, sino la concentración total. Al observar una disminución de la

sinaptofisina y también de la concentración global de 5-HT y DA, muy probablemente la concentración de estas esté disminuida en el espacio sináptico.

Ya que los astrocitos son los principales responsables de la síntesis de factores tróficos y en la depresión mayor se ha descrito una disminución en el número de astrocitos en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas<sup>243</sup>, estudiamos la morfología astrogial por inmunofluorescencia en el hipocampo. En nuestro modelo, se encontró una disminución de la fluorescencia de GFAP en el hipocampo en los ratones nulos para Nrf2 en comparación con los salvajes, acompañado de una reducción del número de procesos y de su longitud (Fig. 18). Esta atrofia astrogial concuerda con la disminución de factores tróficos observada en el hipocampo de los ratones Nrf2 (-/-) (Fig. 15 y 16). Probablemente, al eliminar los mecanismos protectores dependientes de Nrf2, la astroglía se ve afectada y, de esta manera la síntesis de neurotrofinas se ve comprometida.

Por otro lado GSK3 $\beta$  es una cinasa muy estudiada en el contexto de la depresión, además de estar regulando la actividad de Nrf2. Existen numerosos mecanismos de regulación de esta proteína. Por ejemplo, la fosforilación en la serina 9 la inactiva y la fosforilación en la tirosina 216 la activa; siendo la activación de GSK3 $\beta$  negativa en este contexto. Las evidencias que sustentan la participación de GSK3 $\beta$  en la depresión son numerosas. i) Los primeros datos se publicaron por primera vez en 1996, cuando dos artículos mostraron que el clásico estabilizador del ánimo, el litio, era un inhibidor directo de la GSK3<sup>244,245</sup>. También es conocido que ii) distintos neurotransmisores implicados en la fisiopatología de los trastornos del ánimo regulan GSK3 y que iii) la administración de los inhibidores de la recaptación de monoaminas, fluoxetina e imipramina, aumentan en gran medida la fosforilación de la serina 9 de GSK3 en cerebro de ratón<sup>246,247</sup>. iv) Además, los inhibidores de GSK3 $\beta$  se han descrito en la literatura como antidepresivos potenciales<sup>196,248,249</sup>. v) Por último, un estudio post-mortem con cerebros de sujetos suicidas y no suicidas reveló un aumento en la actividad de GSK3 $\beta$  en sujetos deprimidos<sup>250</sup>. En nuestro modelo, la fosforilación en la Ser9 se encuentra disminuida en la corteza prefrontal de ratones Nrf2 (-/-) cuando se compara con ratones salvajes (Fig. 19 C); este resultado podría ser compatible con un aumento de la actividad de GSK3 $\beta$ . Es interesante destacar que las diferencias de la actividad de GSK3 $\beta$  fueron encontradas en la corteza prefrontal, el mismo

área descrita por estar afectada por Beaulieu et al. en humanos. Además, en esta misma zona existe una disminución de 5-HT (Fig. 12 C), neurotransmisor que al interactuar con su receptor inactiva y por lo tanto defosforila GSK3 $\beta$ , por lo que se puede interpretar que la disminución de la fosforilación de GSK3 $\beta$  en la serina 9 es debida a la disminución de 5-HT. En concordancia con estos datos, en el hipocampo no se encontró alteración en la fosforilación de GSK3 $\beta$  (Fig. 19 A) ni tampoco en los niveles de serotonina (Fig. 12 A). Continuando con el estudio de la activación de GSK3 $\beta$ , medimos la fosforilación en la tirosina 216; sin embargo, este residuo no presentó ninguna alteración.

Como ya hemos mencionado previamente, esta no es la primera vez que se relaciona Nrf2 con GSK3 $\beta$ : se ha descrito que GSK3 $\beta$  regula la degradación de Nrf2<sup>168-170</sup> de una manera independiente de Keap1<sup>251</sup>. Así, según los resultados de esta tesis doctoral, no sólo GSK3 $\beta$  está regulando a la baja a Nrf2 sino que la ablación de Nrf2 conduce a una mayor fosforilación de GSK3 $\beta$  en su residuo Ser9 en una de las dos zonas estudiadas. Recientemente el grupo de Maes ha publicado una revisión en la que se menciona a Nrf2 y a GSK3 $\beta$  como nuevas dianas terapéuticas frente a la depresión<sup>196</sup>. Sin embargo, como venimos discutiendo, estos mecanismos podrían estar regulándose de forma recíproca.

Después de haber observado diversas alteraciones en los parámetros típicos de la depresión que apoyaron los resultados del comportamiento, intentamos dilucidar el mecanismo por el que podrían estar ocurriendo los fenómenos observados tanto a nivel comportamental, como celular y bioquímico. Partiendo de la teoría inflamatoria de la depresión, se estudió el estado de la microglía en los ratones salvajes y Nrf2 (-/-), esperando encontrar microgliosis. En 1991, Smith propuso la teoría macrofágica de la depresión<sup>252</sup>, según la cual una secreción excesiva de monocinas por los macrófagos activados estaría implicada en la fisiopatología de la depresión. Además, se ha descrito que niveles elevados de glucocorticoides o el estrés son capaces de activar la microglía *in vivo*<sup>253</sup>. Así, cuando la microglía se activa, prolifera y migra a la zona de la lesión. Allí expresan citocinas pro-inflamatorias, entre otras moléculas. Al realizar cortes histológicos para estudiar el estado de la microglía en los ratones deficientes en Nrf2 observamos que presentan un ligero aumento en el tamaño del cuerpo y una disminución de la longitud de los procesos (Fig 20). A fin de analizar estos datos con mayor detalle,

se cuantificó el ARNm de F4/80 y Mac-1; se encontró que ambos estaban aumentados en el hipocampo (Fig. 21 A y B) y también en la corteza prefrontal (Fig. 21 C y D) en los ratones Nrf2 (-/-).

Llegados a este punto, donde teníamos evidencias que apuntaban a que el origen de la depresión de estos ratones podía ser la inflamación, se administró un AINE para revertir el comportamiento depresivo de los ratones Nrf2 (-/-) con el objetivo de demostrar esta hipótesis. El protocolo de administración que empleamos, basado en datos bibliográficos<sup>209,210</sup> que demostraron revertir el aumento del tiempo de inmovilidad inducida por LPS en ratones, consistió en administrar rofecoxib durante 7 días a una dosis de 2 mg/kg. En estos experimentos, el rofecoxib administrado a ratones salvajes no tuvo ningún efecto en la PSC (Fig. 24 A), en coherencia con los datos ya mencionados de Singal et al. y Jain et al.<sup>209,210</sup>, mientras que en ratones Nrf2 (-/-) se produjo una disminución en el tiempo de inmovilidad hasta niveles basales. La reversión del tiempo de inmovilidad en la PSC fue acompañada de una ausencia de alteraciones en el número de cruces y levantamientos en la PCA (Fig. 25 A y B). Esto indica que la disminución del tiempo de inmovilidad no se debe a una disminución en la actividad motora. En la PVS, hubo una tendencia clara hacia la reversión de la disminución del tiempo de acicalamiento en los ratones deficientes en Nrf2 tratados con rofecoxib, aunque dichos valores no alcanzaron significación estadística (Fig. 24 B). La ausencia de significación estadística parece debida a la dispersión de los datos de manera que analizando estos datos mediante una t de Student de una cola (prueba estadística menos restrictiva) sí se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los ratones Nrf2 (-/-) y los Nrf2 (-/-) tratados con rofecoxib.

Además del comportamiento, se analizaron los niveles de neurotransmisores en respuesta a rofecoxib tanto en ratones salvajes como nulos para Nrf2. Como se puede ver en la figura 27 A el rofecoxib restableció los niveles de DA en los ratones Nrf2 (-/-) sin afectar a los ratones (+/+). Además, los metabolitos de DA, HVA y DOPAC no se alteraron con este tratamiento. Estos datos refuerzan la idea de que el paso metabólico alterado es la síntesis y no la degradación de la DA, probablemente por la inhibición de la síntesis de BH4. Por otro lado, los niveles de glutamato y los de 5-HT no se revirtieron con el tratamiento con rofecoxib (Fig 26 y 28). Y finalmente, los niveles de GABA, se restauraron con el tratamiento

con rofecoxib en los ratones Nrf2 (-/-) pero al tratar a los ratones salvajes con este antiinflamatorio, observamos un incremento (Fig. 29). Todos estos datos, viene a señalar que el neurotransmisor implicado en la reversión de la depresión de los ratones nulos para Nrf2 es la DA, concretamente por un efecto sobre su síntesis, como ya se ha mencionado.

Habiendo demostrado que la ablación de Nrf2 conduce a un estado depresivo tanto a nivel de comportamiento como molecular y celular debido a un mecanismo inflamatorio, planteamos la manipulación farmacológica de Nrf2 como siguiente estrategia para sustentar y demostrar nuestra hipótesis. Los modelos con ratones transgénicos presentan la desventaja de que los efectos observados pueden deberse a un mecanismo de alostasis frente a la eliminación del gen en cuestión y no a una verdadera relación entre el gen y el efecto observado. Como primer paso, empleamos el LPS como inductor de depresión de origen inflamatorio<sup>102,105,106</sup>. Los primeros experimentos demostraron que el LPS, a las dos dosis empleadas, fue capaz de inducir depresión, demostrado por observarse un aumento en el tiempo de inmovilidad en la PSC (Fig. 30), una disminución en el tiempo de acicalamiento en la PVS (Fig. 31) y una pérdida de peso a las 24 h (Fig. 32).

Como activador de Nrf2, utilizamos SFN un compuesto de origen natural que presenta una potente actividad inductora de Nrf2. El diseño experimental consistió en administrar SFN durante 7 días, a las 24 h se administró el LPS tras lo que se realizaron las pruebas de comportamiento. El LPS aumentó el tiempo de inmovilidad y el SFN fue capaz de prevenir este aumento (Fig. 34 A). El LPS también produjo una respuesta anhedónica y el SFN tuvo una tendencia a revertirla, a pesar de que no fue estadísticamente significativa, nuevamente debido a la desviación de los datos (Fig. 34 B).

Uno de los problemas que presentan los fármacos que se evalúan para el tratamiento de las enfermedades del SNC es el paso a través de la BHE. Respecto a esto, Innamorato et al. 2008<sup>192</sup> y Jazwa et al. 2011<sup>254</sup> demostraron que el SFN la atraviesa e induce una serie de proteínas codificadas por Nrf2 en el SNC, HO-1 entre ellos. Sin embargo, las dosis de SFN empleadas tanto en esos dos estudios como en otros existentes en la literatura son mayores que la descrita en esta tesis doctoral<sup>192,255-258</sup>. Por ello, analizamos inicialmente si el SFN, en nuestras



---

condiciones experimentales, estaba activando Nrf2. Como se puede ver en las figuras 35 A y B, justo en el momento de la administración de LPS y tras 24 h de la última administración de SFN, existía un aumento en la expresión de dos proteínas dependientes de la activación de Nrf2 como son la HO-1 y la GLCm. Por ello, se puede concluir que efectivamente existe una modulación del factor de transcripción.

El efecto antidepresivo del SFN, se debe como hemos dicho a un efecto preventivo no agudo, ya que la administración de SFN se realiza antes del estímulo deletéreo del LPS. La administración de SFN se encuentra activando una serie de cascadas de señalización que ‘preparan’ al organismo frente a un estímulo negativo posterior. Por ello, como segundo paso, se estudiaron las proteínas que podrían estar inducidas justo en el momento de la administración del LPS y que pudieran estar suponiendo un escudo protector frente al LPS. Las proteínas elegidas fueron aquellas implicadas en la neurobiología de la depresión. Así, como se observa en la figura 36, el SFN induce pro-BDNF, BDNF y VEGF pero no sinaptofisina. Es interesante recalcar que la eliminación de Nrf2 conduce a la disminución de pro-BDNF, BDNF y VEGF; y su activación, a un aumento. Sin embargo, en el caso de la sinaptofisina, el SFN no fue capaz de activarlo, por lo que probablemente la disminución observada en los ratones Nrf2 se deba a un mecanismo secundario indirecto, quizá relacionado con la disminución de neurotransmisores observados en el mismo área donde existe la disminución de su expresión.

Como paso final del estudio de los mecanismos implicados en el efecto antidepresivo del SFN frente a LPS, estudiamos si el SFN estaba ejerciendo un efecto antiinflamatorio. Aunque el efecto antiinflamatorio del SFN frente al LPS ha sido previamente analizado <sup>192</sup>, se empleaban varias dosis ip de 50 mg/kg, dosis 25 veces superior a la empleada en esta tesis. Por esta razón analizamos la expresión de iNOS y F4/80 en nuestras condiciones experimentales. En las figuras 37 A y B se muestra que el SFN es capaz de prevenir la microgliosis/infiltración de macrófagos periféricos inducida por LPS; además, también previene la inducción de iNOS, que como ya se ha mencionado es una enzima inducida por estímulos pro-inflamatorios. Estos resultados coinciden con los descritos

Innamorato en 2008 <sup>192</sup>, que también muestran que el SFN revierte el aumento de F4/80 inducido por LPS, además de la inducción de iNOS, IL6 y TNF $\alpha$ .

Como parte final, recurrimos otro modelo de depresión en este caso inducido por estrés (ECS). En este aspecto el modelo de ECS presenta muchas ventajas ya que es un modelo de enfermedad crónica y permite que los tratamientos farmacológicos a evaluar se administren una vez la enfermedad esté instaurada. Además, se ha descrito previamente que el ECS induce inflamación <sup>259,260</sup> por lo que, en principio, pensamos que podría suponer un modelo muy adecuado para estudiar el efecto antidepresivo de la activación de Nrf2 en el contexto de la teoría inflamatoria de la depresión. Sin embargo, como observamos en la figura 38, el SFN no tuvo ningún efecto sobre la respuesta anhedónica inducida por ECS. Sin embargo, el tratamiento crónico con SFN sí que indujo la expresión de HO-1 y revirtió la microgliosis, por lo tanto, fue capaz de reducir la inflamación inducida por ECS además de activar Nrf2 (Fig 41).

La falta de respuesta del SFN en las pruebas de comportamiento en el modelo de ECS se podría atribuir a distintos factores, que analizamos a continuación:

1. *La dosis o pauta de administración puede no ser la adecuada.* La elección de la dosis se basó en los experimentos realizados con LPS, en los que a 1 mg/kg/día observamos respuesta terapéutica mientras que las dosis descritas en la literatura variaban entre 3 – 50 mg/kg. Sin embargo, a la vista de los resultados teorizamos que al ser el protocolo de administración más prolongado (5 semanas), una dosis más baja hubiera sido más adecuada. En este aspecto es importante resaltar, por un lado que el SFN administrado de manera crónica no produjo pérdida de peso (Fig 39 A) por lo que se puede descartar un efecto tóxico del SFN administrado durante 5 semanas. Por otro, no tiene un efecto inhibitor del SNC, ya que no se observó una disminución en el tiempo que resisten los ratones realizando la prueba del Rota-Rod (Fig. 40).
2. *El mecanismo principal conducente a la aparición de anhedonia no está relacionado con inflamación en este modelo.* De hecho, parece ser que los fármacos con un claro efecto noradrenérgico son los que revierten la

anhedonia en el modelo de ECS. Sería interesante realizar nuevamente el protocolo analizando los déficits cognitivos u otras pruebas comportamentales que se alteran en el ECS para evaluar si a este nivel se observa alguna mejoría.

3. *El SFN no es una buena herramienta farmacológica frente a depresión inducida por estrés.* Sería interesante estudiar cómo responden los ratones nulos para Nrf2 en el modelo de ECS o en el modelo de estrés por derrota social crónica, un modelo de depresión social, y ver si se potencia los efectos de estos modelos en los ratones Nrf2 (-/-) o no y así poder concluir fehacientemente sobre la participación de Nrf2 en este tipo de depresión. Esto demostraría también que Nrf2 es un factor de vulnerabilidad frente a este tipo de trastornos depresivos.

Creemos que los resultados de este estudio proporcionan información clara y novedosa sobre la participación del factor de transcripción Nrf2 en la inflamación y la depresión. Por tanto, sería interesante estudiar si los pacientes que sufren depresión con niveles aumentados de marcadores inflamatorios muestran una alteración en la expresión / actividad de Nrf2, si existen alteraciones genéticas en Nrf2 que supongan un factor de vulnerabilidad frente a la depresión y si la inducción farmacológica de Nrf2 podría tener efecto en el subgrupo de pacientes refractarios a los antidepresivos clásicos, que como ya hemos dicho presentan niveles elevados de marcadores inflamatorios.



## **7. Conclusions/ Conclusiones**

---



## Conclusions

- Nrf2 (-/-) mice show a depressive-like phenotype as demonstrated in three different behavioral tests (tail-suspension test, forced swimming test and splash test); alterations in locomotion (open field test) were not observed.
- Analysis of depressive-related molecular parameters show that Nrf2 (-/-) mice exhibit decreased trophic factors (BDNF, VEGF), reduction of synaptic markers (synaptophysin) and alterations in cell signaling (GSK3 $\beta$ ).
- Nrf2 ko mice exhibit microgliosis, denoting an increased inflammatory state.
- The depressive phenotype shown in Nrf2 (-/-) mice is reversed by subchronic administration of a COX-2 selective inhibitor, rofecoxib. This result supports the fact that the depressive-like behaviour is due to an increase in inflammation.

- Induction of Nrf2 by sulforaphane was able to reverse LPS-induced depressive-like-behavior. In addition, SFN had an anti-inflammatory effect through activation of Nrf2, as it reversed LPS-induced iNOS overexpression. SFN induced BDNF, as an indicator of a positive effect on brain neuroplasticity and potentially against depression.
- Sulforaphane administered chronically increased HO-1 expression and reduced microgliosis, but it did not improve the anhedonic response in the chronic mild stress model of depression.

## Conclusiones

0. El estudio del comportamiento de ratones Nrf2 (+/+) y (-/-) revelan que los (-/-) presentan un fenotipo depresivo demostrado mediante tres test de comportamiento (prueba de natación forzada, prueba de la suspensión de la cola y prueba de la sacarosa). Sin embargo, no presentan ninguna alteración en la locomoción (prueba de campo abierto)
1. El análisis de distintos parámetros moleculares muestran que los ratones Nrf2 (-/-) presentan alteraciones típicas de la depresión como son disminución de factores tróficos (BDNF, VEGF), macadores sinápticos (sinaptofisina) y de señalización celular (GSK3 $\beta$ ).
2. Los ratones Nrf2 (-/-) muestran microgliosis a nivel hipocampal, denotando un estado inflamatorio aumentado.
3. El fenotipo depresivo de los ratones Nrf2 (-/-) se revierte al administrar dosis repetidas de un inhibidor selectivo de la COX-2, el rofecoxib. Este resultado apoya que el fenotipo depresivo se debe a un aumento de marcadores inflamatorios.
4. El inductor de Nrf2 sulforafano revirtió la depresión de origen inflamatorio inducida por la administración ip de LPS. Además, mostró un efecto antiinflamatorio a través de la activación de Nrf2, ya que revierte la inducción de iNOS producida por LPS.



5. La administración crónica de sulforafano incrementa la expresión de HO-1 y la microgliosis pero no modifica la respuesta anhedónica inducida por depresión secundaria a estrés crónico suave.



## **8. Bibliografía**

---



1. Belmaker, R.H. & Agam, G. Major depressive disorder. *N Engl J Med* **358**, 55-68 (2008).
2. *DSM-IV-TR. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*, (Masson, Barcelona, 2003).
3. Nestler, E.J., *et al.* Neurobiology of depression. *Neuron* **34**, 13-25 (2002).
4. WorldHealthOrganization. Conquering depression. (2001).
5. Huang, J., *et al.* Identification of a novel serine/threonine kinase that inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and p53-induced transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 774-778 (2003).
6. Li, Z.F., Xu, C.M., Yin, S.M. & Wen, L.R. [Development of morphology and mechanical properties in polyurethane-urea(PUU) curing process]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* **22**, 774-778 (2002).
7. Li, W., Knowlton, D., Woodward, W.R. & Habecker, B.A. Regulation of noradrenergic function by inflammatory cytokines and depolarization. *J Neurochem* **86**, 774-783 (2003).
8. Li, Y. & Sarkar, F.H. Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells. *J Nutr* **132**, 3623-3631 (2002).
9. Weissman, M.M., Warner, V., Wickramaratne, P., Moreau, D. & Olfson, M. Offspring of depressed parents. 10 Years later. *Arch Gen Psychiatry* **54**, 932-940 (1997).
10. Bennett, P.J., *et al.* Tryptophan hydroxylase polymorphisms in suicide victims. *Psychiatr Genet* **10**, 13-17 (2000).

11. Wurtman, R.J. Genes, stress, and depression. *Metabolism* **54**, 16-19 (2005).
12. Lopez-Leon, S., *et al.* Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol Psychiatry* **13**, 772-785 (2008).
13. Kendler, K.S., Karkowski, L.M. & Prescott, C.A. Stressful life events and major depression: risk period, long-term contextual threat, and diagnostic specificity. *J Nerv Ment Dis* **186**, 661-669 (1998).
14. Hicks, B.M., DiRago, A.C., Iacono, W.G. & McGue, M. Gene-environment interplay in internalizing disorders: consistent findings across six environmental risk factors. *J Child Psychol Psychiatry* **50**, 1309-1317 (2009).
15. Harvey, M., Belleau, P. & Barden, N. Gene interactions in depression: pathways out of darkness. *Trends Genet* **23**, 547-556 (2007).
16. Caspi, A., *et al.* Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* **301**, 386-389 (2003).
17. Lazary, J., *et al.* New evidence for the association of the serotonin transporter gene (SLC6A4) haplotypes, threatening life events, and depressive phenotype. *Biol Psychiatry* **64**, 498-504 (2008).
18. Gillespie, N.A., Whitfield, J.B., Williams, B., Heath, A.C. & Martin, N.G. The relationship between stressful life events, the serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype and major depression. *Psychol Med* **35**, 101-111 (2005).
19. Richardson-Jones, J.W., *et al.* 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* **65**, 40-52 (2010).
20. Hammen, C. & Brennan, P.A. Depressed adolescents of depressed and nondepressed mothers: tests of an interpersonal impairment hypothesis. *J Consult Clin Psychol* **69**, 284-294 (2001).
21. Hammen, C. Stress generation in depression: reflections on origins, research, and future directions. *J Clin Psychol* **62**, 1065-1082 (2006).
22. Mill, J. & Petronis, A. Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry* **12**, 799-814 (2007).
23. Wichers, M., *et al.* Mechanisms of gene-environment interactions in depression: evidence that genes potentiate multiple sources of adversity. *Psychol Med* **39**, 1077-1086 (2009).
24. Henry, N.L., Stearns, V., Flockhart, D.A., Hayes, D.F. & Riba, M. Drug interactions and pharmacogenomics in the treatment of breast cancer and depression. *Am J Psychiatry* **165**, 1251-1255 (2008).
25. Schildkraut, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* **122**, 509-522 (1965).
26. Blier, P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *Eur Neuropsychopharmacol* **13**, 57-66 (2003).
27. Kennedy, S.H., Rizvi, S., Fulton, K. & Rasmussen, J. A double-blind comparison of sexual functioning, antidepressant efficacy, and tolerability between agomelatine and venlafaxine XR. *J Clin Psychopharmacol* **28**, 329-333 (2008).
28. Guiard, B.P., El Mansari, M. & Blier, P. Prospect of a dopamine contribution in the next generation of antidepressant drugs: the triple reuptake inhibitors. *Curr Drug Targets* **10**, 1069-1084 (2009).
29. Doris, A., Ebmeier, K. & Shajahan, P. Depressive illness. *Lancet* **354**, 1369-1375 (1999).

30. Freis, E.D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med* **251**, 1006-1008 (1954).
31. Barsa, J.A. & Kline, N.S. Depression treated with chlorpromazine and promethazine. *Am J Psychiatry* **113**, 744-745 (1957).
32. Delay, J., Deniker, P., Buisson, J.F. & Haim, A. [Treatment of depressive states by the isonicotinic acid derivatives isoniazid & iproniazid]. *Ann Med Psychol (Paris)* **117**, 125-132 (1959).
33. Trivedi, M.H., *et al.* Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* **163**, 28-40 (2006).
34. Ansorge, M.S., Hen, R. & Gingrich, J.A. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 8-17 (2007).
35. Pittenger, C. & Duman, R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 88-109 (2008).
36. Cryan, J.F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 571-625 (2005).
37. Zuo, Z., *et al.* Molecular docking and 3D-QSAR studies on the binding mechanism of statine-based peptidomimetics with beta-secretase. *Bioorg Med Chem* **13**, 2121-2131 (2005).
38. Capuron, L., *et al.* Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry* **54**, 906-914 (2003).
39. Zhu, C.B., Blakely, R.D. & Hewlett, W.A. The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2121-2131 (2006).
40. Duman, R.S. & Monteggia, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* **59**, 1116-1127 (2006).
41. Kitagami, T., *et al.* Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier. *Brain Res* **978**, 104-114 (2003).
42. Wang, Y., *et al.* Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H685-692 (2004).
43. Bouchet, V., *et al.* Host-derived sialic acid is incorporated into Haemophilus influenzae lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8898-8903 (2003).
44. Islas, C.A., *et al.* Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of fractions separated from a low-temperature coal tar: an attempt to develop a general method for characterising structures and compositions of heavy hydrocarbon liquids. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**, 774-784 (2002).
45. Li, X., Fox, J.G. & Padrid, P.A. Neoplastic diseases in ferrets: 574 cases (1968-1997). *J Am Vet Med Assoc* **212**, 1402-1406 (1998).
46. Chen, K., Liao, Y.F. & Zhang, J.T. The major aeroallergens in Guangxi, China. *Clin Allergy* **18**, 589-596 (1988).
47. David, D.J., *et al.* Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* **62**, 479-493 (2009).

48. Wu, T.Y., *et al.* High-altitude gastrointestinal bleeding: an observation in Qinghai-Tibetan railroad construction workers on Mountain Tanggula. *World J Gastroenterol* **13**, 774-780 (2007).
49. Chen, X.S., Li, W.Z., Jiang, C. & Ye, G.Y. Leprosy in China: epidemiological trends between 1949 and 1998. *Bull World Health Organ* **79**, 306-312 (2001).
50. Banasr, M., *et al.* Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry* **15**, 501-511 (2010).
51. Couzin-Frankel, J. Inflammation bares a dark side. *Science* **330**, 1621 (2010).
52. Maes, M., *et al.* Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte responses and interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. *Acta Psychiatr Scand* **84**, 379-386 (1991).
53. Maes, M., *et al.* Evidence for a systemic immune activation during depression: results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. *Psychol Med* **22**, 45-53 (1992).
54. Maes, M., *et al.* Higher alpha 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and lower retinol binding protein plasma levels during depression: further evidence for the existence of an inflammatory response during that illness. *J Affect Disord* **24**, 183-192 (1992).
55. Blume, J., Douglas, S.D. & Evans, D.L. Immune suppression and immune activation in depression. *Brain Behav Immun* **25**, 221-229 (2011).
56. Zorrilla, E.P., *et al.* The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun* **15**, 199-226 (2001).
57. Dowlati, Y., *et al.* A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* **67**, 446-457 (2010).
58. Bower, J.E., Ganz, P.A., Aziz, N. & Fahey, J.L. Fatigue and proinflammatory cytokine activity in breast cancer survivors. *Psychosom Med* **64**, 604-611 (2002).
59. Motivala, S.J., Sarfatti, A., Olmos, L. & Irwin, M.R. Inflammatory markers and sleep disturbance in major depression. *Psychosom Med* **67**, 187-194 (2005).
60. Miller, A.H., Maletic, V. & Raison, C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* **65**, 732-741 (2009).
61. Sluzewska, A., Sobieska, M. & Rybakowski, J.K. Changes in acute-phase proteins during lithium potentiation of antidepressants in refractory depression. *Neuropsychobiology* **35**, 123-127 (1997).
62. Lanquillon, S., Krieg, J.C., Bening-Abu-Shach, U. & Vedder, H. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* **22**, 370-379 (2000).
63. Fitzgerald, P., *et al.* Cutaneous glucocorticoid receptor sensitivity and pro-inflammatory cytokine levels in antidepressant-resistant depression. *Psychol Med* **36**, 37-43 (2006).
64. Reichenberg, A., *et al.* Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* **58**, 445-452 (2001).
65. Brydon, L., Harrison, N.A., Walker, C., Steptoe, A. & Critchley, H.D. Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity



- and psychomotor slowing in humans. *Biol Psychiatry* **63**, 1022-1029 (2008).
66. Harrison, N.A., *et al.* Inflammation causes mood changes through alterations in subgenual cingulate activity and mesolimbic connectivity. *Biol Psychiatry* **66**, 407-414 (2009).
67. Harrison, N.A., *et al.* Neural origins of human sickness in interoceptive responses to inflammation. *Biol Psychiatry* **66**, 415-422 (2009).
68. Eisenberger, N.I., *et al.* Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward. *Biol Psychiatry* **68**, 748-754 (2010).
69. Hannestad, J., DellaGioia, N., Ortiz, N., Pittman, B. & Bhagwagar, Z. Citalopram reduces endotoxin-induced fatigue. *Brain Behav Immun* **25**, 256-259 (2011).
70. Musselman, D.L., *et al.* Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med* **344**, 961-966 (2001).
71. Raison, C.L., Demetrashvili, M., Capuron, L. & Miller, A.H. Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs* **19**, 105-123 (2005).
72. Raison, C.L., *et al.* Depression during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy: prevalence and prediction. *J Clin Psychiatry* **66**, 41-48 (2005).
73. Capuron, L., *et al.* Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals? *J Affect Disord* **119**, 181-185 (2009).
74. Raison, C.L., *et al.* Paroxetine for prevention of depressive symptoms induced by interferon-alpha and ribavirin for hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* **25**, 1163-1174 (2007).
75. Kendler, K.S., Karkowski, L.M. & Prescott, C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* **156**, 837-841 (1999).
76. Bierhaus, A., *et al.* A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1920-1925 (2003).
77. Johnson, J.D., *et al.* Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* **135**, 1295-1307 (2005).
78. Nance, D.M. & Sanders, V.M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* **21**, 736-745 (2007).
79. Tracey, K.J. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* **9**, 418-428 (2009).
80. Koo, J.W., Russo, S.J., Ferguson, D., Nestler, E.J. & Duman, R.S. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2669-2674 (2010).
81. Nathan, C. Epidemic inflammation: pondering obesity. *Mol Med* **14**, 485-492 (2008).
82. Raison, C.L., *et al.* Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. *Biol Psychiatry* **65**, 296-303 (2009).
83. Juengling, F.D., *et al.* Prefrontal cortical hypometabolism during low-dose interferon alpha treatment. *Psychopharmacology (Berl)* **152**, 383-389 (2000).

84. Capuron, L., *et al.* Basal ganglia hypermetabolism and symptoms of fatigue during interferon-alpha therapy. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2384-2392 (2007).
85. Qin, L., *et al.* Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**, 453-462 (2007).
86. Felger, J.C., *et al.* Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry* **62**, 1324-1333 (2007).
87. Bonaccorso, S., *et al.* Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *J Clin Psychopharmacol* **22**, 86-90 (2002).
88. Stone, T.W. & Darlington, L.G. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 609-620 (2002).
89. Zhu, C.B., *et al.* Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* **35**, 2510-2520 (2010).
90. Moron, J.A., *et al.* Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity. *J Neurosci* **23**, 8480-8488 (2003).
91. Tilleux, S. & Hermans, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J Neurosci Res* **85**, 2059-2070 (2007).
92. Barrientos, R.M., *et al.* Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience* **121**, 847-853 (2003).
93. Ben Menachem-Zidon, O., *et al.* Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **33**, 2251-2262 (2008).
94. Koo, J.W. & Duman, R.S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 751-756 (2008).
95. Besedovsky, H.O. & del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* **17**, 64-102 (1996).
96. Capuron, L., *et al.* Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon-alpha with development of depression during interferon-alpha therapy. *Am J Psychiatry* **160**, 1342-1345 (2003).
97. Pace, T.W., Hu, F. & Miller, A.H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun* **21**, 9-19 (2007).
98. Pariante, C.M., *et al.* The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* **140**, 4359-4366 (1999).
99. Hu, F., Pace, T.W. & Miller, A.H. Interferon-alpha inhibits glucocorticoid receptor-mediated gene transcription via STAT5 activation in mouse HT22 cells. *Brain Behav Immun* **23**, 455-463 (2009).

100. Smoak, K.A. & Cidlowski, J.A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* **125**, 697-706 (2004).
101. Raison, C.L., Capuron, L. & Miller, A.H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* **27**, 24-31 (2006).
102. Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W. & Kelley, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* **9**, 46-56 (2008).
103. Irwin, M.R. & Miller, A.H. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun* **21**, 374-383 (2007).
104. Muller, N. & Schwarz, M.J. A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **258 Suppl 2**, 97-106 (2008).
105. Dantzer, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* **933**, 222-234 (2001).
106. Konsman, J.P., Parnet, P. & Dantzer, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* **25**, 154-159 (2002).
107. Yirmiya, R., *et al.* Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology* **24**, 531-544 (2001).
108. O'Connor, J.C., *et al.* Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* **14**, 511-522 (2009).
109. Dantzer, R., Wollman, E., Vitkovic, L. & Yirmiya, R. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry* **4**, 328-332 (1999).
110. MohanKumar, S.M., MohanKumar, P.S. & Quadri, S.K. Effects of bacterial lipopolysaccharide on central monoamines and fever in the rat: involvement of the vagus. *Neurosci Lett* **284**, 159-162 (2000).
111. Leonard, B.E. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **25**, 767-780 (2001).
112. Maier, S.F. & Watkins, L.R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 829-841 (2005).
113. Kempermann, G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* **4**, 17-33 (2002).
114. Kempermann, G. & Kronenberg, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* **54**, 499-503 (2003).
115. Kronenberg, G., *et al.* Reduced hippocampal neurogenesis in the GR(+/-) genetic mouse model of depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **259**, 499-504 (2009).
116. Lloyd, C. Life events and depressive disorder reviewed. II. Events as precipitating factors. *Arch Gen Psychiatry* **37**, 541-548 (1980).
117. Kessler, R.C. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* **48**, 191-214 (1997).

118. Paykel, E.S., Cooper, Z., Ramana, R. & Hayhurst, H. Life events, social support and marital relationships in the outcome of severe depression. *Psychol Med* **26**, 121-133 (1996).
119. Hammen, C. Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* **1**, 293-319 (2005).
120. Duman, R.S., Malberg, J. & Thome, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* **46**, 1181-1191 (1999).
121. Mazure, C.M., Bruce, M.L., Maciejewski, P.K. & Jacobs, S.C. Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response. *Am J Psychiatry* **157**, 896-903 (2000).
122. McGonagle, K.A. & Kessler, R.C. Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. *Am J Community Psychol* **18**, 681-706 (1990).
123. Hu, J. Health-related quality of life in low-income older African Americans. *J Community Health Nurs* **24**, 253-265 (2007).
124. Kub, J., *et al.* Life events, chronic stressors, and depressive symptoms in low-income urban mothers with asthmatic children. *Public Health Nurs* **26**, 297-306 (2009).
125. Siegrist, J. Chronic psychosocial stress at work and risk of depression: evidence from prospective studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **258 Suppl 5**, 115-119 (2008).
126. Heene, E., Buysse, A. & Van Oost, P. An interpersonal perspective on depression: the role of marital adjustment, conflict communication, attributions, and attachment within a clinical sample. *Fam Process* **46**, 499-514 (2007).
127. Riso, L.P., Miyatake, R.K. & Thase, M.E. The search for determinants of chronic depression: a review of six factors. *J Affect Disord* **70**, 103-115 (2002).
128. Weiss, E.L., Longhurst, J.G. & Mazure, C.M. Childhood sexual abuse as a risk factor for depression in women: psychosocial and neurobiological correlates. *Am J Psychiatry* **156**, 816-828 (1999).
129. Hovens, J.G., *et al.* Childhood life events and childhood trauma in adult patients with depressive, anxiety and comorbid disorders vs. controls. *Acta Psychiatr Scand* **122**, 66-74 (2010).
130. Lizardi, D., Thompson, R.G., Keyes, K. & Hasin, D. Parental divorce, parental depression, and gender differences in adult offspring suicide attempt. *J Nerv Ment Dis* **197**, 899-904 (2009).
131. Willner, P. & Mitchell, P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol* **13**, 169-188 (2002).
132. Willner, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* **52**, 90-110 (2005).
133. Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S. & Muscat, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* **93**, 358-364 (1987).
134. Willner, P., Muscat, R. & Papp, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* **16**, 525-534 (1992).

135. Elizalde, N., *et al.* Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* **199**, 1-14 (2008).
136. Willner, P., Moreau, J.L., Nielsen, C.K., Papp, M. & Sluzewska, A. Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav* **60**, 129-134 (1996).
137. Solberg, L.C., Horton, T.H. & Turek, F.W. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am J Physiol* **276**, R152-161 (1999).
138. Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A. & Gass, P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* **29**, 2007-2017 (2004).
139. Griebel, G., *et al.* Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6370-6375 (2002).
140. Moreau, J.L., Scherschlicht, R., Jenck, F. & Martin, J.R. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol* **6**, 682-687 (1995).
141. Orsetti, M., *et al.* Effects of chronic administration of olanzapine, amitriptyline, haloperidol or sodium valproate in naive and anhedonic rats. *Int J Neuropsychopharmacol* **9**, 427-436 (2006).
142. Song, L., Che, W., Min-Wei, W., Murakami, Y. & Matsumoto, K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* **83**, 186-193 (2006).
143. Bergstrom, A., Jayatissa, M.N., Mork, A. & Wiborg, O. Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study. *Brain Res* **1196**, 41-52 (2008).
144. Ayensu, W.K., *et al.* Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiol Behav* **57**, 165-169 (1995).
145. Mineur, Y.S., Belzung, C. & Crusio, W.E. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* **150**, 251-259 (2007).
146. Kong, H., *et al.* Requirement of AQP4 for antidepressive efficiency of fluoxetine: implication in adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1263-1276 (2009).
147. Ritchie, L.J., De Butte, M. & Pappas, B.A. Chronic mild stress exacerbates the effects of permanent bilateral common carotid artery occlusion on CA1 neurons. *Brain Res* **1014**, 228-235 (2004).
148. Bachis, A., Cruz, M.I., Nosheny, R.L. & Mochetti, I. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci Lett* **442**, 104-108 (2008).
149. Silva, R., *et al.* Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience* **152**, 656-669 (2008).
150. Li, S., *et al.* Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci* **82**, 934-942 (2008).

151. Bessa, J.M., *et al.* The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* **14**, 764-773, 739 (2009).
152. Stein, E.J., *et al.* Chronic mild stress induces widespread decreases in thyroid hormone alpha1 receptor mRNA levels in brain--reversal by imipramine. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 281-286 (2009).
153. Grippo, A.J., Beltz, T.G., Weiss, R.M. & Johnson, A.K. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. *Biol Psychiatry* **59**, 309-316 (2006).
154. Jayatissa, M.N., Bisgaard, C.F., West, M.J. & Wiborg, O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. *Neuropharmacology* **54**, 530-541 (2008).
155. Chan, J.Y., Han, X.L. & Kan, Y.W. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11371-11375 (1993).
156. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y.W. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9926-9930 (1994).
157. Sankaranarayanan, K. & Jaiswal, A.K. Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* **279**, 50810-50817 (2004).
158. Kobayashi, A., *et al.* Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* **26**, 221-229 (2006).
159. Kobayashi, A., *et al.* Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**, 7130-7139 (2004).
160. Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W. & Diehl, J.A. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* **24**, 8477-8486 (2004).
161. Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J.V., Templeton, D.J. & Hannink, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **24**, 10941-10953 (2004).
162. Jain, A.K., Bloom, D.A. & Jaiswal, A.K. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* **280**, 29158-29168 (2005).
163. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* **279**, 31556-31567 (2004).
164. Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* **387**, 1311-1320 (2006).
165. Li, W., *et al.* Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J Biol Chem* **280**, 28430-28438 (2005).

166. Li, W., Yu, S.W. & Kong, A.N. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J Biol Chem* **281**, 27251-27263 (2006).
167. Theodore, M., *et al.* Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **283**, 8984-8994 (2008).
168. Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M. & Cuadrado, A. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **281**, 14841-14851 (2006).
169. Rojo, A.I., *et al.* Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Mol Cell Neurosci* **39**, 125-132 (2008).
170. Rojo, A.I., Sagarra, M.R. & Cuadrado, A. 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 (2008).
171. Zhou, B.P., *et al.* Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **6**, 931-940 (2004).
172. Papkoff, J. & Aikawa, M. WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 851-858 (1998).
173. Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L. & Wang, B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* **26**, 3365-3377 (2006).
174. Pan, W., *et al.* Beta-catenin relieves I-mfa-mediated suppression of LEF-1 in mammalian cells. *J Cell Sci* **119**, 4850-4856 (2006).
175. Wang, B. & Li, Y. Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 33-38 (2006).
176. Huang, H.C., Nguyen, T. & Pickett, C.B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**, 42769-42774 (2002).
177. Bloom, D.A. & Jaiswal, A.K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* **278**, 44675-44682 (2003).
178. Huang, H.C., Nguyen, T. & Pickett, C.B. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12475-12480 (2000).
179. Cullinan, S.B., *et al.* Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* **23**, 7198-7209 (2003).
180. Numazawa, S., Ishikawa, M., Yoshida, A., Tanaka, S. & Yoshida, T. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C334-342 (2003).
181. Papaiahgari, S., Kleeberger, S.R., Cho, H.Y., Kalvakolanu, D.V. & Reddy, S.P. NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced

- Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells. *J Biol Chem* **279**, 42302-42312 (2004).
182. Jain, A.K. & Jaiswal, A.K. GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem* **282**, 16502-16510 (2007).
183. Xu, C., *et al.* 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. *Mol Cancer Ther* **5**, 1918-1926 (2006).
184. Yuan, X., *et al.* Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol Carcinog* **45**, 841-850 (2006).
185. Pi, J., *et al.* Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* **42**, 1797-1806 (2007).
186. Lee, J.M. & Johnson, J.A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* **37**, 139-143 (2004).
187. Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D. & Yamamoto, M. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6379-6384 (2004).
188. Katsuoka, F., Motohashi, H., Engel, J.D. & Yamamoto, M. Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem* **280**, 4483-4490 (2005).
189. Blank, V. Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J Mol Biol* **376**, 913-925 (2008).
190. Venugopal, R. & Jaiswal, A.K. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14960-14965 (1996).
191. Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* **36**, 1199-1207 (2004).
192. Innamorato, N.G., *et al.* The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol* **181**, 680-689 (2008).
193. Wang, J., *et al.* Role of Nrf2 in protection against intracerebral hemorrhage injury in mice. *Free Radic Biol Med* **43**, 408-414 (2007).
194. Rojo, A.I., *et al.* Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia* **58**, 588-598 (2010).
195. Jin, W., *et al.* Role of Nrf2 in protection against traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **26**, 131-139 (2009).
196. Maes, M., *et al.* 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* (2012).
197. Baker, D.W., *et al.* Automated review of electronic health records to assess quality of care for outpatients with heart failure. *Ann Intern Med* **146**, 270-277 (2007).
198. Brocardo, P.S., Budni, J., Kaster, M.P., Santos, A.R. & Rodrigues, A.L. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice:



- evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology* **54**, 464-473 (2008).
199. Kaster, M.P., Budni, J., Santos, A.R. & Rodrigues, A.L. Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol* **576**, 91-98 (2007).
200. Kaster, M.P., Budni, J., Binfare, R.W., Santos, A.R. & Rodrigues, A.L. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**, 690-696 (2007).
201. Kaster, K.M., Grigoriyan, A., Jenneman, G. & Voordouw, G. Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field in the North Sea. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 195-203 (2007).
202. Moretti, M., *et al.* Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behav Brain Res* **225**, 328-333 (2011).
203. Perez-Otano, I., *et al.* Extensive loss of brain dopamine and serotonin induced by chronic administration of MPTP in the marmoset. *Brain Res* **567**, 127-132 (1991).
204. Porsolt, R.D., Bertin, A. & Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229**, 327-336 (1977).
205. Kmiecik, T., Arnoux, S., Kobryn, A. & Gorski, P. Influenza vaccination in adults with asthma: safety of an inactivated trivalent influenza vaccine. *J Asthma* **44**, 817-822 (2007).
206. Anzenbacherova, E., *et al.* In vivo study of the effect of antiviral acyclic nucleotide phosphonate (R)-9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA, tenofovir) and its prodrug tenofovir disoproxil fumarate on rat microsomal cytochrome P450. *Physiol Res* **57**, 761-767 (2008).
207. Kman, N.E., Russell, G.B., Bozeman, W.P., Ehrman, K. & Winslow, J. Derivation of a formula to predict patient volume based on temperature at college football games. *Prehosp Emerg Care* **11**, 453-457 (2007).
208. MacMaster, F.P., *et al.* Amygdala and hippocampal volumes in familial early onset major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **63**, 385-390 (2008).
209. Jain, N.K., Kulkarni, S.K. & Singh, A. Lipopolysaccharide-mediated immobility in mice: reversal by cyclooxygenase enzyme inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **23**, 441-444 (2001).
210. Singal, A., Tirkey, N. & Chopra, K. Reversal of LPS-induced immobility in mice by green tea polyphenols: possible COX-2 mechanism. *Phytother Res* **18**, 723-728 (2004).
211. Porsolt, R.D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**, 730-732 (1977).
212. Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. & Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **85**, 367-370 (1985).
213. Moretti, M., *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res* **46**, 331-340 (2012).
214. Verbiese-Genard, N., Hanocq, M., Alvoet, C. & Molle, L. Degradation study of catecholamines, indole amines and some of their metabolites in

- different extraction media by chromatography and electrochemical detection. *Anal Biochem* **134**, 170-175 (1983).
215. Roettger, V.R. & Goldfinger, M.D. HPLC-EC determination of free primary amino acid concentrations in cat cisternal cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods* **39**, 263-270 (1991).
216. Ishimaru, H., Casamenti, F., Ueda, K., Maruyama, Y. & Pepeu, G. Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils. *Brain Res* **903**, 94-101 (2001).
217. Maes, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuro Endocrinol Lett* **29**, 287-291 (2008).
218. McNally, L., Bhagwagar, Z. & Hannestad, J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectr* **13**, 501-510 (2008).
219. Foster, S.L., Hargreaves, D.C. & Medzhitov, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972-978 (2007).
220. Maes, M., *et al.* Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* **9**, 853-858 (1997).
221. Sluzewska, A., *et al.* Increased levels of alpha-1-acid glycoprotein and interleukin-6 in refractory depression. *Depression* **3**, 170-175 (1995).
222. Jun, T.Y., *et al.* Possible association between -G308A tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatr Genet* **13**, 179-181 (2003).
223. Yu, Y.W., Chen, T.J., Hong, C.J., Chen, H.M. & Tsai, S.J. Association study of the interleukin-1 beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1182-1185 (2003).
224. Borsini, F. & Meli, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* **94**, 147-160 (1988).
225. Borsini, F., Lecci, A., Sessarego, A., Frassine, R. & Meli, A. Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. *Psychopharmacology (Berl)* **97**, 183-188 (1989).
226. Dunlop, B.W. & Nemeroff, C.B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* **64**, 327-337 (2007).
227. Hashimoto, K., Sawa, A. & Iyo, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* **62**, 1310-1316 (2007).
228. Hashimoto, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* **61**, 105-123 (2009).
229. Nestler, E.J. & Carlezon, W.A., Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* **59**, 1151-1159 (2006).
230. Sanacora, G., *et al.* Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* **61**, 705-713 (2004).
231. Bhagwagar, Z., *et al.* Reduction in occipital cortex gamma-aminobutyric acid concentrations in medication-free recovered unipolar depressed and bipolar subjects. *Biol Psychiatry* **61**, 806-812 (2007).

- 
232. Gerner, R.H. & Hare, T.A. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. *Am J Psychiatry* **138**, 1098-1101 (1981).
233. Petty, F. & Sherman, A.D. GABAergic modulation of learned helplessness. *Pharmacol Biochem Behav* **15**, 567-570 (1981).
234. Small, S.A., Schobel, S.A., Buxton, R.B., Witter, M.P. & Barnes, C.A. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci* **12**, 585-601 (2011).
235. Evans, S.J., *et al.* Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15506-15511 (2004).
236. Dwivedi, Y., *et al.* Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* **60**, 804-815 (2003).
237. Siuciak, J.A., Lewis, D.R., Wiegand, S.J. & Lindsay, R.M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* **56**, 131-137 (1997).
238. Warner-Schmidt, J.L. & Duman, R.S. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4647-4652 (2007).
239. Warner-Schmidt, J.L. & Duman, R.S. VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression. *Current opinion in pharmacology* **8**, 14-19 (2008).
240. Hunsberger, J.G., *et al.* Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. *Nature medicine* **13**, 1476-1482 (2007).
241. Nowacka, M.M. & Obuchowicz, E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: A new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. *Neuropeptides* **46**, 1-10 (2012).
242. Krishnan, V., *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* **131**, 391-404 (2007).
243. Czeh, B., Simon, M., Schmelting, B., Hiemke, C. & Fuchs, E. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* **31**, 1616-1626 (2006).
244. Klein, P.S. & Melton, D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8455-8459 (1996).
245. Stambolic, V., Ruel, L. & Woodgett, J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* **6**, 1664-1668 (1996).
246. Beaulieu, J.M., *et al.* Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1333-1338 (2008).
247. Li, X., *et al.* In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1426-1431 (2004).
248. Rosa, A.O., *et al.* Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **32**, 1549-1556 (2008).

249. Budni, J., *et al.* Involvement of PI3K, GSK-3beta and PPARgamma in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol* (2011).
250. Karege, F., *et al.* Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* **61**, 240-245 (2007).
251. Rada, P., *et al.* SCF/ $\beta$ -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol* **31**, 1121-1133 (2011).
252. Smith, R.S. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses* **35**, 298-306 (1991).
253. Nair, A. & Bonneau, R.H. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J Neuroimmunol* **171**, 72-85 (2006).
254. Jazwa, A., *et al.* Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid Redox Signal* **14**, 2347-2360 (2011).
255. Malaguti, M., *et al.* Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. *J Appl Physiol* **107**, 1028-1036 (2009).
256. Baek, S.H., Park, M., Suh, J.H. & Choi, H.S. Protective effects of an extract of young radish (*Raphanus sativus* L) cultivated with sulfur (sulfur-radish extract) and of sulforaphane on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1176-1182 (2008).
257. Zhao, J., Kobori, N., Aronowski, J. & Dash, P.K. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci Lett* **393**, 108-112 (2006).
258. Ping, Z., *et al.* Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res* **1343**, 178-185 (2010).
259. Farooq, R.K., *et al.* Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res* **231**, 130-137 (2012).
260. Tagliari, B., *et al.* Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochem Res* **36**, 487-493 (2011).

## **9. Anexos**

---



CEBA-36-2011

ANEXO II

COMITÉ ÉTICO DE BIENESTAR ANIMAL  
HULP

El Comité Ético de Bienestar Animal, del Hospital Universitario "La Paz" de Madrid, en su reunión del día 1 de Diciembre de 2011, ha considerado las circunstancias que concurren en el proyecto de investigación o procedimiento "Estudio de la posible participación de Nrf2 en procesos depresivos", que tiene como investigador principal al Dr. José María Roda Frade.

A la vista de la documentación presentada este Comité ha acordado informar favorablemente el proyecto de investigación o procedimiento, ya que cumple los requisitos éticos requeridos para su ejecución.

Y para que así conste lo firmo en Madrid a 1 de Diciembre de 2011.

Firmado: Carlota Largo Aramburu

Secretaria del CEBA del HULP

  
Hospital Universitario La Paz  
Comunidad de Madrid  
SERVICIO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL





Universidad Nacional de Educación a Distancia.

UNED

FARMACOLOGÍA

Este Diploma certifica que:

**D<sup>a</sup>. MARIA DOLORES MARTIN DE SAAVEDRA**

Ha presentado en la XX Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid (FARMADRID XX), celebrada en la Facultad de Psicología de la UNED el día 4 de Julio de 2011, la Ponencia titulada

*Possible participación del factor de transcripción Nr12 en depresión*

la cual ha sido premiada por la Sociedad Española de Farmacología.



Fdo: Emilio Ambrosio Flores, Presidente

Madrid, 4 de Julio de 2011



