

**UNIVERSIDAD DE LA
REPÚBLICA FACULTAD DE
VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE MODELOS ANIMALES
DE TRASTORNOS DE ESTADO DE ÁNIMO**

Por

Ofelia CAORSI BRUNELLI
Virginia REDES BRUM

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Producción/Medicina

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:.....
Dra. Lorena Lacuesta

Segundo Miembro:.....
Dr. Paul Ruíz

Tercer Miembro:.....
Dr. Juan Pablo Damián

Cuarto Miembro:.....
Dr. Aldo Calliari

Autores:.....
Br. Ofelia Caorsi
Br. Virginia Redes

Fecha:.....

AGRADECIMIENTOS

Especialmente al **Dr. Paul Ruiz** nuestro tutor, el cual confió en nosotras para la realización de este trabajo, por apoyarnos siempre, destacando su gran disposición y dedicación.

Al **Dr. Aldo Calliari** nuestro co-tutor.

A la **Facultad de Veterinaria**, sus docentes y colaboradores que de una forma u otra han contribuido a nuestra formación académica.

A **nuestras familias**, por el esfuerzo que realizaron para poder llevar a cabo nuestra carrera, el apoyo constante y por haber confiado en nosotras.

A **todos nuestros compañeros y amigos** de siempre y los que fuimos conociendo a lo largo de la carrera, por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	Página 2
AGRADECIMIENTOS.....	Página 3
LISTA DE FIGURAS	Página 5
RESUMEN.....	Página 6
SUMMARY.....	Página 7
INTRODUCCIÓN.....	Página 8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Página 10
HIPÓTESIS.....	Página 16
OBJETIVOS.....	Página 16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	Página 17
- Diseño experimental.....	Página17
- Animales.....	Página17
- Drogas.....	Página17
- Pruebas de comportamiento.....	Página18
- Muestreo y análisis.....	Página 19
RESULTADOS.....	Página 20
DISCUSIÓN.....	Página 24
CONCLUSIONES.....	Página 27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del Laberinto Concéntrico Multivariado.....	Página 19
Figura 2: Niveles de Dopamina (ng/dl) para los distintos tratamientos.....	Página 20
Figura 3: Tiempo y entradas a la zona campo central (CTRL) del Laberinto Concéntrico Multivariado.....	Página 21
Figura 4: Tiempo y entradas a la zona oscura (OSC) del Laberinto Concéntrico Multivariado.....	Página 22
Figura 5: Tiempo y entradas a la zona desafío (DES) del Laberinto Concéntrico Multivariado.....	Página 22
Figura 6: Tiempo y entradas a la rampa (RAMP) del Laberinto Concéntrico Multivariado.....	Página 23
Figura 7: Tiempo y entradas a el puente del Laberinto Concéntrico Multivariado.....	Página 24

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar en animales de laboratorio, modelos farmacológicos de trastornos de estados de ánimo (depresión y manía). Se utilizaron tres diferentes drogas: reserpina para modelar estados depresivos, metilfenidato y anfetamina para modelar estados maníacos. Para esto se utilizaron ratas Wistar machos y hembras adolescentes (30 días de edad). La reserpina fue vehiculizada en solución fisiológica y se administró de manera intraperitoneal a una dosis de 1mg/kg durante cuatro días. Para modelar los estados maníacos se usó anfetamina (intraperitoneal, 4 mg/kg durante 5 días) y metilfenidato (10 mg/kg durante 5 días por vía intragástrica). Para evaluar el efecto de las drogas se estudiaron variables comportamentales en el laberinto concéntrico multivariado, donde se estudiaron respuestas de ánimo, ansiedad, miedo y actividad locomotora. Por último los animales fueron sacrificados para diseccionar la corteza insular y medir por técnica de cromatografía líquida de alta eficacia los niveles de dopamina allí presentes. Como era de esperarse, las ratas dosificadas con reserpina mostraron niveles más bajos ($p < 0,05$) de dopamina que los otros grupos; por el contrario en el laberinto concéntrico multivariado presentaron mayor actividad en sectores que se consideran de mayor toma de riesgo (ej rampa). Con respecto a la anfetamina encontramos una disminución de los niveles de dopamina en la ínsula. En relación a la actividad motora pudimos ver que, contra lo esperado, permanecieron menos tiempo en el sector puente (toma de riesgo). Por último las ratas dosificadas con metilfenidato no presentaron cambios con respecto a los niveles de dopamina en ínsula. Observamos que metilfenidato generó cambios de comportamiento en el laberinto concéntrico multivariado, como era de esperarse las ratas tratadas con dicha droga estuvieron mayor tiempo en sectores de desafío y riesgo. Como conclusión pudimos ver que el modelo de depresión en base a reserpina tiende a modelar este estado de ánimo de forma similar a como se ve en humanos y animales. En tanto los modelos de anfetamina y metilfenidato para manía tienen divergencias dado que ninguna pudo modelar las variables neurofisiológicas ni comportamentales vistas en estos trastornos en humanos.

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate models of mood disorders in laboratory animals (depression and mania). Three drugs were used: reserpine to model depression, methylphenidate and amphetamine to model manic states. For this, we used adolescents (30 days) male and female Wistar rats. Reserpine were vehiculized in physiological solution and administered intraperitoneally at 1mg/kg for four days. For modeling manic states we used amphetamine (intraperitoneal, 4 mg/kg for 5 days) and methylphenidate (10 mg/kg for 5 days intragastrically). To assess the drugs effect, behavioral variables were studied. For this, the Multivariate Concentric Square Field was used to study mood, anxiety, fear and locomotor activity. Finally animals were sacrificed for dissecting insula and measure dopamine levels by high efficiency liquid chromatography technique. Rats dosed with reserpine showed lower levels ($p < 0,05$) of dopamine than the other groups as expected, in Multivariate Concentric Square Field they presented greater activity in risk sectors (g. ramp). Regarding amphetamine, we found a decrease in dopamine levels in the insula. In relation to motor activity we could see that, contrary to expectations, they remained less time in the bridge sector (risk taking). Finally, rats dosed with methylphenidate did not changed dopamine levels in insula. We observed that methylphenidate generated behavioral changes in Multivariate Concentric Square Field. As expected, rats spent more time in challenge and risk sectors. In conclusion, we could see that reserpine-based depression model tends to model this mood similarly to how it looks in humans and domestic animals. Amphetamine and methylphenidate models for mania have divergences since none could model the neurophysiological or behavioral variables seen in manic humans.

INTRODUCCIÓN

En esta tesis buscamos validar tres modelos animales de trastornos de estado de ánimo. Para ello se buscó evaluar síntomas de depresión y manía en los modelos establecidos. También medimos los niveles de dopamina insular, y por último discutimos la validez etológica de los modelos propuestos.

El estado de ánimo se define como un trastorno emocional generalizado que afecta la perspectiva y percepción de uno mismo, de otros y del medio ambiente. Los trastornos del estado de ánimo alteran áreas del funcionamiento, síntomas vegetativos, cambios del sueño, el apetito, la libido y la energía (Argentina, 2009). Se sabe que la adolescencia es el principal momento de la vida donde surgen estos trastornos (Ruiz et al., 2020), hecho por el cual trabajamos con ratas adolescentes en esta propuesta.

La manía y la depresión forman parte de estos trastornos. La manía se define como un estado de hiper-excitación de las funciones psíquicas caracterizado por la exaltación del humor y cambios de emociones y reacciones instinto-afectivas (Zúñiga y Farías, 2002). En tanto la depresión se define como un síndrome neuropsiquiátrico identificado por alteraciones celulares y moleculares (Krishnan y Nestler, 2008).

Existe una gran variedad de alternativas para el tratamiento de la depresión, como fármacos antidepresivos, así como distintas psicoterapias (como las terapias cognitivo-conductuales) y otras actividades como ser ejercicio, yoga, etc. Hay una alta carencia con respecto al tratamiento de la depresión en todo el mundo, donde una gran cantidad de individuos que requieren atención no la reciben (Kohn et al., 2004).

El trastorno depresivo causa morbilidad a lo largo de todo el espectro etario (Kessler et al., 2005), dificultando el curso de pacientes con enfermedades crónicas (Evans et al., 2005). Investigaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con respecto a los efectos económicos de las enfermedades (las llamadas Global Burden of Disease) hallaron que la depresión y sus consecuencias en seres humanos son la principal causa de años de vida perdidos por discapacidad (Organización Mundial de la Salud, 2000; Gómez-Restrepo et al., 2004).

El diagnóstico del desorden depresivo se lleva a cabo cuando el paciente demuestra determinados síntomas, que según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (American Psychiatric Association, 2013) son al menos cinco síntomas que deben manifestarse en un período de dos semanas: estado depresivo, menor interés en actividades que antes resultaban placenteras, ganancia o pérdida de peso, alteraciones en el sueño, agitaciones psicomotoras (como caminar de un lado a otro o retorcer las manos) o discapacidad psicomotora (como lentitud de pensamientos o movimientos), fatiga, sentimientos de culpa o inutilidad, baja capacidad para pensar o concentrarse, pensamientos de muerte o suicidio. Para que el cuadro depresivo sea considerado como tal, no debe haber otras alteraciones médicas concomitantes, ni alternancia con episodios maniacos o hipomaniacos.

Si bien la clínica ha sido y es fundamental para el estudio y la caracterización de este trastorno, las investigaciones neuropatológicas y el uso de modelos animales, han implicado avances notables en lo referente al entendimiento de la neurobiología de la depresión (Krishnan y Nestler, 2008). Los modelos animales de psicopatologías tienen limitantes relevantes, ya que no se evidencian todos los síntomas de las patologías vistas en humanos (Leite y Perez-Acosta, 2001), sin embargo se acepta que hay una necesidad y una validez de dichos modelos pues posibilitan un abordaje experimental (Escorihuela et al., 1998; Overmier, 2007; Laborda, 2009).

En los estudios de biomedicina un modelo se define como una configuración o protocolo experimental (a veces también llamado "paradigma") elaborado en una especie no humana con el objetivo de replicar las particularidades fisiológicas, fisiopatológicas o de comportamiento de los humanos (Steimer, 2011).

En otras disciplinas científicas como ser matemáticas o física, el término "modelo" generalmente se refiere a una base teórica a partir de la cual se pueden deducir y probar experimentalmente hipótesis específicas. Los modelos animales de trastornos psiquiátricos pueden pertenecer a ambas categorías (biomedicina y científica) (Steimer, 2011).

Existen modelos farmacológicos de depresión, en los que los comportamientos asociados a depresión se observan luego de la administración de drogas. Uno de estos modelos emplea la administración de reserpina, un depletor de monoaminas. La reserpina inhibe el transportador vesicular de monoaminas, que normalmente transporta las monoaminas libres en el citoplasma a las vesículas sinápticas. Así, las monoaminas quedan expuestas a la acción de las monoamino oxidasas, quienes las degradan. La administración, tanto aguda como crónica, de reserpina produce en roedores sintomatología similar a la que produce en humanos con depresión (Ruiz et al., 2018).

Los modelos farmacológicos de manía, generalmente recurren a la administración de psicoestimulantes a roedores. La administración de estas drogas conlleva a un estado de agitación psicomotora análogo al observado en humanos con manía. Algunos trabajos plantean que basarse solo en este aspecto para modelar los estados maníacos es una gran limitante que ha llevado a inconvenientes a la hora de instaurar tratamientos (Young et al., 2011). Es también importante resaltar que el uso abusivo de estas drogas es muy extenso, especialmente entre estudiantes universitarios que los utilizan para aumentar su atención, perder peso o con fines recreativos (Bogle et al., 2009).

Usaremos en primer lugar el modelo de depresión en base a reserpina, y en segundo los modelos de manía en base a metilfenidato y anfetaminas. En todos ellos estudiaremos variables conductuales (respuesta anímica, motora y ansiosa) y neurofisiológicas (niveles de dopamina en tejido) con el fin de discutir la validez de estos modelos en tanto capacidad de reproducir la sintomatología vista en humanos y animales con este trastorno. Medimos en ambos modelos los niveles de dopamina en la ínsula, estructura encefálica clave en el procesamiento de estado anímicos, emocionales y en el procesamiento de información interoceptiva que, a su vez, retroalimenta los procesos emocionales (Simmons et al., 2012). La dopamina, en tanto, es uno de los principales neurotransmisores implicados en los trastornos de estado de ánimo (Diehl y Gershon, 1992; Ruiz et al., 2018).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Estado de ánimo y sus trastornos: manía y depresión

El estado anímico refleja el momento afectivo y emocional de un individuo siendo más duradero y menos específico que la respuesta a una situación concreta (OMS, 2000). Cuando es anormalmente bajo se llama depresión y cuando es anormalmente alto se llama manía, existiendo otros posibles estados como la eutimia y la bipolaridad. De esta forma los trastornos de estado de ánimo agrupan, entre otros, a la depresión y la manía (CIE-10-OMS). Cuando estos ocurren, el individuo pierde la sensación de control sobre su ánimo, experimentando un desequilibrio en la reacción emocional o del estado de ánimo que no se debe a ningún otro trastorno físico o mental aparente (Zúñiga et al., 2005).

La manía se caracteriza por estados eufóricos, actividad física extrema, distracciones y, algunas veces, grandiosidad. Los episodios maníacos rara vez se manifiestan solos, suelen alternar con períodos de depresión; cuando coinciden la manía y la depresión se llama trastorno bipolar. Dicho trastorno suele considerarse como una “depresión invertida”, en donde se evidencia una intensificación de los pensamientos y las emociones. Los síntomas típicos de la manía son: excitación, exaltación, humor elevado: eufórico, irritable, disminución del pudor, aumento de libido, aceleración del pensamiento, dificultad para concentrarse, fácil distracción (Balarezo López y BalarezoGalarreta, 2016).

A inicios del siglo XIX, la manía se definía como una “psicosis funcional” caracterizada por; aceleración patológica del flujo de ideas, inquietud motora y ausencia de síntomas que confirmen una enfermedad orgánica del cerebro. Al mismo tiempo, Mendel identificaba cuatro etapas: 1. inicial; 2. exaltación; 3. furor; 4. declive; y cuatro subtipos: 1. hipomanía; 2. recurrente; 3. gravis; 4. periódica (Mendel, 1907). Entre los síntomas de la manía señalaba las alucinaciones, la anomalía del pensamiento, los delirios, la confusión, la hipermnésia, la hiperactividad y la pérdida de peso. Durante el siglo XIX, el concepto de manía se fue comprimiendo hasta quedar definido como un trastorno del afecto y de la acción (Luque, 2011).

Los episodios de manía generalmente suelen ser subdiagnosticados o mal diagnosticados en la infancia y adolescencia temprana. Cada vez más individuos están desarrollando trastornos afectivos a edades más precoces. Un adecuado diagnóstico a tiempo tiene implicancias en el tratamiento, básicamente por la secuela neurobiológica que dejan los trastornos afectivos a tan temprana edad. Se desarrollan cuatro factores interactuantes, que llevarían a dificultar el proceso diagnóstico en un episodio de manía en la infancia: problema epidemiológico, variabilidad en los síntomas, sobreposición sintomática de manía con otros desórdenes, etapa del desarrollo y expresión de síntomas (Zúñiga y Farías, 2002).

Mientras tanto la depresión es un trastorno de estado de ánimo caracterizado principalmente por la presencia de anhedonia. Su sintomatología en humanos incluye sentimientos persistentes de tristeza, ansiedad, o vacío, de desesperanza y/o pesimismo, así como sentimientos de culpa, inutilidad, y/o impotencia, o ansiedad (aproximadamente el 70% de los pacientes con depresión también tienen ansiedad) (Wu y Fang, 2014). También suele observarse irritabilidad, inquietud, pérdida de interés en las actividades o pasatiempos que

antes disfrutaba, incluso las relaciones sexuales, fatiga y falta de energía, dificultad para concentrarse, recordar detalles, y para tomar decisiones, trastornos del sueño, comer excesivamente o perder el apetito, así como cólicos. Puede haber en algunos casos pensamientos suicidas o intentos de suicidio (Davidoff, 1989). En la adolescencia es donde se encuentran los grupos etarios más afectados por los trastornos de estado de ánimo (depresión y manía). Se ha sugerido que hasta un 50% de los trastornos mentales que exhiben los adultos emergen en la adolescencia (Kessler et al., 2005), y un trabajo realizado en EEUU concluyó que el 11.4% de la población entre 12 a 17 años había padecido al menos un episodio depresivo mayor en los últimos 12 meses (Center for behavioral health statistics and quality, 2015; Ruiz et al, 2018).

La depresión es un trastorno causado por múltiples factores. La posibilidad de que un individuo pueda sufrir un episodio de esta patología está relacionada con: influencias genéticas, abuso sexual infantil, pérdida prematura de los padres, rasgos de personalidad predisponentes, baja autoestima, exposición a traumas, bajo apoyo social, uso indebido de sustancias, dificultades conyugales, historia previa de depresión mayor y acontecimientos estresantes de la vida recientes (Kendler et al., 2002). Es importante resaltar que los machos y las hembras responden diferencialmente a las drogas (Wille-Bille et al., 2017). Sin embargo, y a pesar de la creciente conciencia de estas diferencias y la sugerencia de representatividad de ambos sexos (McCullough et al., 2014), las hembras/mujeres siguen siendo un grupo descuidado en la investigación epidemiológica y preclínica.

En el caso de animales no humanos hablamos de signos “de tipo depresivo”, en lugar de depresión propiamente dicha, ya que ninguna otra especie presenta las mismas estructuras y procesos mentales que caracterizan a la especie humana, y por lo tanto ningún animal podría reproducir las alteraciones mentales humanas tal como las conocemos (Escorihuela y Fernández-Teruel, 1998; Li et al., 2016; Minor y Hanff, 2015). Análogamente, no existe un homólogo estricto en animales del estado maníaco humano, siendo confundido con ansiedad o patologías del sistema dopaminérgico. Por estas razones, en medicina veterinaria hablamos de “problemas comportamentales”, siendo éstos una de las causas de eutanasia en pacientes caninos y felinos (Damián et al., 2012).

Estos “problemas comportamentales” están relacionados a aberraciones de comportamiento especie específicos. Según Houpt (1982) los trastornos de comportamiento animal pueden dividirse en: 1. Trastornos del acicalamiento, como ejemplo podemos nombrar la dermatitis acral por lamido en perros, la tricolomanía en gatos o el picoteo de las plumas en aves 2. Trastornos del comportamiento sexual. 3. Trastornos del comportamiento alimenticio. 4. Trastornos de la locomoción (hiperactividad y esterotipias). 5. Trastornos de la eliminación. 6. Trastornos fóbicos y de ansiedad. 7. Desordenes vinculo/separacional. 8. Trastornos de la agresión. 9. Trastornos en la capacidad de educación. 10. Trastornos del sueño (Dodman, 1999). No encontrando un lugar específico para los trastornos del ánimo, sino más bien visto de forma transversal relacionado con comportamientos como el sexual o la locomoción, entre otros.

La terminología utilizada para describir los trastornos del comportamiento animal es similar a la que se utiliza en psiquiatría. Esas condiciones parecen ser análogas y posiblemente homólogas a algunas de las que se presentan en seres humanos, tales como: ansiedades (ansiedad generalizada, ansiedad por separación, ataque de pánico), fobias (social,

específica, estrés postraumático), trastornos compulsivos (obsesivo compulsivo), distimias (trastorno bipolar), síndrome disociativo (esquizofrenia), hiperactividad (déficit de atención e hiperactividad), depresión, sociopatía, agresiones (trastorno de impulsividad), demencias seniles, disfunción cognoscitiva.

DEPRESIÓN

HUMANOS	ANIMALES
Estado depresivo	Cambio en el ciclo del sueño
Menos interés en actividades que antes resultaban placenteras	Agitación locomotora
Ganancia o pérdida de peso	Disminución de la actividad sexual
Alteraciones en el sueño	Anhedonia (Cassano y Argibay, 2009)
Agitaciones psicomotoras	
Discapacidad psicomotora	
Fatiga	
Sentimientos de culpa o inutilidad	
Baja capacidad para pensar o concentrarse	
Pensamientos de muerte o suicidio (American Psychiatric Association, 2013)	

MANÍA

HUMANOS	ANIMALES
Excitación	Sobresalto potenciado por miedo
Exaltación	Ocultamiento defensivo
Humor elevado	Vocalizaciones
Eufórico	Hipertermia inducida por stress
Irritable	Postura de acercamiento extendida (Dodman, 1999)
Aumento de lívido	
Fácil distracción	
Dificultad para concentrarse (Balazero López y Balazero Galarreta, 2016)	

Un modelo experimental animal debe idealmente, ser razonablemente análogo a la patología humana, ser reproducible, medible objetivamente y ser reversible mediante los mismas estrategias que se usan en personas. En ese sentido, pese a que algunos aspectos de la depresión humana (como los pensamientos suicidas), no pueden reproducirse en animales, algunos modelos presentan validez de constructo cuando se enfocan en otros aspectos de la depresión (Bergner, 2009).

En lo que respecta a la neurobiología de estos trastornos, uno de los aspectos que se ha estudiado más es qué tipos de neurotransmisores se encuentran alterados. Existe evidencia que niveles anormales de serotonina (5-HT), norepinefrina y dopamina (neurotransmisores aminérgicos), que actúan en las neuronas del sistema nervioso central, podrían ser

importantes en la fisiopatología de la depresión (Baldwin, 2002). La dopamina se ha visto implicada en la depresión y en la manía, viéndose disminuida en la primera y aumentada en la segunda. De la misma manera, bajas significativas en serotonina usualmente conllevan a procesos depresivos (Diehl y Gershon, 1992). Esto ha llevado a postular a la dopamina como un buen marcador neurobiológico y al estudio comportamental como un complemento necesario para la caracterización del estado anímico del modelo animal (Ruiz, 2015).

Modelos animales de estado de ánimo

Como se mencionó, los modelos animales constituyen alternativas metodológicas para el estudio de la depresión y de otras psicopatologías (Cassano y Argibay, 2009; Czéh et al., 2016; Deussing; 2006; Frey et al., 2006; Kato et al., 2016; Machado-Vieira et al., 2004; Nestler y Hyman, 2010). A tal punto que se ha señalado como primordial la necesidad de desarrollar modelos animales de psicopatología (Flores Aguirre, 2011). Estos mismos no reemplazarán, ni mucho menos, el estudio epidemiológico y en clínica humana de estas enfermedades, pero sin ellos es muy difícil conocer la etiología de estas patologías y desarrollar nuevas terapias farmacológicas o ambientales que intenten remediarlos (Jones et al., 2011).

Existen modelos farmacológicos para todos los trastornos del ánimo. Algunos de los componentes de la depresión pueden ser modelados mediante la administración de la droga reserpina, un agotador de monoaminas (serotonina y dopamina), en el sistema nervioso central. La administración, tanto aguda como crónica, de esta droga produce en roedores sintomatología análoga a la que experimentan humanos con depresión (Escorihuela y Fernández-Teruel, 1998; Li et al., 2016; Minor y Hanff, 2015).

Decimos que el cuadro clínico inducido por la reserpina en animales es “análogo” pero no “igual” al cuadro clínico humano, ya que como se discutió antes, no se puede hablar estrictamente de “depresión” en modelos animales. La depresión es un síndrome clínico que se define por afectar la vida laboral, interpersonal y afectiva, por lo que en animales resulta más prudente referirnos a “comportamientos asociados a depresión”. Además del paradigma farmacológico, estos comportamientos también pueden ser modelados en animales (con las mismas limitaciones de modelo), mediante la exposición recurrente a estímulos aversivos, como alteraciones en la estructura social, restricción de movimiento, separación materna temprana o aislamiento en la adolescencia, estimulación nociceptiva periférica, entre otros (Deussing et al., 2006). En ratas o ratones, la aplicación crónica o sub-crónica de estos estímulos (usualmente conocidos como estresores, para revisión y referencias véase Pucci et al., 2018) usualmente desencadena anhedonia, reducción de actividad, alteraciones en la interacción social y aumentos en la ansiedad.

Los modelos de depresión actuales con frecuencia se evalúan siguiendo tres criterios principales: validez aparente (con un grado razonable de homología sintomática a los humanos), validez de construcción (requisito de factores causales similares) y validez farmacológica (dada por la reversión de los síntomas depresivos por los antidepresivos disponibles). Un cuarto criterio potencial es la validez patológica, mediante la cual los modelos animales se validan por la sumatoria de los cambios patológicos o serológicos conocidos y encontrados en pacientes humanos deprimidos. Estos criterios sirven como referencia para comparar modelos entre sí, teniendo cada uno sus particularidades, con factores positivos y negativos (Nestler y Hyman, 2010).

La reserpina es un depletor de monoaminas que fue originalmente usado como antipsicótico e hipotensor arterial, siendo también empleada para modelar los cuadros depresivos humanos en animales de laboratorio. Se ha observado que ratas tratadas con reserpina manifiestan signos y síntomas similares a los exhibidos por humanos diagnosticados con depresión, incluyendo lentificación en locomoción. Esto justifica la utilización de este modelo para el estudio de las dimensiones biológicas y comportamentales de la depresión, así como para entender su patogenia y determinar posibles tratamientos. Sin embargo existen variables en las que no se ve analogía entre trastorno y modelo (Ruiz et al.,2018). De todas formas, es uno de los modelos de depresión farmacológica más usado, teniendo entre sus características, la de bajar los niveles de monoaminas (lo que confiere cierta validez patogénica); es de fácil aplicación y más económico en relación a los modelos genéticos (Ruiz et al., 2018).

La manía puede modelarse de distintas maneras, por ejemplo alterando el funcionamiento de genes presuntamente vinculados a la enfermedad. Se ha observado (Shaltiel et al., 2008) que ratones que carecen del gen del receptor 6 del glutamato (GluR6) exhiben no solo hiperactividad y agresividad, sino también menos ansiedad y alteraciones en conductas de riesgo. Estos modelos, sin embargo, tienen algunas desventajas, como por ejemplo su costo, y la posibilidad que la delección del gen cause alteraciones secundarias en el fenotipo a medir. Los modelos farmacológicos de manía recurren usualmente a la administración de psicoestimulantes a roedores. La administración de estas drogas induce un estado de agitación psicomotora análogo al observado en humanos con manía. Algunas revisiones plantean que considerar solo este aspecto para modelar los estados maníacos es una gran limitante que ha llevado a inconvenientes en la elaboración de tratamientos (Young et al., 2011). Para reproducir estados similares a la manía, puede utilizarse la administración de Anfetamina o de Metilfenidato (Ruiz et al., 2018). Las anfetaminas son aminas simpatomiméticas de fórmula química estructural semejante a la adrenalina. Las más utilizadas, de donde derivan las más modernas drogas de este grupo, son el sulfato de d-anfetamina, la dexanfetamina y el sulfato de anfetamina racémica (Robledo, 2008).

La acción de las anfetaminas incluye a varios neurotransmisores como ser la dopamina, la serotonina, la adrenalina y la noradrenalina. Su acción principal consiste en aumentar los niveles sinápticos de monoaminas por varios mecanismos, incluyendo el intercambio por difusión a través de los transportadores de membrana, la perturbación del transportador vesicular de monoaminas, inhibición de la monoamino oxidasa (MAO) y promoción de la síntesis de neurotransmisor. El consumo reiterado de anfetaminas se asocia a la aparición de fenómenos de tolerancia, sensibilización y dependencia. En seres humanos, la administración continua de anfetaminas puede producir perturbaciones persistentes a nivel cognitivo y emocional y pueden aparecer cuadros psicóticos aun después de la retirada de la droga. El uso frecuente de metanfetamina puede producir neurotoxicidad evidenciada por alteraciones persistentes a nivel neuroquímico y neuronal incluyendo lesiones en los axones y terminaciones que contienen monoaminas. (Robledo, 2008).

Las anfetaminas son agentes dopaminérgicos indirectos. Estas tienen complejas acciones sobre las terminales presinápticas de noradrenalina y dopamina, liberando o bloqueando la recaptación de noradrenalina y dopamina. La acción de las anfetaminas en las terminales dopaminérgicas es el aumento de la concentración de dopamina en el espacio sináptico, esto

lleva a la modificación de la actividad neuronal y por ende del comportamiento (Coutts et al. 1986; Hyman, 1996; Mattei y Carlini 1996).

El metilfenidato es una molécula simpaticomimética estructuralmente similar a las catecolaminas endógenas. Su mecanismo de acción parece localizarse tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, incrementando la neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica. Aunque el bloqueo de los transportadores de dopamina es el efecto farmacológico inicial, el incremento en la liberación de dopamina y la activación de receptores dopaminérgicos son los responsables de los efectos conductuales. Los psicoestimulantes también están implicados en los efectos beneficiosos en el ámbito cognitivo, fundamentalmente sobre el aprendizaje y el rendimiento académico. En algunos estudios se ha visto un aumento en la vigilancia, control de impulsos, coordinación motora fina y tiempo de reacción. Además, se han encontrado efectos positivos en memoria a corto plazo y aprendizaje de material verbal y no verbal. (Rubio et al., 2008).

El metilfenidato es una droga ampliamente aceptada para el tratamiento del desorden de déficit de atención e hiperactividad, se lo ha asociado a efectos adversos como síntomas psicóticos (Ekinci , 2016). Se asume que los efectos terapéuticos de éste se deben en parte al aumento del tono dopaminérgico (Galiano, 2015). El metilfenidato actúa principalmente como un inhibidor de la recaptación de la dopamina-norepinefrina al unirse y bloquear los transportadores de dopamina.

Los niveles elevados de dopamina han sido implicados en la generación de síntomas psicóticos (Man KK, 2016). Existen diversos trabajos sobre el metilfenidato en la cognición/conducta en modelos animales (Galiano, 2015). Los modelos farmacológicos de manía, en tanto, recurren usualmente a la administración de psicoestimulantes a roedores. Su administración induce un estado de agitación psicomotora comparable al observado en humanos con manía (Ruiz et al., 2018). La hipótesis monoaminérgica de los trastornos del estado de ánimo postula que un desequilibrio en la neurotransmisión monoaminérgica en el sistema nervioso central está relacionado causalmente con las características clínicas de la depresión o la manía (Sigitova, 2017).

La ínsula

La corteza insular o ínsula, se encuentra ubicada profundamente en la superficie lateral del cerebro, dentro del surco lateral o Cisura de Silvio. Es un centro de conexión entre el sistema límbico y el neocortex, el cual participa en diversas funciones sea de forma directa o indirecta. Esta se encuentra dividida en ínsula anterior (AIN) y posterior (PI), separadas ambas partes por el surco insular central (Allen et al., 1991; Duque , 2004). La ínsula se conecta a varias regiones corticales con diferentes circuitos neuronales y está involucrada en múltiples funciones, incluyendo la emoción, la cognición, la percepción sensorial y la somatosensación. Es clave en el procesamiento de estados de ánimos, emocionales y en el procesamiento de información interoceptiva que, a su vez, retroalimenta los procesos emocionales (Simmons et al., 2012). Sobre la base de los estudios estructurales y funcionales, se considera que la ínsula tiene tres subregiones diferentes, la corteza insular anterior ventral (v-AIN), la corteza insular anterior dorsal (d-AIN) y la ínsula posterior (PI) (Mesulam y Mufson , 1982a, b; Deen et al., 2011; Jakab et al., 2012). El AIN afecta más la función emocional y cognitiva, mientras que el PI está más asociada con las funciones motoras y la percepción sensorial (Mutschler et al., 2009; Kurth et al., 2010; Kelly et al., 2012). Estas subregiones insulares exhiben

diferentes patrones funcionales. La AIN presenta mayor vinculación con el sistema límbico, siendo su funcionalidad más orientada a la integración emocional de las experiencias y percepciones como una sensación unitaria y global. Influye en una gran cantidad de procesos básicos y superiores relacionados con pensamiento abstracto y toma de decisiones (Allen, 1991; Duque, 2004). Varios estudios han relacionado la función insular con los síntomas y conductas depresivos. Un análisis de componentes principales del Inventario de Depresión de Beck reveló que la gravedad de los síntomas de la anhedonia psicomotora, caracterizada por una menor satisfacción y pérdida de interés en otros, se correlacionó negativamente con el metabolismo en la ínsula derecha (Dunn et al., 2002). El sistema de neurotransmisores allí presente resulta de relevancia dado que está relacionado con los estados anímicos, resultando así un marcador útil para estudiar sus trastornos (Ruiz et al, 2018). Varios estudios han vinculado la función insular a los síntomas y comportamientos depresivos.

En esta tesis se estudió la validez de tres modelos farmacológicos de trastornos de estado de ánimo en ratas. En primer lugar el modelo de depresión en base a la administración de reserpina, y en segundo, los modelos de manía con anfetamina y metilfenidato. En todos estos medimos, luego de la administración de las drogas, los niveles de dopamina en la ínsula, para estudiar si modelaban lo visto en esta variable en humanos. También les aplicamos el laberinto concéntrico multivariado, prueba de comportamiento que cuenta con varios sectores que permiten estudiar respuesta de ansiedad, estado de ánimo, y respuesta motora (Ruiz et al., 2018). Todas estas variables nos permitirán discutir sobre la validez de estos modelos a la hora de reproducir lo visto en humanos y animales domésticos con estos trastornos.

HIPÓTESIS

La administración de reserpina, metilfenidato y anfetaminas a ratas adolescentes permite modelar los respectivos cuadros depresivo y maníaco mediante la evaluación de dopamina en la Ínsula y por los patrones de comportamiento en el Laberinto Concéntrico Multivariado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la validez de tres modelos farmacológicos (reserpina, anfetamina y metilfenidato) de trastornos de estado de ánimo en animales de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar síntomas de depresión y manía en los modelos nombrados.
- Evaluar niveles de dopamina insular en los modelos de depresión y manía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El experimento se hizo en el Laboratorio de Experimentación animal de Histología y en el Laboratorio de Psicofisiología del Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martin Ferreira de la Universidad Nacional de Córdoba.

Se realizaron 4 experimentos independientes, y en momentos diferentes. En todos se usaron ratas Wistar, (machos y hembras), adolescentes de 30 días de edad.

- Experimento 1 (n=16): la mitad de los animales fueron tratados con reserpina, dejando un grupo de igual características que se la administró un vehículo (solución salina).
- Experimento 2 (n=16): la mitad de los animales fueron tratados con metilfenidato, dejando un grupo de igual características que se la administró un vehículo (solución salina).
- Experimento 3 (n=16): la mitad de los animales fueron tratados con anfetamina, dejando un grupo de igual características que se la administró un vehículo (solución salina).
- Experimento 4 (n=32): 8 animales tratados con reserpina, metilfenidato, anfetamina o vehículo (solución salina).

Experimento 1, 2 y 3 luego de la administración de las drogas estos animales fueron sacrificados y se midieron niveles de dopamina en ínsula.

Experimento 4 luego de la administración de las drogas estos animales fueron colocados en el laberinto concéntrico multivariado.

Animales

Se trabajó con ratas Wistar machos y hembras de treinta días de edad, equivalente al período de adolescencia en la vida de la rata. Se ha identificado al período entre los 28 a 42 días de vida de la rata como correspondientes a principios o mediados de la adolescencia en humanos, siendo la semana anterior (21 a 28 días de vida) considerada como período juvenil, y el intervalo de 46 a 59 días como finales de la adolescencia. Esta elección se fundamentó en que es el momento donde emergen los trastornos de estado de ánimo. Los animales provienen del Unidad de reactivos biológicos de la Facultad de Medicina (URBE-Fmed-UdelaR).

La utilización de animales para esta experimentación está aprobada por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (CEUA-FVetUdelaR), nº 111130-000658-13.

Drogas

Se utilizó reserpina (elaborada por el laboratorio Sigma-Aldrich, EE.UU.), antagonista de la vía dopaminérgica, siendo un fármaco utilizado en roedores para inducir comportamientos asociados a depresión (Ruiz et al., 2017). La reserpina fue vehiculizada en solución fisiológica y administrada de manera intraperitoneal a una dosis de 1mg/ kg durante cuatro días. Las

drogas utilizadas para modelar los estados maníacos fueron anfetamina (elaborada por el laboratorio Sigma-Aldrich, EE.UU) vía intraperitoneal, 4 mg/kg durante 5 días y metilfenidato (elaborada por el laboratorio Europharma, Uruguay), cuya dosis fue de 10 mg/kg durante 5 días por vía intra gástrica.

Pruebas de comportamiento: Laberinto concéntrico

Esta prueba permite evaluar la conducta exploratoria, toma de riesgos y búsqueda de seguridad en animales de laboratorio (Meyerson et al., 2006; Ruiz et al., 2018).

Como se observa en la Figura 1, el aparato consiste en un campo total de 48x48x48 cm.

Posee un Campo Central (Circulo Central; CTRL) de 26x26x40 cm, el cual da acceso a tres corredores (A, B, C), estas secciones fueron iluminadas con luz amarilla de 50W (intensidad 600 lux). El corredor A, de 21cm x10cm x 40cm es el único corredor que está conectado al sector protegido y oscuro (OSC). Este sector (10 cm de ancho y 15 cm de largo) se encuentra cubierto y es totalmente oscuro. El corredor B (18x10cm) sólo posibilita acceso al sector de desafío (DES), llamado así porque para llegar a él hay que efectuar un salto y pasar por un agujero.

Sin embargo el ingreso al DES (18cmx14cmx10cmx10cm) puede ser por el corredor B o el C. Ambos permiten acceder al DES mediante, como ya indicáramos, un salto por un agujero ligeramente elevado (10 cm) sobre el suelo. El corredor C (15x10cm) permite el acceso a DES y al sector más iluminado en el cual se encuentra una rampa (RAMP) de malla metálica que permite el ingreso a un puente elevado (PUENTE) del mismo material pero de diferente diseño.

El corredor C se puede considerar un sector de evaluación de riesgo por su proximidad para el acceso al DES, RAMP y PUENTE. Las dos últimas mencionadas, también se las asocia con la evaluación y toma de riesgo (Meyerson et al., 2006), ya que están elevadas, no poseen paredes laterales opacas y está más iluminado (80W) que el resto del aparato.

Específicamente, una de sus paredes es de PET transparente simulando una zona descubierta o balcón. La iluminación del aparato se midió a través de un metro lux digital (LX1010B).

Al comienzo del test, de 20 minutos de duración, el animal fue puesto en el campo central frente a la pared que no tiene entradas a los corredores. La evaluación se grabó en video para su posterior procesamiento.

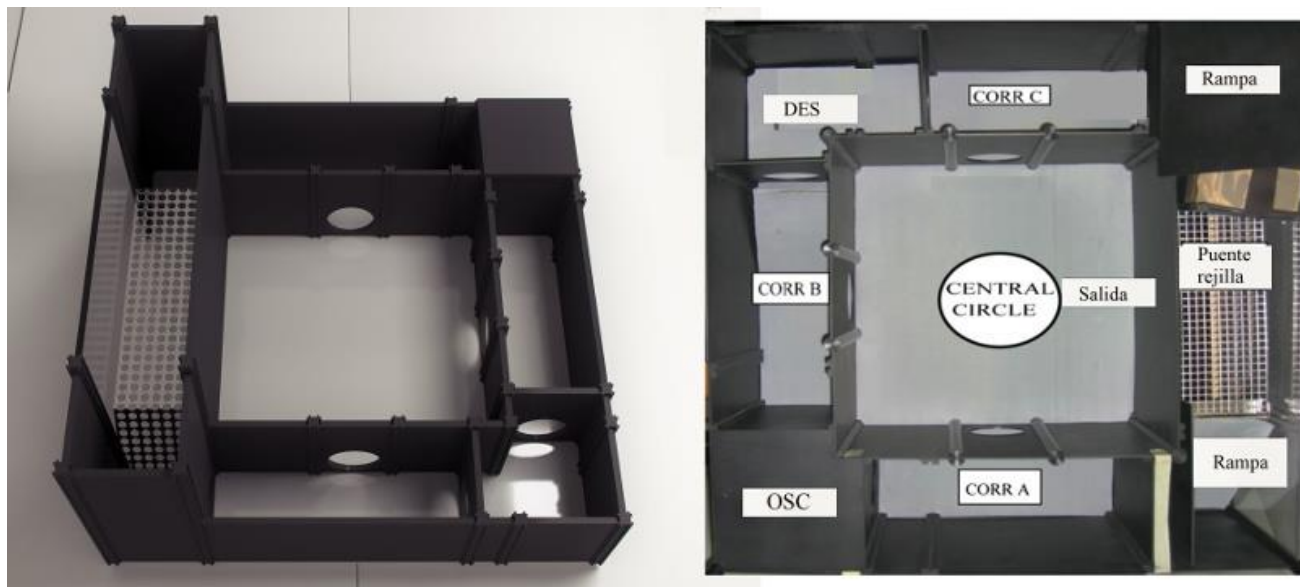


FIGURA 1: Campo concéntrico multivariado o Multivariate Concentric Square Field (MCSF).

Medición de dopamina en la ínsula: Técnica cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Los análisis de HPLC se realizaron en el Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Clemente Estable.

Los animales fueron sacrificados mediante guillotina e inmediatamente se obtuvo el encéfalo y se disecó la ínsula [técnica descrita en (Aleksandro y Fedorova, 2003)] para el análisis de dopamina por cromatografía de fase líquida (o HPLC, por sus siglas en inglés). La ínsula fue congelada y mantenida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El día de la extracción y medición del contenido de dopamina, los tejidos fueron descongelados, pesados e inmediatamente sonicados en 1 ml de ácido perclórico 0,1 M. Posteriormente fueron centrifugados a 15.000 g max, por 15 minutos, conservándose el sobrenadante. Las muestras fueron inyectadas en un sistema de HPLC (PM-80 BAS, West Lafayette, IN, USA) con una columna C18 con un detector electroquímico (LC-4C BAS) a un flujo de 1.0 ml/min y una fase móvil compuesta de ácido acético 0,15 M, octil sulfato de sodio 0,6 M, acetonitrilo al 4% y tetrahidrofurano al 1,6%, a pH 3, (Abin-Carriquiry et al., 2008). Los resultados se expresaron en nanogramos por gramo (ng/gr) de tejido. La medición se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Análisis de datos

Las variables independientes de comportamiento y neurofisiológicas que se compararon entre grupos usando ANOVA para grupos independientes, y como pruebas post-hoc la prueba de Diferencias Significativas Mínimas, de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. El alfa fue de 0,05 y los resultados se expresan como media \pm SEM.

RESULTADOS

Niveles de dopamina en la ínsula

En la comparación de los diferentes tratamientos en relación a sus controles encontramos que los niveles de dopamina insular fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en los animales tratados con reserpina y anfetaminas, sin ver diferencias en el metilfenidato (Figura 2).

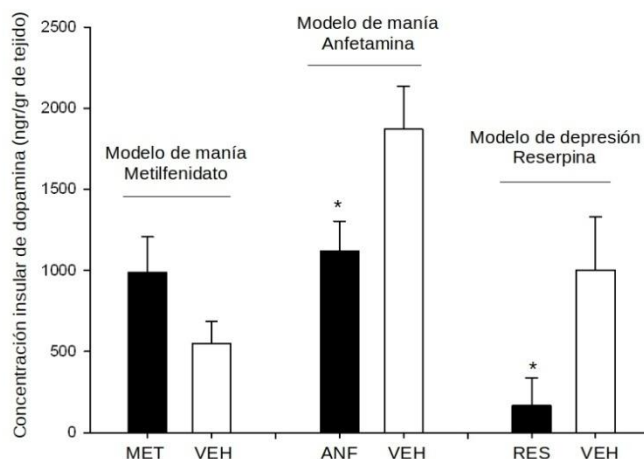


Figura 2: Niveles de Dopamina en ínsula para cada tratamiento: las anfetaminas (ANF) y la reserpina (RES) generaron una disminución significativa de dopamina (marcada por asterisco), sin ver diferencias con el metilfenidato. Los valores expresan las medias \pm error.

Análisis Laberinto Concéntrico multivariado.

- Zona campo central (CTRL)

El ANOVA indicó diferencias significativas en la variable tiempo de permanencia de las ratas en la zona según tratamientos ($F(3,41) = 61,0$, $p < 0,05$). La prueba de Fisher reveló que las ratas tratadas con anfetamina (ANF) tienen una permanencia mayor que el resto de los grupos (Figura 3).

También se pudo ver diferencias significativas en el número de entradas a la zona ($F(3,41) = 4,4$, $p < 0,05$). La prueba de Fisher reveló que las ratas tratadas con reserpina (RES) presentaron más entradas que ratas tratadas con metilfenidato (MET) y anfetamina (ANF) sin diferencias entre ellos (Figura 3).

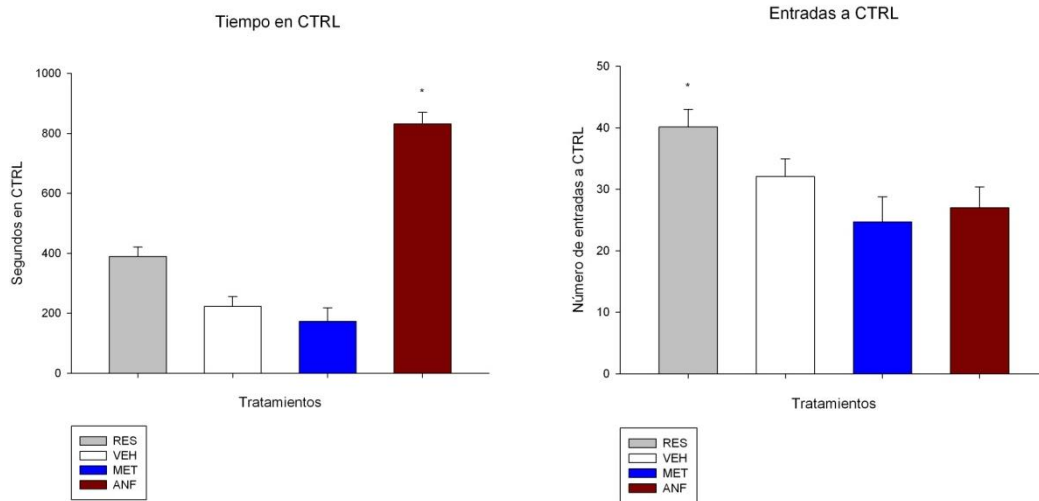


Figura 3: Tiempo y entradas a la zona campo central (CTRL) del Laberinto Concéntrico Multivariado: los tratados con anfetaminas (ANF) estuvieron más tiempo en esta zona que el resto de los grupos, mientras los tratados con reserpina (RES) tuvieron más entradas. Asteriscos marcan diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresan las medias \pm error.

- Zona oscura (OSC)

El ANOVA no indicó diferencias significativas en la variable tiempo de permanencia de las ratas en la zona oscura según tratamientos ($F(3,41)=0,89$, $p=0,45$). Tampoco se pudo ver diferencias significativas en el número de entradas a la zona ($F(3, 41)=1,2$, $p=0,32$) (Figura 4)

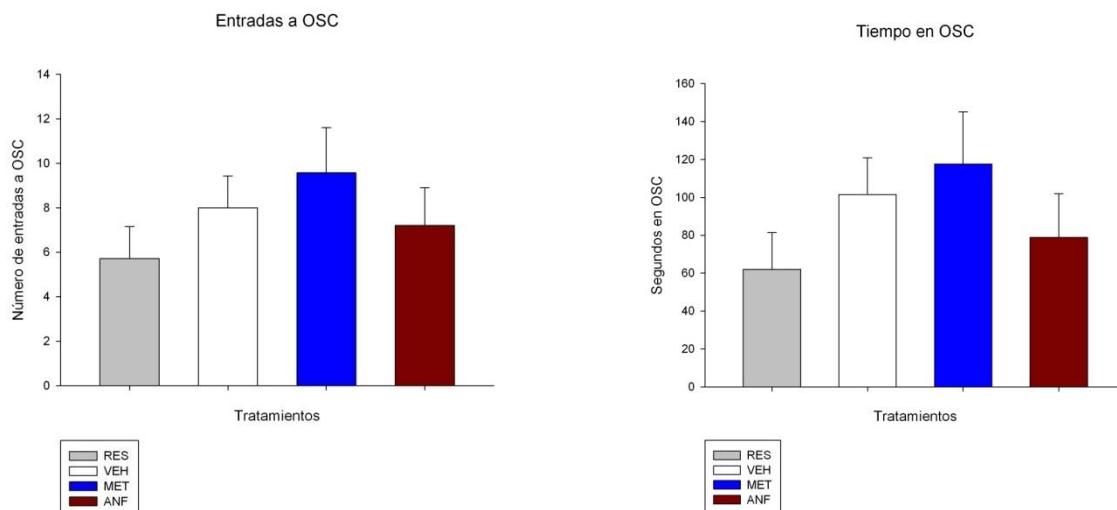


Figura 4: Tiempo y entradas a la zona oscura(OSC) del Laberinto Concéntrico Multivariado: no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables según los tratamientos. Los valores expresan las medias±error.

- Zona desafío (DES)

El ANOVA indicó diferencias significativas en la variable tiempo de permanencia de las ratas en la zona según tratamientos ($F(3, 41)=3,01, p<0,05$). La prueba de Fisher reveló que las ratas tratadas con anfetamina (ANF) y reserpina (RES) tienen una permanencia menor que el resto de los grupos, siendo el de mayor permanencia el tratado con metilfenidato (MET). El mismo patrón se pudo ver en el número de entradas a la zona ($F(3, 40)=4,7, p<0,05$) (Figura 5).

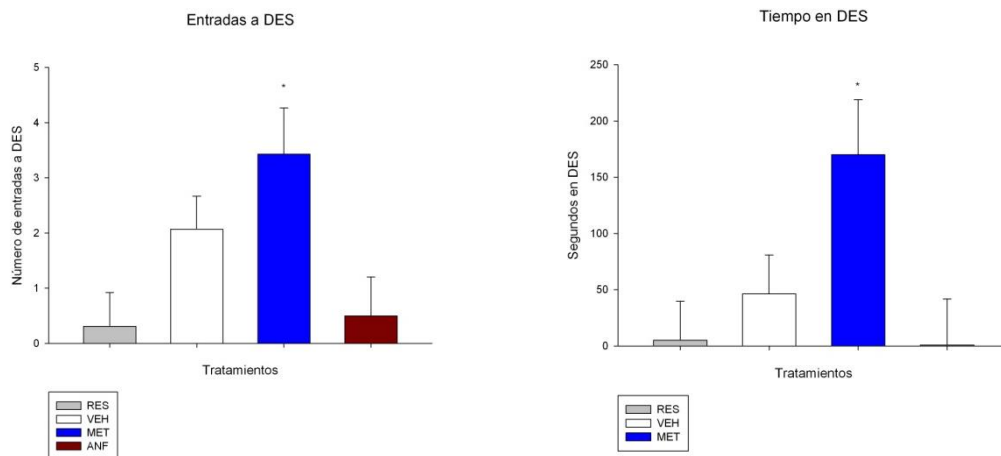


Figura 5: Tiempo y entradas a la zona desafío (DES) del Laberinto Concéntrico Multivariado: los tratados con anfetaminas (ANF) y reserpina (RES) estuvieron menos tiempo y entradas en esta zona que el resto de los grupos. Asteriscos marcan diferencias significativas ($p<0,05$). Los valores expresan las medias±error.

- Zona rampa (RAMP)

El ANOVA indicó diferencias significativas en la variable tiempo de permanencia de las ratas en la rampa según tratamientos ($F(3, 41)=17,2, p<0,05$). La prueba de Fisher reveló que las ratas tratadas con anfetamina (ANF) fueron las de menor permanencia y las tratadas con reserpina (RES) las de mayor. El mismo patrón se pudo ver en el número de entradas a la zona ($F(3, 41)=33,1, p<0,05$) (Figura 6).

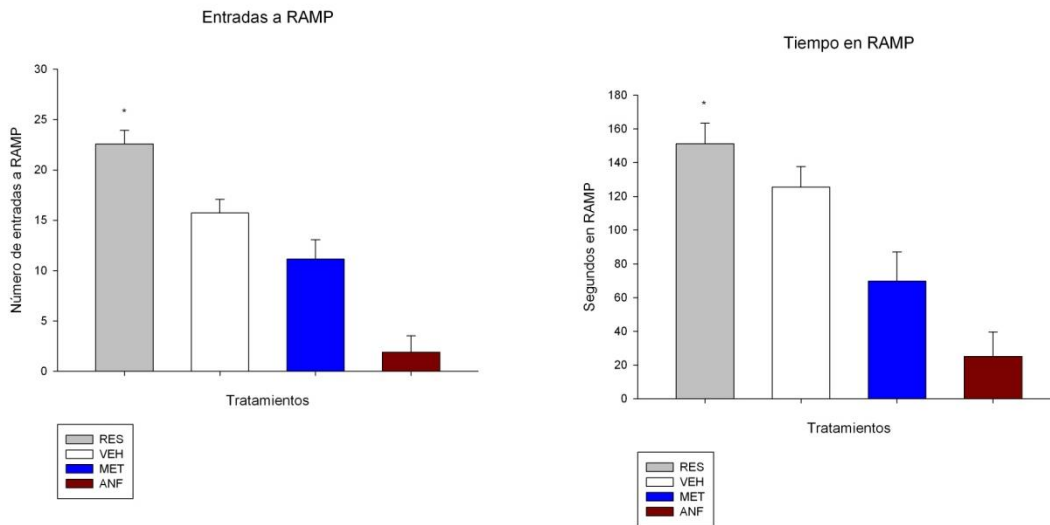


Figura 6: Tiempo y entradas a la rampa (RAMP) del Laberinto Concéntrico Multivariado: los tratados con anfetaminas (ANF) fueron los que menos tiempo y entradas tuvieron, mientras que los tratados con reserpina (RES) mostraron el perfil opuesto. Asteriscos marcan diferencias significativas ($p<0,05$). Los valores expresan las medias \pm error.

- Zona puente

El ANOVA indicó diferencias significativas en la variable tiempo de permanencia de las ratas en el puente según tratamientos ($F(3, 41)=13,1, p<0,05$). La prueba de Fisher reveló que las ratas tratadas con anfetamina (ANF) fueron las de menor permanencia y las tratadas con reserpina (RES) las de mayor. El mismo patrón se pudo ver en el número de entradas a la zona ($F(3, 41)=9,7, p<0,05$) (Figura 7)

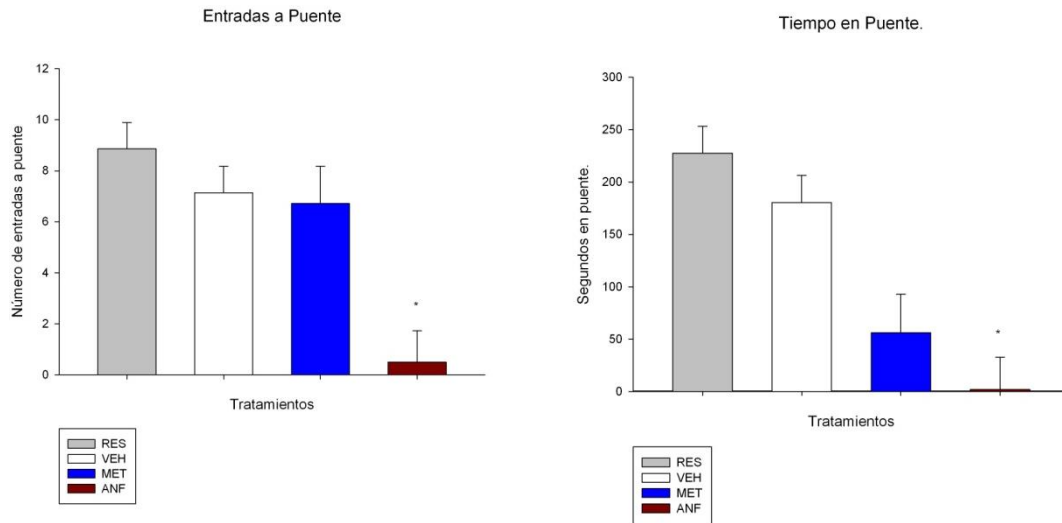


Figura 7: Tiempo y entradas a el puente del Laberinto Concéntrico Multivariado: los tratados con anfetaminas (ANF) fueron los que menos tiempo y entradas tuvieron, mientras que los tratados con reserpina (RES) mostraron el perfil opuesto. Asteriscos marcan diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores se expresan como media \pm error.

DISCUSIÓN

Los modelos animales son una importante aproximación para la investigación de los mecanismos subyacentes a diferentes enfermedades, para probar nuevas estrategias, distintos métodos de tratamiento, y para evaluar la eficacia potencial de las intervenciones terapéuticas. Los trastornos mentales (depresión -manía), son difíciles de replicar en animales de laboratorio, por ser trastornos especie específicos que son propias de los humanos. Sin embargo, es importante trabajar con modelos animales para reproducir síntomas particulares de enfermedades mentales en el laboratorio.

En el humano ocurre una superposición entre los estados de depresión y ansiedad, en donde ambos trastornos presentan un estado de disforia (estado de ánimo desagradable caracterizado por tristeza e irritabilidad). Este solapamiento ocurre por afectividad negativa, por una predisposición genética compartida entre determinados individuos o por una neurobiología común a estos estados (Goodwin, 2015). Investigaciones sobre modelos de estrés crónico inducido en animales, semejante a los que se usan para el estudio de depresión observaron que el comportamiento asociado era ambiguo, en algunos estudios se evidenciaban un aumento de ansiedad luego de ocasionarles estrés (Maslova y col., 2002; Griebel y col., 2002), mientras que en otros disminuía (D'Aquila y col., 1994; Kopp y col., 1999). Estas contradicciones no son sorprendentes, ya que la depresión puede manifestarse por un estado de alta ansiedad o por una pérdida de interés en el ambiente indicado por reacciones demostrativas a situaciones estresantes (Kompagne et al., 2008). En esta experiencia esta particularidad la pudimos modelar usando la reserpina dado que los animales

manifestaron síntomas de depresión (ej bajos niveles de dopamina) y de ansiedad (mayor tiempo en zonas de riesgo en el laberinto concéntrico).

Es importante resaltar que los modelos farmacológicos para modelar manía en animales presentan varias limitaciones. En primer lugar debemos destacar que en la bibliografía se usan pocos síntomas para afirmar que se estén modelando estados maníacos, sobre todo activación motora. Nuestra experiencia en este sentido es más completa dado que no solo observamos y medimos variables comportamentales, sino que también cuantificamos niveles de dopamina en la ínsula.

La droga más comúnmente usada para modelar la manía es la anfetamina y metilfenidato. La anfetamina es una droga de alto costo y difícil de conseguir por sus implicancias legales, de forma que decidimos primero trabajar en la inducción de este modelo mediante metilfenidato, una droga comercial y de uso médico. Este trabajo nos permitió tener una perspectiva comparada de los dos modelos.

Los resultados observados son consistentes con muchos estudios que señalan que el tratamiento crónico con anfetaminas puede alterar el funcionamiento del sistema dopaminérgico. Se evidenció que la liberación de dopamina se redujo en ratas adultas inyectadas diariamente con anfetaminas (2,5 mg/kg durante 14 días; Renard et al., 2014), y trabajos anteriores indicaron disminución de dopamina y pérdida de receptores en el cuerpo estriado dorsal (Krasnova et al., 2001; Wagner et al., 1980) y en el bulbo olfatorio (Atianjoh et al., 2008), después de un tratamiento repetido con anfetaminas. Es interesante observar que una exposición a anfetaminas de 6 días en ratas (5.0 o 10.0 mg/kg/d) se ha asociado con un comportamiento de tipo depresivo y déficits en la función de recompensa cerebral, como lo indica el test de la auto administración intracraneal de anfetaminas (Cryan et al., 2003). Además, la exposición repetida a anfetaminas o metilfenidato se ha utilizado para inducir estados de tipo psicótico (Frey et al., 2006). No medimos estas variables, sin embargo, no podemos descartar que puedan haber surgido alteraciones similares en nuestro estudio. Aunque también, es importante resaltar que en cuadros psicóticos usualmente se han documentado altos niveles de dopamina (es decir, lo opuesto de lo que estamos informando) y sobreactivación de sus receptores (Tost et al., 2010). Es fundamental destacar que el diseño experimental no incluyó sujetos administrados con anfetaminas o metilfenidato fuera de la adolescencia, por lo que no se puede concluir que el patrón encontrado es un efecto específico de esta etapa del desarrollo.

En investigaciones previas (Ruiz et al., 2018) evaluó la actividad motora y el consumo de alcohol en modelos maníacos. Se pudo observar que tanto la anfetaminas como el metilfenidato generó activación conductual, pero solo la primera alteró los niveles de dopamina y estimuló el consumo de alcohol. Estos resultados se suman a los presentados en esta tesis, lo cual lleva a cuestionar el modelo de manía en base al uso de metilfenidato.

En tanto al modelo de depresión, en primer lugar pudimos confirmar que la reserpina induce comportamientos asociados a depresión y generalizamos este hallazgo a animales adolescentes. Con esta información, y trabajos previos, podemos afirmar que luego de un tratamiento con reserpina, adultos (Minor&Hanff, 2015; Ozerov et al., 2016; Socala et al., 2016) y adolescentes son igualmente sensibles a la inducción de comportamientos asociados a la depresión.

Según los resultados obtenidos pudimos observar que la administración de reserpina indujo una significativa caída en los niveles de dopamina (ng/gr de tejido) en la corteza insular. Es posible que la disminución que observamos en la actividad dopaminérgica sea una consecuencia de la actividad incrementada del sistema opiáceo kappa. Este sistema manifiesta efectos de estrés y participa en la etiopatogenia de numerosas enfermedades psiquiátricas, y notablemente en trastornos de ansiedad y estrés (Crowley & Nash, 2015). También se sabe que el sistema kappa es uno de los principales mediadores de los estados de estrés y disforia, y su activación prolongada está asociada a depresión y ansiedad.

En base a los resultados obtenidos sobre el estudio de la dopamina en la ínsula en los modelos maníacos, pudimos observar que no corresponde con lo que dice la bibliografía. Evidenciamos que el metilfenidato no afecta significativamente esta variable, generó cambios de comportamiento como se vio en el laberinto concéntrico (ej como era de esperarse las ratas tratadas con dicha droga estuvieron mayor tiempo en zonas de desafío), pero no se vieron acompañados por variaciones significativas de los niveles de dopamina en la ínsula.

En cambio en los animales tratados con anfetamina, bajó la cantidad de dopamina en ínsula en vez de subirla como manifiesta la bibliografía. Una posible explicación para la baja de dopamina, es la forma en que se administró la droga (4 mg/k durante 5 días). Cuando esto sucede en una persona que consume, en primera instancia las anfetaminas se consumen en dosis única y generan euforia y refuerzo (fase de inicio) debido fundamentalmente a su capacidad para liberar dopamina en los terminales dopaminérgicos de la vía mesocorticolímbica (núcleo accumbens y corteza prefrontal). Cuando el consumo aumenta (fase de consolidación), aparece la tolerancia que puede superarse con aumento de la dosis o cambiando la vía de administración. En esta etapa comienza la depleción de dopamina. La tolerancia se va incrementando y se inicia el consumo en forma de atracones (binges) para poder mantener la euforia. Este consumo brusco dura unas 12/48 horas y termina con el agotamiento del individuo que necesita varios días de recuperación. En esta fase los niveles de dopamina están muy bajos y posiblemente existe alteración neuronal (Robledo, 2008).

En las variables comportamentales estudiadas, como era de esperarse pudimos apreciar que las ratas tratadas con anfetamina permanecieron mayor tiempo en el sector control. De lo contrario permanecieron poco tiempo en el sector puente, siendo este sector el más iluminado. En cuanto a la variable entradas a los distintos sectores, pudimos ver que las ratas tratadas con anfetamina tuvieron pocas entradas en el puente. Las ratas tratadas con reserpina a diferencia de lo esperado, tuvieron más tiempo de permanencia en la rampa. En cambio en la variable entradas a los distintos sectores, constatamos que los animales tratados con reserpina presentaron mayor cantidad de entrada en rampa y control (a diferencia de lo que plantea la bibliografía). Asimismo observamos que no hubo diferencias de tiempo y entradas al sector oscuridad administrando las diferentes drogas.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que de los tres modelos estudiados, el modelo maniaco a través de metilfenidato no concuerda con la bibliografía ya que no se observa resultados significativos en variables neurofisiológicas, sin embargo sirve para modelar la respuesta motora característica de la manía.

La anfetamina en cambio mostró alteraciones a nivel de la dopamina en la ínsula, pero disminuyéndola, a diferencia de lo esperado. Con respecto a la actividad motora no fue acorde a lo esperado, ya que las ratas estuvieron mayor permanencia en sectores más oscuros y de bajo riesgo, opuesto a lo planteado en los estados maniacos humanos.

Respecto a este modelo la principal contribución de este trabajo es que un tratamiento corto con anfetamina durante la adolescencia puede modificar significativamente los niveles de dopamina en la ínsula. La exposición crónica a metilfenidato en cambio, no afectó evidentemente estos resultados. Los resultados actuales ponen en evidencia cierta precaución sobre el uso de estimulantes, particularmente anfetaminas, como un medio para tratar el Trastorno del déficit atencional, durante la adolescencia.

Respecto a la reserpina pudimos comprobar que estuvo asociada a menores concentraciones de dopamina en la ínsula. Pudimos evidenciar el comportamiento asociado a la depresión en la prueba del laberinto concéntrico multivariado, donde las ratas tienen múltiples opciones comportamentales disponibles, entre ellas la posibilidad de pasar más tiempo en zonas que implican riesgo potencial, como el puente. En dicha prueba las ratas administradas con reserpina exhibieron, al ser comparadas con pares controles, mayor nivel de actividad en el laberinto, y este mayor nivel de actividad fue probablemente el resultado del mayor número de visitas realizadas a las zonas de riesgo del mismo. En definitiva, entendemos que la administración de reserpina generó un fenotipo con alteraciones motoras, motivacionales, neurales y cognitivas que sugieren que fuimos relativamente exitosos en la generación de un modelo de depresión en la adolescencia cuando la compramos con lo visto en humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Abin-Carriquiry, JA., Costa, G., Urbanavicius, J., Cassels, BK., Rebolledo Fuentes, M., Wonnacott, S., Dajas F. (2008). In vivo modulation of dopaminergic nigrostriatal pathways by cytosine derivatives: implications for Parkinson's Disease. *European Journal of Pharmacology*, 589 (1-3): 80-84.
- 2) Aleksandrov, V., Fedorova, K. (2003). Structure of the Insular Region of the Rat Neocortex. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33 (3): 199-202.
- 3) Allen, GV., Saper, CB., Hurle, y KM., Cechetto, DF. (1991). Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 311: 10-16.
- 4) American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5a. ed. Washington. American Psychiatric Publishing, 991 p.
- 5) Argentina (2009). Normativa para la certificación de discapacidad en pacientes con trastornos del estado de ánimo. Disposición 929/2009 del 17 de abril de 2009. Servicio Nacional de Rehabilitación. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-930-2009-153274/texto>
Fecha de consulta: 13 de abril del 2020.
- 6) Atianjoh, F. E., Ladenheim, B., Krasnova, I. N., Cadet, J. L. (2008). Amphetamine causes dopamine depletion and cell death in the mouse olfactory bulb. *European Journal of Pharmacology*, 589 (1-3): 94-97.
- 7) Balarezo, G., Balarezo, J. M. (2016). Manía: Un trastorno más común de lo que se piensa. *Científica*, 13 (1): 65-74.
- 8) Baldwin, D., Birtwistle, J. (2002). *An Atlas of Depression*. Southamont: The Parthenon Publishing gro. 124 p.
- 9) Bergner, C., Hart, P., Dufour, B., Smolinsky, A., Egan, R., LaPorte, J., Kaweff, A. (2010). Analysis of Abnormal Repetitive Behaviors in experimental animal models. En: Warnik, J.E., Kauleff, A. V. *Translational Neuroscience in animal research*. New York, Nova Science, p 71-82.
- 10) Bogle, K. E., Smith, B.H. (2009). Illicit methylphenidate use: a review of prevalence, availability, pharmacology, and consequences. *Current Drug Abuse Reviews*, 2 (2): 157-76.
- 11) Burke, A.; Miczek, K. (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)*, 231: 1557-1580.
- 12) Cassano, P., Argibay, P. (2009). La enfermedad depresiva y sus modelos animales. *Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29 (2): 117-120.

- 13) Coutts, R., Nazarali, A., Baker, G., Pasutto, F. (1986). Metabolism and disposition of N-(2-cyanoethyl) amphetamine (Fenproporex) and amphetamine: study in the rat brain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64 (6): 724-728.
- 14) Crowley, N.; Kash, T. (2015). Kappa opioid receptor signaling in the brain: Circuitry and implications for treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 62: 51-60.
- 15) Cryan, J. F., Hoyer, D., Markou, A. (2003). Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biological Psychiatry*, 54 (1): 49–58.
- 16) Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64 (4): 293–310.
- 17) D'Aquila, P.; Brain, P.; Willner, P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiological Behaviour*, 56: 861–867.
- 18) Damian, JP., Ruiz, P., Acosta, M., Garcia, E. (2012). Reasons for medical consultation and causes of euthanasia of dogs in Montevideo city (Uruguay): A survey of veterinary practitioners. Implications of Behavioral problems. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 59: 97-101.
- 19) Davidoff, L.(1989) Introducción a la psicología. 3º ed. México, McGraw-Hill, 840 p.
- 20) Deen, B., Pitskel, N., Pelphrey, K. (2011). Three Systems of Insular Functional Connectivity Identified with Cluster Analysis. *Cerebral Cortex*, 21: 1498–1506.
- 21) Deussing, J. (2006). Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3: 375-383.
- 22) Diehl, D., Gershon, S. (1992). The role of dopamine in mood disorders. *Comprehensive Psychiatry*, 33 (2): 115-120.
- 23) Dodman, N L., Shuster, L. (2000). Psicofarmacología de los trastornos del comportamiento animal. Buenos Aires. Intermédica. 352p.
- 24) Doremus, T.; Spear, L. (2016) Reward-centricity and attenuated aversions: An adolescent phenotype emerging from studies in laboratory animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 70: 121-134.
- 25) Dunn, HG., Stoessi, AJ., HoHH, MacLeod, P.M., Poskitt, K.J., Doudet, D.J., (2002). Rettsyndrome: Ivestigation of nine patients, induding PET scan. *Canadian Journal of Neurological Science*, 29: 345-357.
- 26) Duque, J.E., Hernán, O., Devia, A. (2004). El lóbulo insular. Un lóbulo de procesamiento cortical visceral. *Acta Neurol. Colom.* 20 (2): 90-92.

- 27) Ekinci, O., Direk, O. M, Ekinci, N. Okuyaz. (2016). Manic Symptoms Due to Methylphenidate Use in and Adolescent with traumatic. *Brain*, 14 (3) :314-317.
- 28) Evans, D.; Charney, D.; Lewis, L.; Golden, R.; Gorman, J.; Krishnan, K.; Nemeroff, C.; Bremner, J.; Carney, R; Coyne, J.; DeLong, M.; Frasure-Smith, N.; Glassman, A.; Gold, P.; Grant, I.; Gwyther, L.; Ironson, G.; Johnson, R.; Kanner, A.; Katon, W.; Kaufmann, P.; Keefe, F.; Ketter, T.; Laughren, T.; Leserman, J.; Lyketsos, C.; McDonald, W.; McEwen, B.; Miller, A.; Musselman, D.; O'Connor, C.; Petitto, J.; Pollock, B.; Robinson, R.; Roose, S.; Rowland, J.; Sheline, Y.; Sheps, D.; Simon, G.; Spiegel, D.; Stunkard, A.; Sunderland, T.; Tibbits, P.; Valvo, W. (2005). Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological Psychiatry*; 58: 175-189.
- 29) Escorihuela, R., Fernández-Terual, A. (1998). Modelos Animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual*, 6 (1): 165-191.
- 30) Flores Aguirre, C.J. (2011) De los modelos animales a la práctica psicológica: El surgimiento de algunas técnicas aplicadas a problemas de salud. *Suma Psicológica*, 18: 115-123.
- 31) Frey, B. N., Andreazza, A. C., Cereser, K. M., Martins, M. R., Valvassori, S.S., Reus, G. Z., Kapczinski, F. (2006). Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences*, 79 (3): 281–286.
- 32) Gagliano, HA. (2015). ¿Puede el metilfenidato atenuar el impacto del estrés?. Un modelo experimental en rata. Tesis Universitat Autònoma de Barcelona, 176p.
- 33) Goodwin, G. (2015). The overlap between anxiety, depression, and obsessive compulsive disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17:249-260.
- 34) Gómez-Restrepo, C.; Bohórquez, A.; Pinto Masis, D.; Gil Laverde, J.; Rondón Sepúlveda, M.; Díaz Granados, N. (2004). Prevalencia de depresión y factores asociados con ella en la población colombiana. *Revista Panameña de Salud Pública*, 16: 378–386.
- 35) Griebel, G.; Simiand, J.; Steinberg, R.; Jung, M.; Gully, D.; Roger, P.; Geslin, M.; Scatton, B.; Maffrand, J.; Soubrié, P. (2002). 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]-5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 30: 333–345.
- 36) Houpt, KA., Wolski, TR. (1982). Domestic animal behavior for veterinarians and animal scientists. Ames, Iowa State University, 408 p.
- 37) Hyman, S.E. (1996). Addiction to cocaine and amphetamine. *Neuron*, (Cambridge) 16: 901-904.

- 38) Jakab, A., Molnár, P., Bogner, P., Béres, M., Berényi, E. (2012). Connectivity-based parcellation reveals interhemispheric differences in the insula. *Brain Topography* 25: 264–271.
- 39) Jones, C.A., Watson, D.J., Fone, K. (2011) Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, 164: 1162-1194.
- 40) Karanikas, C., Lu, Y., Richardson, H. (2013). Adolescent drink-ing targets corticotropin-releasing factor peptide-labeled cells in the central amygdala of male and female rats. *Neuroscience*, 249: 98–105.
- 41) Kato, T., Kasahara, T., Kubota-Sakashita, M., Kato, T., Nakajima, K. (2016). Animal models of recurrent or bipolar depression. *Neuroscience*, 321(3): 189–196.
- 42) Kelly, C., Toro, R., Di Martino, A., Cox, C., Bellece, P., Castellanos, F., Milham, M. (2012). A convergent functional architecture of the insula emerges across imaging modalities. *NeuroImage*, 61: 1129-1142.
- 43) Kendler, K.; Gardner, C.; Prescott, A. (2002). Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *American Journal of Psychiatry*, 159: 1133–1145.
- 44) Kessler, R.; Berglund, P.; Demler, O.; Jin, R.; Merikangas K.; Walters, E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, 62: 593-602
- 45) Kohn, R.; Saxena, S.; Levav, I.; Saraceno, B. (2004). The treatment gap in mental health care. *Bulletin of the World Health Organization*, 82: 858-866.
- 46) Kompagne, H.; Bárdos, G.; Szénási, G.; Gacsalyi, I.; Harsing, L.; Levay, G. (2008). Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxietylike behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, 193: 311-314.
- 47) Kopp, C.; Vogel, E.; Rettori, M.; Delagrangé, P.; Misslin, R. (1999). The effects of melatonin on the behavioural disturbances induced by chronic mild stress in C3H/He mice. *Behavioural Pharmacology*, 10: 73–83
- 48) Krasnova, I. N., Ladenheim, B., Jayanthi, S., Oyler, J., Moran, T. H., Huestis, M. A., & Cadet, J. L. (2001). Amphetamine-induced toxicity in dopamine terminals in CD-1 and C57BL/6J mice: Complex roles for oxygen-based species and temperature regulation. *Neuroscience*, 107 (2): 265– 274.
- 49) Krishnan, V.; Nestler, E. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455: 894-902.
- 50) Kurth, F., Zilles, K., Fox, P., Laird, A., Eickhoff, S. (2010). A link between the systems: functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis *Brain Structure and Function* , 214: 519–534.

- 51) Laborda, M. (2009). Modelos animales en psicopatología experimental: miedo, tolerancia a las drogas y condicionamiento. *Revista de Psicología*, 18 (2): 81-104.
- 52) Leite, M.; Perez-Acosta, A. (2001). Modelos animales en psicopatología: ¿una contribución o una ilusión?. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 19: 37-50.
- 53) Li, S., Han, J., Wang, D.S., Feng, B., Deng, Y.T., Wang, X.S., Yang, Q., Zhao, M.G. (2016). Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. *Metabolic and Brain Disease*, 31 (2): 455-463.
- 54) Luque, R., Barrios. G.E. (2011). Historia de trastorno afectivo. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 40: 130-146.
- 55) Machado-Vieira, R., Kapczinski, F., Soares, J. (2004). Perspectives for the development of animal models of bipolar disorders. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28: 209-224.
- 56) Man KKC, D., Coghill, EW., Chan, WCY., Lau, C., Hollis, E., Liddle, T., Banaschewski, S., McCarthy, A., Neubert, K., Sayal, P., Ip and ICK Wong. (2016). Methylphenidate and the risk of psychotic disorders and hallucinations in children and adolescent in a large health system. *Traslational Psychiatry*, 6 (11): e 956.
- 57) Maslova, L.; Bulygina, V.; Markel, A. (2002). Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 27: 549–561.
- 58) Mattei, R. ;Carlini, E. A. (1996). A comparative study of the anorectic and behavioral effects of Fenproporex on male and female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1025-1030.
- 59) McCullough, L. D., de Vries, G. J., Miller, V. M., Becker, J. B., Sandberg, K., McCarthy, M. M. (2014). NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: Generative questions to guide policy, 12 of 13 implementation, and metrics. *Biology of sex Differences*, 5, 15.
- 60) Mendel, E. (1907). *Textbook of Psychiatry*. Harvard: Davis Company. 311 p.
- 61) Mesulan, MM., Mufson, Ej. (1982). Insula of the old work monkey, II: afferent cortical input and comments on the claustrum. *Journal of Comparative Neurology*, 212: 23-37.
- 62) Meyerson, B. J., Augustsson, H., Berg, M., Roman, E. (2006). The Concentric Square Field: a multivariate test arena for analysis of explorative strategies. *Behavioural Brain Research*, 168 (1): 100-13.
- 63) Minor, T., Hanff, T. (2015). Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 286 (1): 184–191.

- 64) Mutschler, I., Wieckhorst, Kowalewski, S., Derix, J., Wentland, J., SchulzeBonhage, A. (2009) Functional Organization of the human anterior Insular Cortex. *Neuroscience Letters*, 457 (2): 66-70.
- 65) Nestler, E., Hyman, S. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10): 1161-1169.
- 66) Organización Mundial de la Salud. OMS. (2000). Guía de Bolsillo de la Clasificación CIE-10. Madrid, Médica Panamericana, 337 p. Disponible en: apps.who.int Fecha de consulta: 13 de abril del 2020.
- 67) Overmier, J. (2007). La investigación básica con animales fortalece la ciencia y la práctica de la psicología. *Interdisciplinaria*, 24: 211-228.
- 68) Ozerov, A.; Bagmetova, V.; Chernysheva, V.; Tyurenkov, I. (2016). Comparison of the Efficiency of Adeprophen and Antidepressants of Various Groups on the Model of Reserpine-Induced Depression in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160: 649-652.
- 69) Pucci, M., Di Bonaventura, M., Wille-Bille, A., Fernández, M., Maccarrone, M., Pautassi, R.M., Cifani, C., D'Addario, C. (2018). Environmental stressors and alcoholism development: focus on molecular targets and their epigenetic regulation. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, 106: 165-181.
- 70) Renard, G. M., Sotomayor-Zarate, R., Blanco, E. H., & Gysling, K. (2014). Withdrawal from chronic amphetamine reduces dopamine transmission in the rat lateral septum. *Journal of Neuroscience Research*, 92 (7): 937-943.
- 71) Robledo, P. (2008). Las Anfetaminas. *Trastornos Adictivos*, 10 (3): 166-74.
- 72) Rubio-Morell, B., Martín-González, R., Herreros-Rodríguez, O., González-Pérez, P., Hernández-Expósito, S., Quintero-Fuentes, I., Gracia-Marco, R. (2008). Evaluación neuropsicológica de la eficacia del metilfenidato-OROS en el trastorno por déficit de atención/hiperactividad. *Revista de Neurología*, 46 (10): 602.
- 73) Ruiz, P. (2015). ¿Qué sabemos sobre el contagio emocional ?. Definición, evolución, neurobiología y su relación con la psicoterapia. *Cuadernos de Neuropsicología*, 9 (3):15-24.
- 74) Ruiz, P., Calliari, A., Pautassi, R. (2017). Consumo de alcohol en ratas adolescentes tratadas con reserpina y fluoxetina. *Suma Psicológica*, 24 (1): 67-77.
- 75) Ruiz, P., Calliari, A., Pautassi, R. (2018). Reserpine-induced depression is associated in female, but not in male, adolescent rats with heightened, fluoxetine-sensitive, ethanol consumption. *Behavioural Brain Research*, 21 (348): 160-170.
- 76) Ruiz, P., Genovese, P., Bielli, A., Herrera, E., Pautassi, P. (2018). La reserpina aumenta la expresión de BDNF y PCNA, y disminuye la de caspasa-3, en células intersticiales (de Leydig) de rata. *International Journal of Morphology*, 36 (3): 895-900.

- 77) Ruiz, P., Pilatti, A., Pautassi, R. (2020). Consequences of alcohol use, and its association with psychological distress, sensitivity to emotional contagion and age of onset of alcohol use, in uruguayan youth with or without college degree. *Alcohol Journal*, 82: 91-101.
- 78) Shaltiel, G., Maeng, S., Malkesman, O., Pearson, B., Schloesser, R., Tragon, T., Rogawski, M., Gasior, M., Luckenbaugh, D., Chen, G., Manji, HK. (2008). Evidence for the involvement of the kainite receptor subunit GluR6 (GRIK2) in mediating behavioral displays related to behavioral symptoms of mania. *Molecular Psychiatry*, 13 (9): 858-72.
- 79) Sigitova, E., MD, ZdenekFisar, MSci, PhD, Hroudova, J, MPharm, PhD, Cikankova, T, MPharm, Raboch, J, MD, DSc. (2017). Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 71: 77-103.
- 80) Simmons, W., Avery, A., Barcalow, J., Bodurka, J., Drevets, W., Bellgowan, P. (2012). Keeping the body in mind: Insula functional organization and functional connectivity integrate interoceptive, exteroceptive, and emotional awareness. *Human Brain Mapping*, 34 (11): 2944-2958.
- 81) Socala, K., Nieoczym, D., Pieróg, M., Szuster-Ciesielska, A., Wyska, E., Wlaż, P. (2016). Antidepressant like activity of sildenafil following acute and subchronic treatment in the forced swim test : effects of restraint stress and monoamine depletion. *Metabolic Brain Disease*, 31 (5): 1095-104.
- 82) Spear, L. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, 24 (4): 417-63.
- 83) Steimer, T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clinical Neuroscience*, 13: 495-506.
- 84) Substance Abuse and Mental Health Services Administration. SAMHSA (2015). Behavioral health trends in the United States. Results from the 2014 National Survey on drug use and health. Rockville, SAMHSA, 64 p. Disponible en: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUH-FRR1-2014/NSDUH-FRR1-2014.pdf> Fecha de consulta: 13 de abril del 2020.
- 85) Tost, H., Alam, T., Meyer-Lindenberg, A. (2010). Dopamine and psychosis: theory, pathomechanisms and intermediate phenotypes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34 (5): 689-700.
- 86) Wagner, G. C., Ricaurte, G. A., Johanson, C. E., Schuster, C. R., Seiden, L. S. (1980). Amphetamine induces depletion of dopamine and loss of dopamine uptake sites in caudate. *Neurology*, 30 (5): 547-550.
- 87) Wille-Bille, A., Ferreyra, A., Sciangula, M., Chiner, F., Nizhnikov, M., Pautassi, RM. (2017). Restraint stress enhances alcohol intake in adolescent female rats but reduces alcohol intake in adolescent male and adult female rats. *Behavioural Brain Research*, 14 (332): 269-279.

88) Wu, Z.; Fang, Y. (2014). Comorbidity of depressive and anxiety disorders: challenges in diagnosis assessment. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 26 (4), 227-231.

89) Young, JW., Henry, B., Geyer, MA. (2011). Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 164 (4): 1263-84.

90) Zúñiga, M., Farías, X., (2002). Manía en niños y adolescentes. *Revista Chilena de Neuropsiquiatría*, 40(1): 31-40.

91) Zúñiga, A., Sandoval, M., Torres, C., Juarez, N., Bayardo, S. (2005). Los trastornos de estado de ánimo. *Revista Digital Universitaria*, 6 (11): 2-14.