



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO DEL
ANTAGONISTA ZM 241385 Y LOS CAMBIOS INDUCIDOS EN
LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR
PURINÉRGICO A_{2A} EN EL MODELO DE DEPRESIÓN
CRÓNICA EN RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICOS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. KARLA MARGARITA PADILLA OLVERA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER SANTIAGO

DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, CENTRO UNIVERSITARIO,

DICIEMBRE, 2017.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO DEL ANTAGONISTA ZM 241385 Y
LOS CAMBIOS INDUCIDOS EN LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL
RECEPTOR PURINÉRGICO A_{2A} EN EL MODELO DE DEPRESIÓN CRÓNICA EN
RATA

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Karla Margarita Padilla Olvera

Dirigido por:

Dra. María Guadalupe García Alcacer

SINODALES

Dra. María Guadalupe García Alcacer
Presidente


Firma

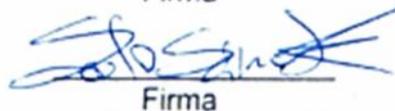
Dr. Andrés Quintanar Stephano
Secretario


Firma

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Vocal


Firma

Dr. Juan Carlos Salís Sáinz
Suplente


Firma

Dr. Fabián Harvey López Vallejo
Suplente


Firma


MSP. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, México

RESUMEN

Los trastornos depresivos mayores (TDM) se caracterizan por la gravedad y la duración de sus síntomas, lo cual hace que estos trastornos sean enfermedades altamente discapacitantes. Desafortunadamente, el 50% de los pacientes con depresión mayor experimentan recaídas, en parte debido a que el desarrollo de los fármacos antidepresivos, en su mayoría se han realizado solo en modelos animales agudos. El modelo animal de bulbectomía olfativa bilateral (OBX) presenta la ventaja de imitar los síntomas de la depresión crónica, mediante cirugía cerebral. Recientemente los receptores purinérgicos a Adenosina A_{2A} (A_{2A}R) han sido objeto de interés en el campo de las enfermedades psiquiátricas, debido a su papel en la homeostasis cerebral y plasticidad sináptica. Además, los A_{2A}R se han visto asociados con la modulación de varios procesos celulares, como la liberación de neurotransmisores y muerte neuronal entre otros. Sin embargo, continua en debate qué ligandos de A_{2A}R ejercen efectos antidepresivos. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo mostrar qué ligandos del receptor A_{2A} ejercen efectos de tipo antidepresivo, en el modelo de rata OBX utilizando la prueba de nado forzada (FST), prueba de campo abierto (PCA) y prueba de preferencia de sacarosa (SPT). Además, los modos de interacción de unión a ligando de ZM 241385 (ZM) y adenosina a receptores A_{2A} se compararon, mediante experimentos de acoplamiento molecular *in silico*. Por lo tanto, los cambios en la densidad neuronal, así como la proteína A_{2A}R y la expresión génica inducida por la administración de ZM en ratas OBX, se evaluaron a través de técnicas de inmunofluorescencia confocal y qRT-PCR. El grupo OBX + ZM exhibió cambios de comportamiento restaurados asociados con la depresión inducida por OBX, mientras que OBX + Adenosina, no mostró recuperación del comportamiento de tipo depresivo. Los estudios *in silico* revelaron dos modos principales de unión del ligando ZM con los receptores A_{2A}. Un modo compartía la misma interacción de residuos de aminoácidos que el ligando de adenosina y el otro interactuaba con la cavidad antagonista, lo que podría sugerir un posible papel agonístico parcial de ZM. Por otro lado, la administración de ZM de ratas OBX aumentó la densidad neuronal y disminuyó la sobreexpresión de A_{2A}R en la corteza prefrontal, amígdala e hipotálamo. Llegamos a la conclusión de que, a largo plazo, el compuesto ZM se puede usar en trastornos depresivos crónicos.

Palabras clave: Trastorno depresivo mayor (TDM), receptores purinérgicos A_{2A}, ZM 24385, Adenosina, Cirugía de Bulbectomía Olfatoria Bilateral (OBX).

ABSTRACT

Major depressive disorders (MDD) are characterized by their severity and long-lasting symptoms, which make such disorders highly disabling illnesses. Unfortunately, 50% of major depressive patients experience relapses, perhaps partly because antidepressant drug development has been performed only in animal models that screen for antidepressant drugs, that appear to only ameliorate acute depression symptoms. The bilateral olfactory bulbectomy (OBX) animal model presents the advantage of mimicking the symptoms of chronic depression by means of brain surgery. Recently, Adenosine purinergic receptors A_{2A} (A2AR) have been the target of interest in the field of psychiatric diseases, due to their role in brain homeostasis and synaptic plasticity, also these receptors have been associated with the modulation of several cell processes, such as neurotransmitter release, neuronal death amongst others. However, it remains debated which A2AR ligands exert antidepressant effects. Hence, this study aimed to show which A_{2A} receptor ligands exert antidepressive-like effects in the OBX rat model, using the forced swim test (FST), open field test (OFT) and sucrose preference test (SPT). The ligand binding interaction modes of ZM 241385 (ZM) and adenosine to A_{2A} receptors were compared through *in silico* molecular docking experiments. Furthermore, changes in neuronal density as well as A2AR protein and gene expression, induced by ZM administration in OBX rats were evaluated through confocal immunofluorescence and qRT-PCR techniques. The OBX + ZM group exhibited restored behavioral changes, associated with OBX-induced depression, whereas OBX + Adenosine did not show recovery from depressive-like behavior. *In silico* studies revealed two main binding modes of the ZM ligand with A_{2A} receptors. One mode shared the same amino acid residue interaction, as the adenosine ligand, and the other, interacted with the antagonist cavity, which could suggest a possible partial agonistic role of ZM. On the other hand, the ZM administration of OBX rats, increased neuronal density and decrease A2AR over-expression in prefrontal cortex, amygdala and hypothalamus. We conclude that in the long term, the ZM compound may be used in chronic depressive disorders.

Key words: Major depressive disorder (MDD), A_{2A} purinergic receptors. ZM 241385, Adenosine, bilateral olfactory bulbectomy (OBX)

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Sistema Nervioso Central (SNC)	4
2.2. Trastorno de depresión mayor (TDM)	5
2.3. Diagnóstico, curso y sintomatología del TDM	8
2.4. Discapacidad, mortalidad y prevalencia del TDM	12
2.5. Etiología del TDM	13
2.5.1 Factores Genéticos	14
2.5.2 Factores Biológicos	16
2.5.3 Factores Psicosociales	28
2.6. Tratamiento Psicológico del TDM	29
2.7. Tratamiento Farmacológico del TDM	30
2.8. Nuevos enfoques en el tratamiento del TDM	33
2.9. Señalización Purinérgica en el cerebro	33
2.10. Receptores purinérgicos y depresión	37
2.11. Receptores A _{2A} y depresión	38

3. JUSTIFICACIÓN	42
4. HIPÓTESIS	43
5. OBJETIVOS	44
5.1. General	44
5.2. Específicos	44
6. METODOLOGÍA	45
6.1. Manejo de animales	45
6.1.1 Sacrificio de animales	46
6.2. Modelo de depresión: Cirugía Bulbectomía Olfatoria Bilateral	46
6.3. Pruebas conductuales	47
6.3.1 Prueba de Nado Forzado (PNF)	47
6.3.2 Pruebas de campo abierto (PCA)	48
6.3.3 Prueba de preferencia de sacarosa	49
6.4. Diseño y tratamientos experimentales	50
6.5. Análisis de interacción ligando proteína <i>in silico</i>	51
6.6. Inmunofluorescencia	52
6.6.1 Obtención de muestras	52
6.6.2 Inmunohistoquímica	53
6.7. Análisis de la expresión génica por qRT-PCR	54
6.7.1. Obtención de muestras	54
6.7.2. Extracción de ARN	54
6.7.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)	55
6.7.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	56
6.8 Análisis estadístico	57

7. RESULTADOS	58
7.1 Modelo de depresión: Cirugía Bulbectomía Olfatoria Bilateral (OBX)	58
7.1.1 Efecto del tratamiento con los ligandos al receptor A _{2A} sobre el peso corporal	58
7.2 Evaluación del efecto de la cirugía OBX y los tratamientos farmacológicos en las pruebas conductuales	60
7.2.1. Efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado	60
7.2.2. Efecto ansiolítico en la prueba de campo abierto	61
7.2.3 Efecto anti-hedónico en la prueba de ingesta de sacarosa	64
7.3 Estudios <i>in silico</i> del acoplamiento molecular de ZM241385 y adenosina con el receptor A _{2A}	65
7.4 Efecto de la cirugía OBX y de la administración de ZM sobre la densidad neuronal en el giro dentado	68
7.5 El efecto de la administración de ZM sobre la expresión y distribución del receptor A _{2AR}	69
7.6 El efecto de la administración de ZM sobre la expresión génica del receptor A _{2AR}	74
8. DISCUSIÓN	76
9. CONCLUSIONES	86
10.REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	En el umbral de la eternidad	6
2.2	Dibujo esquemático que representa la ubicación de los grupos de cuerpos de células serotoninérgicas	17
2.3	Biosíntesis y catabolismo de la serotonina	18
2.4	Ruta de biosíntesis y degradación de los neurotransmisores de catecolaminas	21
2.5	Sistemas neuronales de relevancia en el TDM	26
2.6	Mecanismos de acción de antidepresivos comerciales	32
2.7	Clasificación de receptores purinérgicos	34
2.8	Neurotransmisión purinérgica	36
2.9	Representación esquemática de la formación y acciones de la adenosina en los diferentes tipos de células del cerebro	40
6.2	Diseño Experimental	51
7.1	Efectos de ZM 241385 y adenosina sobre el peso corporal	59
7.2	Efectos de ZM 241385 y adenosina en la PNF	61

7.3	Efectos de ZM241385 y adenosina en la PCA	63
7.4	Efectos de los ligandos A _{2A} R en la ingesta de sacarosa	65
7.5	Interacciones receptor-ligando para el receptor A _{2A}	67
7.6	Análisis de cavidades de los ligandos al receptor A _{2A}	68
7.7	Densidad neuronal en el giro dentado (GD)	69
7.8	Localización de del receptor purinérgico A _{2A}	70
7.9	Distribución del receptor A _{2A} y GFPa en hipocampo y amígdala	72
7.10	Distribución del receptor A _{2A} y GFPa en corteza cingulada e hipotálamo	73
7.11	Cuantificación del receptor A _{2A} en diferentes estructuras cerebrales de rata	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
2.1	Códigos de diagnóstico para el TDM.	10
2.2	Antidepresivos propuestos por la FDA	31
6.1	<i>Primers</i> utilizados para la amplificación del ADNc	56

1. INTRODUCCIÓN

La depresión mayor representa un problema de salud pública debido a su elevada morbilidad, ya que cerca del 16% de la población mundial presenta un trastorno depresivo (Xiong *et al.*, 2013). En México el 7.8% de la población ha presentado episodios de depresión mayor, con una tasa de 2.5 mujeres por cada varón; así lo informó La Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica (ENEP) (ENEP, 2003). Actualmente, la depresión es la tercera enfermedad más incapacitante a nivel mundial, aunque se estima que para el 2030 se convertirá en la primera afección más incapacitante (Mathers y Loncar, 2006). La depresión ha sido asociada con la morbilidad, mortalidad y costos financieros comparables con otras enfermedades crónicas como la hipertensión, la diabetes o artritis (Bouwman *et al.*, 2006). Además, la depresión tiene una prevalencia a lo largo de la vida del 16.2% y eventualmente el 15% de los individuos deprimidos cometen suicidio (Kessler *et al.*, 2007). Las tasas de prevalencia para el trastorno depresivo mayor, parecen no estar relacionadas con la raza, el nivel de estudios o de ingresos socioeconómicos, ni con el estado civil; sin embargo, sí por el género, ya que la prevalencia es mayor en las mujeres que en los hombres (American Psychological Association, 2013).

El trastorno de depresión mayor (TDM) es una patología compleja en la que intervienen factores genéticos, biológicos y psicosociales (López-Muñoz, 2011). El factor genético comprende mutaciones de diversos genes que aumentan la susceptibilidad del individuo a sufrir esta enfermedad o en su defecto modifican su respuesta al tratamiento antidepresivo (Kupfer *et al.*, 2012). El factor biológico de la patología del TDM involucra una disminución de neurotransmisores, como la serotonina, noradrenalina y dopamina a nivel del sistema nervioso central (SNC), además se han reportado alteraciones neuroendocrinas, en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA) así como en el sistema inmune (Gold *et al.*, 1988; Maes *et al.*, 1997). Por último, se han encontrado anomalías en la estructura, actividad y funcionalidad de sistemas neuronales involucrados en el procesamiento y regulación de las emociones (Kupfer

et al., 2012). El factor psicosocial es de relevancia, ya que, aunque el TDM tenga un componente genético, éste es fuertemente influenciado por las condiciones ambientales tales como: el maltrato o eventos traumáticos en la niñez y acontecimientos en la vida de alto estrés (Cash-Padgett y Jaaro-Peled, 2013).

El diagnóstico del TDM se define por el DSM-V, por la aparición de síntomas como estado de ánimo decaído la mayor parte del día o casi todos los días; disminución del interés o de la capacidad para el placer, en casi todas las actividades, enlentecimiento psicomotor, sentimientos de minusvalía y/o de culpa excesivos, ideación suicida recurrente, etc. Estos indicios no deben ser causados por la presencia de un duelo, ni por el consumo de sustancias o como efecto de una enfermedad médica (American Psychological Association, 2013). Los síntomas del TDM provocan deterioro en el funcionamiento laboral y social, ya que no solo afectan el estado del ánimo, sino que también deteriora la salud física y en su forma más extrema está asociada a una mortalidad temprana (Ingram R., 2009).

Este trastorno heterogéneo se asocia con síntomas persistentes y episodios recurrentes, además suele presentar un curso crónico y con tendencia a las recaídas. El 75-80% de los pacientes con TDM sufren recidivas y al 15-20% desarrollan formas crónicas de la enfermedad (Jacobson y Jacobson, 2002). Es relevante mencionar que los efectos de la depresión, alcanzan más allá de quien la padece; ya que la depresión también afecta de una forma u otra a los familiares, llevando así a una disfunción socio-familiar.

El tratamiento del TDM debe basarse en la comprensión de su etiología, integrando para ello la farmacoterapia y las intervenciones psicoterapéuticas. La farmacoterapia se basa en el uso de antidepresivos, los más usados se dividen en 3 grupos: 1) inhibidores de recaptura de serotonina (SSRI, por sus siglas en inglés), 2) los antidepresivos

tricíclicos (ATC) y 3) los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO). A pesar de que hace más de 50 años del accidental descubrimiento del primer fármaco antidepresivo, actualmente el tratamiento del trastorno depresivo mayor, todavía se basa en un principio de prueba y error, tanto en la elección del fármaco, como en el régimen de ajuste (Fabbri *et al.*, 2013). Por lo anteriormente mencionado, el tratamiento de muchos pacientes resulta inadecuado y pocos tratamientos resultan efectivos (Machado-Vieria y Zarate, 2011).

En la actualidad se han propuesto nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del TDM, en donde uno que ha cobrado particular interés es el sistema purinérgico, por jugar un papel destacado en las patologías del cerebro, así como su rol en la modulación de la actividad de diversos neurotransmisores involucrados en la fisiopatología TDM tales como: dopamina, ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato y serotonina, mediante mecanismos de señalización purinérgica (Burnstock *et al.*, 2011; Sperlagh *et al.*, 2012). El sistema de señalización purinérgica consiste en un conjunto de: enzimas, transportadores y receptores responsables de la síntesis, liberación, acción e inactivación extracelular de adenosina 5'-trifosfato (ATP) y adenosina.

Los receptores que responden a estas moléculas son llamados receptores purinérgicos y se dividen en dos familias: la familia P1, activados por adenosina, y la familia P2, los cuales responden a ATP. La familia P1 son receptores acoplados a proteínas G y existen 4 subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Burnstock, 2008). Los receptores A₁ y A_{2A} son de particular interés en el TDM por encontrarse expresados en regiones del sistema límbico, región encargada de procesar y regular las emociones (Burnstock *et al.*, 2011). Es interesante mencionar que desde hace tiempo se ha observado que medicamentos capaces de aumentar la biodisponibilidad de adenosina, tales como inhibidores de la adenosina desaminasa, o el uso de agonistas a adenosina generan un comportamiento depresivo en ratas (Woodson *et al.*, 1998).

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistema Nervioso Central (SNC)

El sistema nervioso central contiene más de 100.000 millones de neuronas y, en ellas se lleva una enorme complejidad de los procesos de pensamiento y acciones de control que es capaz de realizar. El cerebro recibe, cada minuto, millones de fragmentos de información, procedentes de los distintos nervios y órganos sensitivos y a continuación integra todo este cúmulo, para generar las respuestas que vaya a emitir el organismo. Las señales de entrada, nervios aferentes, llegan a las neuronas a través de las sinapsis situadas fundamentalmente en las dendritas neuronales, pero también en el soma celular. Las fibras aferentes pueden ser tan sólo unos cientos o llegar hasta 200,000. Por el contrario, la señal de salida (nervios eferentes), viaja por el único axón que abandona la neurona; este axón da origen a numerosas ramas independientes, que se dirigen hacia otras zonas del sistema nervioso central o de la periferia corporal (Guyton y Hall, 2011).

La mayor parte de las actividades del sistema nervioso se ponen en marcha cuando una experiencia sensitiva excita los receptores sensitivos, ya sea de carácter visual en los ojos, auditivo en los oídos, táctil en la superficie del organismo o de otros tipos. Esta experiencia sensitiva puede desencadenar una reacción inmediata en el encéfalo, o almacenarse su recuerdo durante minutos, semanas o años y determinar reacciones corporales en algún momento. La porción somática del sistema sensitivo, que transmite información sensitiva desde los receptores, repartidos por la superficie de todo el cuerpo y después hacia estructuras profundas. Esta información viaja al SNC a través de los nervios periféricos y se transporta de inmediato hasta múltiples zonas sensitivas en: 1) médula espinal a todos sus niveles; 2) la formación reticular del bulbo raquídeo, la protuberancia y el mesencéfalo en el encéfalo; 3) el cerebelo; 4) el tálamo, y 5) áreas de la corteza cerebral (Guyton y Hall, 2011).

Debido a la enorme complejidad del cerebro, no es de sorprenderse que algunas veces llegue a fallar, lo cual conlleva a desórdenes mentales. El daño en el cerebro puede ocurrir en varios niveles: 1) errores en su estructura (áreas del cerebro faltantes o más pequeñas, falta de conexión entre áreas del cerebro), 2) errores en circuitos locales específicos, 3) disfunción en redes neuronales (receptores a neurotransmisores), 4) disfunciones orgánicas causadas por condiciones ambientales, 5) disfunciones psicológicas por condiciones ambientales. Algunos desórdenes mentales tienen un claro componente genético, tal como el Síndrome de Down, algunos otros tienen un alta, pero no completa heredabilidad, como la esquizofrenia o autismo, algunos otros atribuidos a eventos de la vida, como algunos tipos de depresión. Sin embargo, algunos otros tienen una relación compleja entre susceptibilidad genética y condiciones ambientales, como el trastorno de depresión mayor (Purves *et al.*, 2001).

2.2. Trastorno de depresión mayor (TDM)

El trastorno depresivo mayor (TDM) es una enfermedad que afecta al individuo tanto físicamente como en su estado de ánimo y su manera de pensar (percepción de la realidad). Las personas que padecen este trastorno sufren de ideas delirio, culpabilidad exagerada, minusvalía y ansiedad; lo cual provoca estados melancólicos crónicos y recurrentes que pueden llevar al suicidio. El TDM es la forma más común de sufrimiento mental, millones de personas la padecen en todo el mundo sin importar raza, nacionalidad, cultura o posición socioeconómica. Ejemplo de ello es que grandes artistas como Eduard Munch y Vicent Van Gogh sufrieron este trastorno, expresándolo en obras artísticas como “El Grito” y “En el umbral de la eternidad”, respectivamente (Figura 2.1).

Van Gogh envió una carta a su hermano, antes de pintar esta obra, en la cual escribió: "Soy incapaz de describir exactamente cuál es mi problema. De cuando en cuando tengo ataques horribles de ansiedad, aparentemente sin motivo, y otras veces una sensación de vacío y fatiga en la cabeza... a veces tengo ataques de melancolía y de

remordimientos atroces". Estas obras artísticas representan la percepción de la realidad que tienen las personas que padecen depresión mayor.

La depresión se define como un estado patológico producido por una mayor o menor exaltación afectiva de carácter melancólico y angustioso que se acompaña de cierto grado de disminución de la actividad motriz. El timbre afectivo es displacentero; hay una inhibición cortical y, por consiguiente, una determinada bradipsiquia (lentitud psíquica, mental o del pensamiento); temor hacia personas u objetos (puede llegar a ser delirante); ideas de negación y de no existencia, tanto de sí mismo como del mundo circundante; ideas de autoacusación e indignidad; sentimientos de inquietud y sin expectativas del futuro (Agüero *et al.*, 2000).

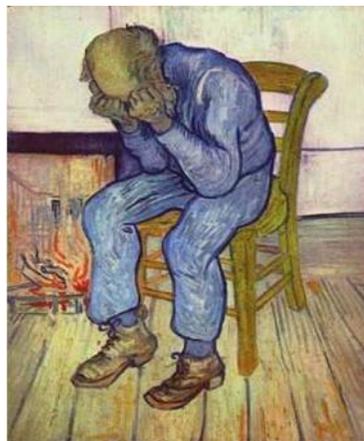


Figura 2.1 En el umbral de la eternidad. La imagen muestra obra de Vincent van Gogh (1890).

Los desórdenes afectivos han sido descritos como enfermedades muy comunes del hombre, por casi 2.500 años, pero sólo recientemente han despertado interés como un problema mayor de salud pública. El conocimiento del cerebro en el proceso salud-enfermedad ha incrementado desde el siglo XIX, pero comparado con los avances que hay en otras áreas de la medicina, el progreso ha sido relativamente pequeño, para entender la fisiopatología de la depresión. A pesar de que la depresión ya era una condición reconocida clínicamente por los antiguos griegos, no fue hasta mediados del

siglo XX, con ayuda de estudios sobre los neurotransmisores involucrados en esta condición, que se reconoció como una fisiopatología y no solo como una condición psicológica (Escobar, 2004).

La controversia de tratarse a la depresión como una enfermedad, no solo se llevó a cabo en el ámbito neurobiológico, sino que además en el aspecto psiquiátrico, mucho de esto debido a la ambigüedad que ha tenido el término depresión. Bajo este enfoque, se han hecho propuestas semánticas para aclarar el problema, y de esta manera entonces se habla de “tristeza”, cuando se está frente a un estado psíquico que no se aleja demasiado de lo normal, de “disforia” en lo sintomático y de “melancolía” en los cuadros clínicos (Agüero *et al.*, 2000). Hasta finales del siglo XIX el término melancolía era habitual para referirse al síndrome depresivo. En 1921 Kraepelin delimitó las fronteras de la enfermedad describiendo su curso episódico y caracterizando sus principales formas clínicas tales como la distimia, ciclotimia, trastorno depresivo mayor, entre otros. (Escobar, 2004).

En los años 30's se acuñó el término “distimia” para referirse a una variedad leve de melancolía, y el de “ciclotimia” para designar un trastorno caracterizado por oscilaciones del estado del ánimo. De tal suerte que una vez que la depresión fue considerada una enfermedad *per se*, la psiquiatría de comienzos del siglo XX realizó el inmenso trabajo de reagrupamiento de las perturbaciones a las que se veía abocada, surgiendo así un manual para el diagnóstico de enfermedades mentales llamado DSM (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, por sus siglas en inglés) en el año de 1952 (Escobar, 2004).

2.3. Diagnóstico, curso y sintomatología del TDM

Los criterios de diagnóstico y los métodos de clasificación de los trastornos depresivos, dentro de los cuales se encuentra el TDM, se encuentran contenidos en el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM, por sus siglas en inglés). El DSM fue creado por la Asociación Americana de Psiquiatría (APA, por sus siglas en inglés), como un manual con, teniendo su primera versión DSM-I en el año de 1952; hasta la fecha existen 5 versiones siendo la más nueva el DSM-V, publicado en el año 2013. El DSM ha sido utilizado ampliamente para el diagnóstico del TDM, sin embargo, existe otro instrumento propuesto por la OMS llamado Clasificación internacional de enfermedades (ICD, por sus siglas en inglés). El ICD incluyó por primera vez un apartado sobre trastornos mentales, en el cual se diagnostica el TDM en su sexta versión, actualmente hay 10 versiones en donde la vigente es el ICD-10 publicado en 1992 (Alarcón, 1991; García y Sánchez, 2001).

Ambas herramientas de diagnóstico (DSM-V y el ICD-10) tienen prácticamente las mismas características de diagnóstico, para un nivel de gravedad "clínicamente importante" de la depresión (TDM); no obstante, sus umbrales son diferentes, con el DSM-V se requiere un mínimo de cinco de los nueve síntomas (que debe incluir el estado de ánimo deprimido y / o anhedonia), mientras que en el ICD-10 se requieren cuatro de los diez síntomas. Esto puede significar que más personas se pueden identificar como deprimidos, con el uso de los criterios ICD-10 en comparación con el DSM-V, es por esta razón que el DSM-V sea el más utilizado para el diagnóstico del TDM (Andrews *et al.*, 2008).

El DSM-V señala que una persona padece TDM si cinco (o más) de los siguientes síntomas han estado presentes durante el mismo período de 2 semanas, los cuales representan un cambio respecto a la actividad previa: al menos uno de los síntomas

debe ser (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o placer. Es importante mencionar que los síntomas no deben ser atribuibles a otra condición médica.

1.- Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi todos días, como lo indica el propio sujeto (por ejemplo, se siente triste, vacío, sin esperanza) o la observación puede ser realizada por otros (por ejemplo, parece lloroso).

2.- Marcada disminución del interés o placer en todas o casi todas las actividades, la mayor parte del día, casi todos los días.

3.- Pérdida significativa de peso sin hacer dieta o aumento de peso (por ejemplo, un cambio de más del 5% del peso corporal en un mes), o pérdida o aumento del apetito casi todos los días.

4. Insomnio o hipersomnia casi todos los días.

5. Agitación o enlentecimiento psicomotores casi todos los días (observable por los demás, no simplemente los sentimientos de inquietud o de estar enlentecido).

6. Fatiga o pérdida de energía casi cada día.

7. Sentimientos de inutilidad o de culpa excesivos o inapropiados (que pueden ser delirantes) casi cada día (no los simples autorreproches o culpa por estar enfermo).

8. Disminución en la capacidad para pensar o concentrarse, o indecisión, casi todos los días.

9. Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor a la muerte), ideación suicida recurrente o planeación específica para suicidarse.

Los síntomas, anteriormente mencionados, provocan malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas sociales, ocupacionales, u otras importantes áreas del funcionamiento. El episodio no debe ser atribuible a los efectos fisiológicos de una

sustancia o de otra condición médica, ni confundirse con las respuestas normales del individuo a una pérdida significativa (por ejemplo, el duelo, la ruina económica, las pérdidas por un desastre natural, una enfermedad grave o discapacidad). El código de diagnóstico de trastorno depresivo mayor (Cuadro 2.1), se basa en: si se trata de un solo episodio o si es recurrente, en la gravedad actual, la presencia de síntomas psicóticos, y el estado de remisión (APA, 2013).

Cuadro 2.1 Códigos de diagnóstico para el TDM (APA, 2013).

Severidad o curso	Un solo episodio	Episodios recurrentes*
Leve	296.21 (F32.0)	296.31 (F33.0)
Moderada	296.22 (F32.1)	296.32 (F33.1)
Severa	296.23 (F32.2)	296.33 (F33.2)
Con episodios psicóticos	296.24 (F32.3)	296.34 (F33.3)
Remisión parcial	296.25 (F32.4)	296.35 (F33.41)
Remisión completa	296.26 (F32.5)	296.36 (F33.42)
Inespecífica	296.20 (F32.9)	296.30 (F33.9)

* Para que un episodio sea considerado recurrente, debe haber un intervalo de al menos 2 meses consecutivos entre episodios separados.

La evaluación del curso de la depresión en los pacientes diagnosticados se realiza mediante escalas que miden el grado de severidad de la depresión como lo son: la escala de Hamilton y la MADRS (Escala de clasificación de la depresión de Montgomery-Åsberg). La escala de Hamilton está diseñada para ser utilizada en pacientes diagnosticados previamente de depresión, con el objetivo de evaluar cuantitativamente la gravedad de los síntomas y valorar los cambios del paciente deprimido. Se valora de acuerdo con la información obtenida en la entrevista clínica, en donde cada pregunta cuenta con entre tres y cinco posibles respuestas, con una puntuación de 0-2 ó de 0-4, respectivamente. La puntuación total va de 0 a 52, siendo

clasificado como una depresión severa el tener de entre 19 a 22 puntos (Zimmerman y Chelminski, 2005).

La escala de MARDS, fue diseñada por Montgomery y Åsberg en 1979, para evaluar el cambio en la intensidad de la sintomatología depresiva, como resultado de la intervención terapéutica. MARDS se basa en una entrevista clínica mediante un cuestionario con 10 *items* que evalúan sobre todo síntomas cognitivos y de alteración del estado de ánimo. Para cada *item* la escala contempla 7 niveles de intensidad / gravedad, con puntuación de 0 a 6. Un *score* de entre 20 a 34 puntos se considera una depresión moderada y >35 puntos una depresión grave. MARDS detecta de manera más eficaz la mejoría o el empeoramiento de la sintomatología depresiva del paciente que otras escalas, hasta ahora consideradas de referencia como la de Hamilton (Vázquez y Jiménez, 2000).

La sintomatología depresiva incluye aspectos conductuales y físicos, los cuales incluyen: llanto, irritabilidad, retraimiento social, una exacerbación de los dolores pre - existentes, dolores secundarios a un aumento en la tensión muscular, una falta de libido, fatiga y la disminución de la actividad; sin embargo, la agitación es común y ansiedad frecuente. Por lo general, hay una reducción en el sueño y apetito disminuido (a veces lleva a la pérdida de peso significativa), pero para algunas personas se reconoce que el sueño y el apetito se incrementan. Una pérdida de interés y placer en la vida cotidiana, y los sentimientos de culpa, falta de valor y sentimientos de culpabilidad son comunes, baja autoestima, pérdida de confianza, sentimientos de impotencia, ideación suicida e intentos de autolesión o suicidio. Además, la sintomatología de la depresión puede variar con la edad, mientras que el joven muestra más síntomas conductuales, los adultos mayores síntomas somáticos (Cassano y Fava, 2002; Serby y Yu, 2003).

El primer episodio del TDM se produce con frecuencia a mediados de los años 20 y aunque puede suceder en cualquier momento, desde la primera infancia hasta la vejez, la mayor parte de la gente tiene su primera depresión en la infancia o en la adolescencia, lo mismo ocurre con el período prodrómico. Algunas personas experimentan una variedad de síntomas en los meses previos a la enfermedad completa, incluyendo la ansiedad, fobias, síntomas depresivos leves y ataques de pánico, mientras que otros pueden desarrollar una enfermedad diagnosticable como TDM con bastante rapidez. A veces los síntomas somáticos dominan el cuadro clínico como para investigar una posible enfermedad subyacente, hasta que los cambios del estado de ánimo se vuelven más evidentes.

Aunque la depresión ha sido considerada como un trastorno con límite de tiempo, con una duración media de 4 a 6 meses, con recuperación completa después, ahora está claro que la recuperación incompleta y las recaídas son comunes. Actualmente, se reconoce la existencia de episodios recurrentes de depresión en un patrón estacional que se ha llamado "trastorno afectivo estacional" y que hasta un 10 % de las personas con depresión experimentan posteriormente episodios hipomaníacos / maníacos. Además, se ha identificado pacientes con depresión resistente al tratamiento, término que fue utilizado para describir la depresión que no ha respondido a dos o más antidepresivos en la dosis recomendada, y es una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo (British Psychological Society; 2010).

2.4. Discapacidad, mortalidad y prevalencia del TDM

La depresión fue reconocida como la cuarta causa de discapacidad a nivel mundial en 1994; no obstante, ha sido pronosticado que será la primera causa de discapacidad para el año 2030. La enfermedad depresiva provoca una disminución en el estado de salud mayor que enfermedades físicas crónicas, tales como la artritis o diabetes; así mismo, los efectos emocionales, motivacionales y cognitivos, reducen sustancialmente la capacidad de una persona para trabajar con eficacia. A parte del impacto en el

funcionamiento social y ocupacional, la mortalidad es sustancial (Moussavi *et al.*, 2007).

El padecer depresión tiene 4 veces más riesgo de suicidio en comparación con la población general; este riesgo se eleva a cerca de 20 veces en los pacientes con un TDM crónico. A veces la depresión puede conducir a actos de violencia contra los demás, e incluso puede incluir homicidio. Las relaciones de pareja y de familia son frecuentemente afectados negativamente, y la depresión de los padres pueden llevar al descuido de los niños y las perturbaciones significativas en ellos (British Psychological Society; 2010). El TDM tiene una prevalencia del 7% en los Estados Unidos con marcadas diferencias por grupos de edad, de tal manera que la prevalencia en las personas de 18 -29 años de edad, es tres veces más alta, que en las personas de 60 años de edad o más. Las mujeres experimentan de 1.5 a 3 veces mayor proporción que los hombres que comienzan en la adolescencia temprana (American Psychological Association, 2013).

2.5. Etiología de la Depresión

La etiología de la depresión se ha asociado a factores genéticos, biológicos (los cuales incluyen bioquímicos, endocrinos y neurofisiológicos) y los psicosociales (Goodwin, 2000; Freud, 1917). La enorme variación en la presentación, el curso y los resultados de las enfermedades depresivas se refleja en la amplitud de las explicaciones teóricas de su etiología. Además, la interacción entre diferentes factores aumenta la susceptibilidad del individuo a padecer depresión, convirtiéndolo en un trastorno complejo. Los factores identificados que influyen en la vulnerabilidad de la depresión son: género, experiencias adversas en la infancia, la personalidad y circunstancias sociales (estrés); por ejemplo, diversas personalidades tienen diferentes expectativas de los eventos estresantes de la vida e individuos con variaciones en determinados genes (polimorfismos), aumentan la probabilidad a sufrir depresión, cuando se enfrentan a acontecimientos adversos de la vida (Caspi *et al.*, 2003).

2.5.1. Factores Genéticos

El trastorno depresivo es común y moderadamente heredable. La recurrencia y el inicio a edad temprana caracterizan los casos con etiología por factores genéticos. La heredabilidad basada en la familia del TDM es de un 40 a un 50% con base en estudios con gemelos y la heredabilidad de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs, por sus siglas en inglés) es del 21 al 30%, así mismo estudios con niños adoptados apoyan la evidencia de los factores genéticos (Lee *et al.*, 2013; Lubke *et al.*, 2012). El riesgo relativo (proporción de riesgo para los familiares de primer grado de pacientes con TDM con respecto a la población general) es de 2 a 3, incluso el riesgo de morbilidad en parientes de primer grado (padres o hijos), está incrementado en todos los estudios que se han llevado a cabo, y es independiente de los efectos del ambiente o educación (Levinson *et al.*, 2006; Guadarrama *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay que olvidar la interacción genético-ambiental, en la cual la respuesta de un individuo a los estímulos ambientales es moderada, por la organización genética del mismo; lo cual ha sido reportado en el estudio epidemiológico de Caspi *et al.* (2003).

El polimorfismo funcional en la región promotora del gen que codifica para el transportador de serotonina (5-HTT) fue reportada por Caspi *et al.* (2003), el cual modulaba la influencia de los eventos estresantes cotidianos en la depresión. Los individuos con una copia o dos del alelo corto del 5-HTT mostraron más síntomas depresivos y tendencias suicidas con relación a eventos estresantes, en comparación con los individuos con un solo alelo, demostrándose así, porque las experiencias estresantes llevan a la depresión a algunas personas, pero a otras no. En este sentido ha surgido gran avance en el análisis genético del TDM, con el fin de determinar variantes de riesgo y aumentar así la comprensión de su etiología por factores genéticos. También los estudios de epidemiología genética, asociación del genoma (GWAS, por sus siglas en inglés) y de meta-análisis, han permitido la identificación de genes candidatos relacionados con el TDM (Levinson, 2006).

En la actualidad han sido probados cerca de 200 genes relacionados con el TDM; sin embargo, por estudio de meta-análisis solo han sido propuesto 26 genes blanco, fuertemente asociados a esta patología. Los genes candidatos son en su mayoría los relacionados con el sistema monoaminérgico, dentro de los que destacan polimorfismos funcionales en el transportador de serotonina (SLC6A4), en el receptor de serotonina 2A (5HTR_{2A}), en los receptores a dopamina D3 (DRD3) y D4 (DRD4), en la enzima triptófano hidroxilasa tipo 1 (TPH1), así como en enzimas encargadas del catabolismo de monoaminas, como la monoaminoxidasa A (MAOA) y catecol-o-metiltransferasa (COMT). Polimorfismos reportados en receptores a corticosteroides (GCR) alteran su señalización, ocasionando mayor susceptibilidad a sufrir episodios depresivos (Levinson, 2006).

Es interesante mencionar que se ha propuesto la teoría de que los efectos neurotóxicos (posiblemente relacionados con la actividad excesiva de corticotropina) dañan o matan a las células del hipocampo, lo que a su vez media muchos de los síntomas depresivos. En este contexto se ha estudiado el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual es una proteína neuroprotectora, identificándose 4 polimorfismos en el gen BDNF, que disminuyen su actividad biológica. Las hipótesis etiológicas más recientes acerca de la depresión incluyen la participación de las neurotrofinas, los factores de crecimiento de fibroblastos (con polimorfismos en sus receptores) y los cambios epigenéticos, específicamente alteraciones en los perfiles de metilación y acetilación de los promotores de los receptores de glucocorticoides y el BDNF (Flint y Kendler, 2014).

Los análisis genéticos evidencian que el TDM es una enfermedad heterogénea determinada en parte por componentes genéticos; ésto se ve claramente en la diferencia entre sexos, en donde las mujeres tienen doble de riesgo de padecer TDM que los hombres. Sin embargo, los intentos de explicar el TDM sobre la base de la herencia, hasta el momento, sólo han arrojado el conocimiento de pocos polimorfismos

asociados y que la recurrencia y la aparición temprana indican una mayor predisposición genética. El panorama arrojado de los estudios genéticos es consistente con un fenotipo bastante indiferenciado, emergiendo como el resultado final común de diversos procesos. En este punto de vista, el TMD es una vía final común, una disminución en la capacidad funcional del sistema de recompensa (Flint y Kendler 2014).

2.5.2. Factores Biológicos

Los factores biológicos incluyen alteraciones bioquímicas, endocrinas y neurofisiológicas. Las alteraciones bioquímicas comprenden principalmente alteraciones en los niveles de neurotransmisores, tales como: serotonina, noradrenalina y dopamina, neurotransmisores aminérgicos que actúan en las neuronas del sistema nervioso central. Es decir, la reducción de los niveles de estas monoaminas forma la base fisiopatológica de la depresión mayor, llamada “hipótesis de las monoaminas en la depresión”. La serotonina ejerce una importante acción en el talante, conducta, movimiento, apreciación del dolor, actividad sexual, apetito, secreciones endócrinas, funciones cardiacas y el ciclo de sueño-vigilia.

La mayoría de la serotonina cerebral se genera en un grupo especializado de neuronas situadas a lo largo de la línea media del tronco cerebral, llamados núcleos del rafe; no obstante, algunos cuerpos de las células neuronales serotoninérgicas se encuentran fuera de los núcleos del rafe, y no todos los cuerpos celulares en los núcleos del rafe son serotoninérgicos. Además, los axones de las neuronas serotoninérgicas inervan en varias áreas del cerebro (Figura 2.2) (Guadarrama *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 1999).

La serotonina es producida a partir del aminoácido triptófano (la principal fuente es la proteína proveniente de la dieta), el cual es transportado a través de la barrera hemato-encefálica hasta las neuronas, por el transportador neutral de

aminoácidos (LNAA). El LNAA también mueve otros aminoácidos: tirosina, valina, leucina e isoleucina. El triptófano debe competir con estos aminoácidos para el transporte en el cerebro. Por lo tanto, la cantidad de triptófano transportado depende tanto de su concentración, como la de otros aminoácidos en el cuerpo. Ya dentro de la neurona, se lleva a cabo el proceso de síntesis de serotonina (Figura 2.3), en donde la enzima triptófano hidroxilasa convierte el triptófano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y por último la enzima 5'-fosfato descarboxilasa convierte 5-HTP en 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Guadarrama *et al.*, 2006).

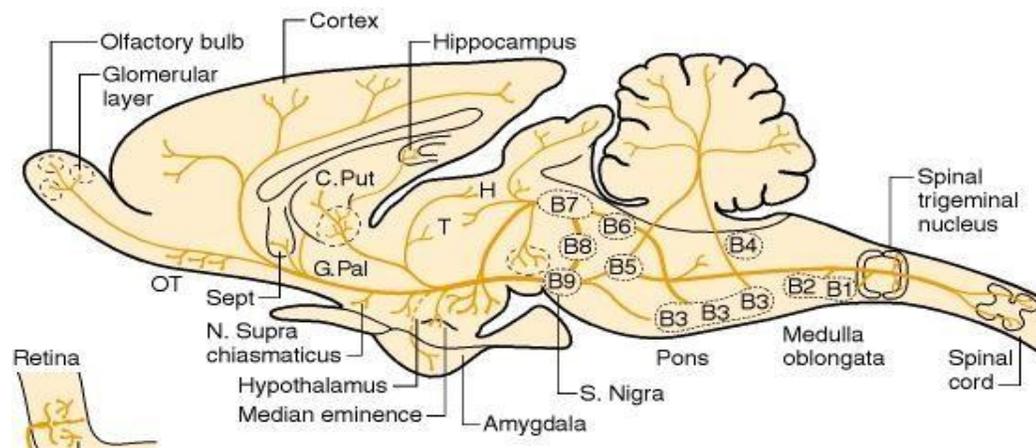


Figura 2.2 Dibujo esquemático que representa la ubicación de los grupos de cuerpos de células serotoninérgicas, en una sección sagital del sistema nervioso central de ratona y sus principales proyecciones. OT, tubérculo olfatorio; Sept, tabique; C. Put, núcleo caudado-putamen; G. Pal, globo pálido; T, tálamo; H, habenula; S. Nigra, sustancia negra (modificado de Siegel *et al.*, 1999).

La serotonina está relacionada con diversas funciones, tales como motoras, cognitivas, control de apetito y en el procesamiento de emociones. Además, la activación de la transmisión serotoninérgica inhibe el procesamiento de información en sistemas aferentes; de tal suerte que los sistemas neuronales serotoninérgicos, funcionan como integradores para una respuesta de comportamiento. La perturbación del sistema 5-HT por distintos tipos de drogas puede provocar alteraciones en las conductas por la participación de 5-HT en tres áreas: en la función neuroendocrina, en los ritmos

circadianos y en la conducta de alimentación. La etiología de la deficiencia de serotonina en el TDM se confirmó con el uso de bloqueadores de la degradación de este neurotransmisor a nivel sináptico, tales como inhibidores de la MAO o los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (SSRIs, por sus siglas en inglés), los cuales generaban un efecto antidepresivo (Siegel *et al.*, 1999).

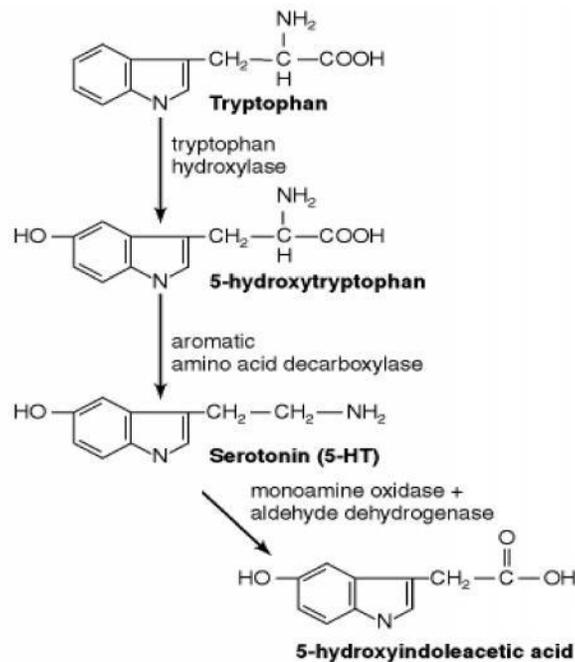


Figura 2.3 Biosíntesis y catabolismo de la serotonina (modificado de Siegel *et al.*, 1999).

Se ha reportado que la restricción de triptófano en la dieta no cambia el estado de ánimo, en personas deprimidas no medicadas; sin embargo, este procedimiento produce una recaída de la depresión en los sujetos recuperados, que han sido tratados con medicamentos antidepresivos. El agotamiento de triptófano en la dieta, también puede inducir síntomas depresivos en pacientes con una historia familiar de depresión, pero no en los sujetos control. Además, se encontró que al administrar inhibidores competitivos del triptófano hidrolasa, empeora la depresión en algunos pacientes

deprimidos, tratados previamente con antidepresivos; no obstante, en algunos pacientes sirvió para controlar los efectos sobre la manía (Heninger *et al.*, 1996).

De las hipótesis más estudiadas en la depresión ha sido la reducción de la serotonina, pese a esto se ha evidenciado que las alteraciones en la serotonina, pudieran no causar la depresión *per se*, sino predisponer al individuo a un comportamiento agresivo, impulsivo, obsesivo-compulsivo y suicida, lo cual conlleva a una susceptibilidad mayor de padecer TDM (Albert y Benkelfat, 2013). Los estudios más recientes sobre serotonina, van en función de su interacción con otras moléculas blanco para la depresión, tal como el BDNF. Ratas *knockout* de 5-HTT demostraron reducción en los niveles de transcripción del gen BDNF, se observó el mismo comportamiento en la expresión de la proteína BDNF, en el hipocampo y en la corteza prefrontal. La disminución de los niveles del BDNF comenzó en la segunda semana postnatal, lo cual fue precedido por una hipermetilación de ADN durante la primera semana postnatal. Es interesante mencionar que los niveles de BDNF reducidos, a su vez, afectaron el fenotipo de las neuronas serotoninérgicas, alterando la señalización intracelular mediada por el receptor 5 - HT1A (Homborg *et al.*, 2014).

La teoría monoaminérgica de la depresión incluye la reducción en los niveles de catecolaminas como la dopamina (DA) y la norepinefrina (NE). La síntesis de estas catecolaminas (llamadas así porque comparten el catecol), deriva de un aminoácido común, llamado tirosina (Figura 2.4). El primer paso en la síntesis de catecolamina es catalizado por la tirosina hidroxilasa en una reacción que requiere oxígeno como co-sustrato, para dar lugar a la dihidroxifenilalanina (DOPA). Debido a que la tirosina hidroxilasa es limitante de la velocidad para la síntesis de los tres transmisores, su presencia es un criterio útil para la identificación de neuronas catecolaminérgicas. A continuación, la dopamina es producida por la acción de la enzima DOPA descarboxilasa sobre DOPA. La síntesis de NE (también llamada noradrenalina) requiere dopamina β -hidroxilasa, la cual cataliza la producción de NE a partir de la

dopamina transportada en vesículas a las terminales adrenérgicas (Purves *et al.*, 2001).

La NE es producida principalmente por las neuronas en el locus *coeruleus* (LC), en el tallo cerebral; éstas envían sus axones principalmente a las estructuras límbicas, que incluyen la amígdala, la formación hipocámpica y la corteza prefrontal. La NE, actuando a través de sus receptores, participa en la modulación de numerosas conductas, incluyendo la respuesta al estrés, la atención, la memoria, el ciclo sueño-vigilia, la toma de decisiones, y la regulación de los estados simpáticos. Un aumento en la actividad NE puede resultar en insomnio, ansiedad, irritabilidad e hiperactividad, mientras que la reducción de actividad NE, puede provocar letargo y pérdida del estado de alerta y concentración. Estudios en ratas demostraron que la actividad de las neuronas del LC aumenta significativamente en la vigilia y en los episodios de estrés, en los cuales su actividad neuronal alcanza niveles de intensidad máxima, y de este modo contribuye al organismo a sobrevivir; sin embargo, un estrés crónico aumenta la demanda de NE y las reservas de NE tienden a agotarse, lo que conduce a mantener un estado depresivo (Guadarrama *et al.*, 2006; Pavcovich *et al.*, 1990).

La relación existente entre la deficiencia de NE y la depresión fue observada por primera vez en la década de los 50's, debido a que se utilizaba reserpina, un alcaloide natural, para el tratamiento de la hipertensión y la esquizofrenia y se notó que estos pacientes tendían a desarrollar estados depresivos. Experimentos en ratas revelaron que el tratamiento con reserpina provocaba el agotamiento de las reservas presinápticas de NE, lo cual causaba conductas depresivas en los animales de experimentación (Siegel *et al.*, 1999). La asociación de estados depresivos con la deficiencia de NE, se reforzó utilizando inhibidores de la recaptura de NE (NRIs, por sus siglas en inglés) como antidepresivos exitosos. Además, se ha reportado que la carencia de NE o su desequilibrio con la serotonina, puede ser la causa de psicosis

depresiva unipolar o bipolar; los medicamentos antidepresivos específicos están dirigidos a mejorar la actividad de la NE en la sinapsis (Blows, 2000).

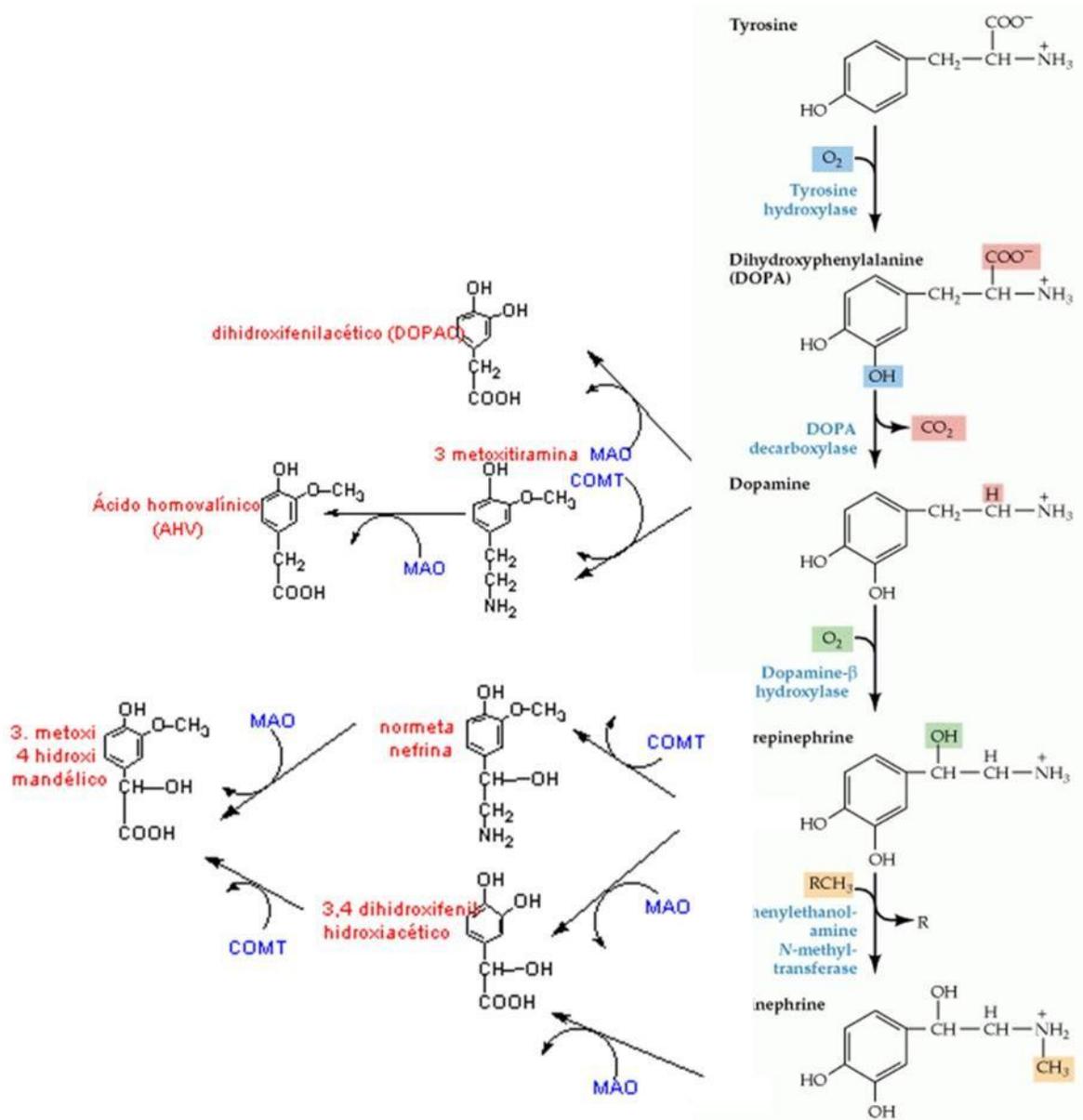


Figura 2.4 Ruta de biosíntesis y degradación de las catecolaminas. El aminoácido tirosina es el precursor de las tres catecolaminas. El primer paso en este camino de reacción es catalizada por la tirosina hidroxilasa, la cual es la limitante de la velocidad (modificado de Purves *et al.*, 2001).

La fuerte relación entre el estrés y el desarrollo de la depresión, puede ser explicada desde el punto de vista de que los sistemas biológicos que median el estrés sean particularmente vulnerables a los daños producidos por la tensión constante, o alternativamente, las deficiencias en los sistemas pueden ser patognomónicos y contribuir a la vulnerabilidad subyacente de un ser humano a desarrollar trastornos relacionados con el estrés, tales como la depresión o comportamientos suicidas. La exposición al estrés activa al LC, lo cual resulta en una mayor demandad de NE por el aumento de la capacidad de síntesis de la tirosina hidrolasa. La excitabilidad del LC, inducida por estrés, y la elevación de la tirosina hidrolasa son mediadas por una actividad incrementada del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), así como a través de la activación de los circuitos neuronales sensibles al estrés que influyen directamente en la actividad de LC. Se ha reportado que el tratamiento crónico con imipramina (antidepresivo comercial) normaliza los niveles de tirosina hidroxilasa en el LC de ratas estresadas de manera crónica, lo cual restablece la actividad normal de las neuronas de LC (Siegel *et al.*, 1999; Melia *et al.*, 1992).

Aunque los mecanismos precisos de la activación del LC inducida por el estrés aún no se han caracterizado completamente, se sabe que los sistemas eferentes del factor liberador de corticotropina (CRF) juegan un papel clave. El CRF aumenta la tasa de disparo del LC e incrementa los niveles de NE en áreas de proyección, durante el estrés (Pavcovich *et al.*, 1990; Valentino *et al.*, 2008). Los animales sometidos a factores estresantes como el shock incontrolable en el pie activan al LC, no obstante, este efecto se bloquea por antagonistas del CRF. El CRF regula la actividad del LC, pero la NE también regula la liberación de CRF. Las neuronas del LC inervan el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, por lo que la actividad LC afecta al PVN indirectamente. Se ha observado que la micro inyección de NE, en el PVN de ratas, provocó la elevación de los niveles de corticosterona (cortisol en humanos) en plasma y el agotamiento de NE inhibe la respuesta a corticosterona al estrés (Cole *et al.*, 2002).

Las interacciones entre NE y CRF crean un bucle que produce las respuestas fisiológicas y de comportamiento adecuado al estrés; ésto sugiere que una mala adaptación de este bucle, podría manifestarse como una respuesta inadecuada o defectuosa al estrés y, en última instancia, dar lugar a un trastorno psiquiátrico, como la depresión. La privación materna en roedores se utiliza para modelar la adversidad durante primeros años de vida, estudios de separación materna de ratas en etapas tempranas de desarrollo evidenciaron una mala adaptación del circuito NE-CRF al crecer las ratas. Las ratas adolescentes, sometidas a privación materna, mostraron un incremento de actividad en el LC, ausencia de respuesta por estímulo de CRF y reducción de ramificación dendrítica en neuronas del LC (Swinny *et al.*, 2010). Por lo tanto, eventos estresores durante el desarrollo temprano pueden interrumpir el circuito CRF-NE, lo cual pudiera proporcionar la base neurobiológica inicial para la susceptibilidad a la enfermedad psiquiátrica inducida por el estrés.

Cabe mencionar que el LC también recibe entrada glutamatérgica sensible al estrés y se ha reportado que cerca del 30% de las terminales del CRF en el LC colocalizan con glutamato. El glutamato es una de las principales entradas excitatorias en el LC que puede ser activado por estrés. Altos niveles de glutamato han sido reportados en pacientes con TDM. Estudios *post mortem* demostraron una alterada entrada de glutamato en el LC de víctimas de suicidio con TDM. Así mismo, la explicación de la acción antidepresiva de la ketamina (antagonista del receptor glutamatérgico NMDA) va en función de su efecto bloqueador de la salida excitatoria glutamatérgica en el LC (Valentino *et al.*, 2001; Autry *et al.*, 2011).

Aunque el LC no contenga interneuronas GABAérgicas, este núcleo noradrenérgico, está bajo el control inhibitorio GABAérgico, por lo cual varias investigaciones fundamentan su posible rol en la patología de la depresión. También ha sido reportado que los niveles plasmáticos de GABA son incrementados en situaciones de estrés y que los tratamientos que incrementan la vulnerabilidad de conductas de ansiedad o

depresivas, tales como estresores en la vida temprana, también influyen en la expresión de la subunidad GABA_A (Anisman *et al.*, 2008).

El papel que desempeña GABA en el contexto de la depresión y ansiedad, es la relación con el funcionamiento de dos moléculas, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y 5-HT, en sitios hipotalámicos y en los circuitos neuronales límbicos. Se ha demostrado que la expresión basal de transcritos de varias subunidades del receptor GABA, están presentes en neuronas CRH (fundamentales en la respuesta del estrés). Así mismo, en estudios *in vivo* se encontró un aumento de la expresión génica de CRH por efecto de un antagonista de la subunidad GABA_A. Además, se conoce la interacción de los receptores 5-HT en el funcionamiento de GABA_A; por ejemplo, la actividad de las neuronas 5-HT en el núcleo dorsal del rafe parece estar regulado por GABA_A y los receptores inhibitorios 5-HT_{1A}. Es por ello que se cree que el papel de GABA en el TDM es debido a su interacción con otros neurotransmisores, como la serotonina y estas acciones son modificables, por factores de estrés que promueven la enfermedad depresiva (Dwivedi, 2012).

La otra catecolamina, implicada en la teoría monoaminérgica de la depresión es la dopamina. El área principal del cerebro que contiene dopamina es el cuerpo estriado, el cual recibe entradas de la sustancia nigra y juega un papel importante en la coordinación de los movimientos del cuerpo. Este neurotransmisor, participa en el mantenimiento del estado de alerta. También se cree que la dopamina participa en la motivación, recompensa y refuerzo; por ejemplo, la cocaína y otras drogas adictivas actúan estimulando la liberación de dopamina en áreas específicas del cerebro. Una vez liberada, la dopamina se une a los receptores de dopamina específicos, así como a algunos receptores α -adrenérgicos (Purves *et al.*, 2001).

Los agonistas de los receptores a dopamina (DR) han demostrado tener efectos antidepresivos en algunos pacientes; así mismo, varios fármacos antidepresivos también se consideran agonistas a los DR. Además, los pacientes con la enfermedad de Parkinson, en la etapa de depleción de DA, a menudo desarrollan una depresión concomitante. Diversos fármacos que aumentan las cantidades disponibles de DA, producen comportamientos que simulan algunos aspectos de la manía; es por ello que los antagonistas de dopamina son los tratamientos farmacológicos más útiles para tratar la manía y hay pruebas de que los inhibidores de la síntesis de DA también pueden ser eficaces (Siegel *et al.*, 1999).

Además de la teoría monoaminérgica para explicar la etiología de la depresión, se ha propuesto un modelo neuroanatómico que comprende la corteza prefrontal, el complejo amígdala-hipocampo, el tálamo, los ganglios basales y las abundantes conexiones entre esas estructuras. Se ha descubierto que los dos principales circuitos neuroanatómicos involucrados en la regulación del estado del ánimo son: el circuito límbico-talámico-cortical, que incluye la amígdala, los núcleos dorsomediales del tálamo, y la corteza prefrontal, tanto la medial como la ventrolateral; así como el circuito límbico-estriado-pálido-talámico-cortical. De acuerdo con este modelo las alteraciones del estado del ánimo, podrían ser el resultado de disfunción o anomalías en diferentes partes de esos circuitos, o conferir cierta vulnerabilidad biológica, que, en combinación con factores ambientales, tenga como consecuencia el padecer TDM (Soares *et al.*, 1997).

Los avances en la tecnología de neuroimagen han permitido nuevos hallazgos sobre la etiología de la depresión desde un punto de vista neuroanatómico. Se han descubierto los sistemas neuronales disfuncionales en pacientes con TDM (Figura 2.5), los cuales incluyen: (i) aquellos que soportan el procesamiento de las emociones, regulación de las emociones y la búsqueda de recompensa (amígdala y estriado ventral); (ii) los involucrados en la regulación automática de las emociones (corteza

media prefrontal y corteza anterior cingulada) y (iii) los involucrados con el control cognitivo y la regulación voluntaria de las emociones (corteza prefrontal ventrolateral y la corteza prefrontal dorsolateral) (Kupfer *et al.*, 2012).

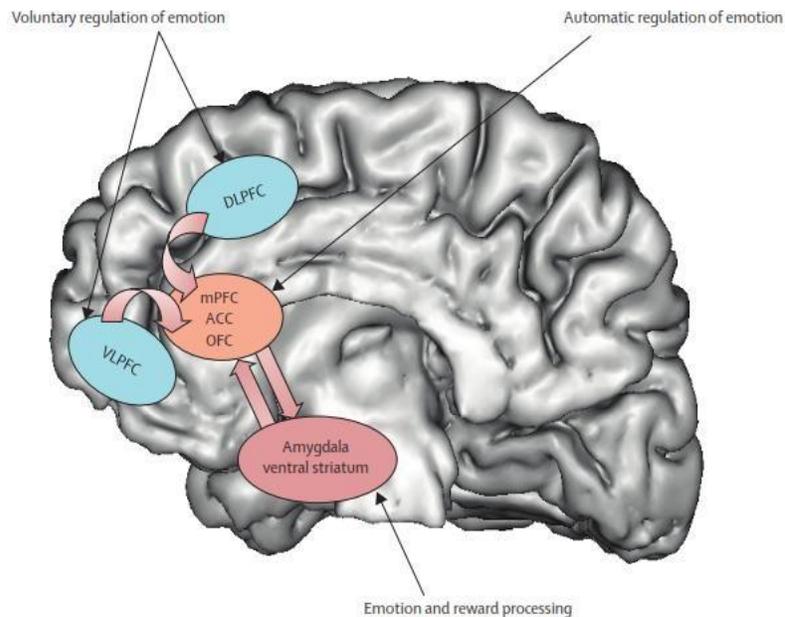


Figura 2.5 Sistemas neuronales de relevancia en el trastorno depresivo mayor. Regiones neuronales clave implicados en el procesamiento de emoción y recompensa. DLPFC= corteza prefrontal dorsolateral. mPFC= Corteza prefrontal medial. ACC= corteza anterior cingulada. OFC= Corteza orbitofrontal. VLPFC= Corteza prefrontal ventrolateral (modificado de Philips *et al.*, 2008).

Estos sistemas pueden ser conceptualizados como una red prefrontal medial-límbico, incluyendo la amígdala, la corteza cingulada anterior (ACC) y la corteza prefrontal medial (mPFC), que es modulada por la neurotransmisión de la serotonina y una red de recompensa centrada en el cuerpo estriado ventral. La red de recompensa está conectada con las cortezas orbitofrontal (OFC) y prefrontal medial (mPFC) y es modulada por la DA (Kupfer *et al.*, 2012). Además, se han identificado anormalidades funcionales en estas redes neuronales en pacientes con TDM, en donde se demuestra un incremento anormal en la actividad de la amígdala, el estriado ventral y la mPFC,

hacia los estímulos negativos; así como una disminución anormal en la actividad del estriado ventral a los estímulos positivos (Epstein *et al.*, 2006)

Estos hallazgos demuestran que los individuos con TDM tienen un sesgo de atención hacia los estímulos emocionales negativos, para dejar de lado los estímulos positivos emocionales y relacionados con la recompensa (Epstein *et al.*, 2006). Adicionalmente, otros estudios han aplicado las imágenes por difusión de tensión, con el fin de examinar la actividad cerebral en reposo, ya que provee información de cómo funciona el cerebro durante la reflexión sobre uno mismo. Los resultados del dicho estudio revelaron un mal funcionamiento en las redes neuronales del vmPFC en los pacientes con depresión, lo cual está involucrado en el procesamiento de referencia de uno mismo (autoestima). También se encontró que los individuos que padecen depresión tienen un incremento del estado de conectividad de las regiones mPFC, vmPFC y ACC; por otro lado, las regiones implicadas en el control cognitivo, mostraron una reducción de su actividad durante el estado de reposo (Fitzgerald *et al.*, 2008). Esto quiere decir que los individuos con TDM cuentan con una mayor actividad neuronal en los sistemas que procesan las emociones, con una disminución de los sistemas neuronales que regulan dichas emociones.

El descubrimiento más novedoso en el campo de los estudios con neuroimagen, ha sido el análisis de predictores neuronales que sean modificados con la respuesta a diferentes tratamientos antidepresivos. Desincronización de la ACC, y su conectividad funcional con la amígdala predice la respuesta antidepresiva rápida a la ketamina; no obstante, la respuesta a la terapia cognitivo-conductual se predice por la disminución de la actividad en la mPFC, y una mayor activación de la amígdala (Kupfer *et al.*, 2012). Es interesante mencionar que todos estos experimentos fundamentan la idea que la depresión pueda ser causada, al menos en parte, por algunas redes neuronales mal ajustadas (estructural o funcionalmente), con lo cual el individuo que la padece tiene una percepción del mundo y la realidad diferentes a las personas sanas.

Algunas las redes neuronales mal ajustadas, pudieran modificarse por la plasticidad neuronal; sin embargo, es más restringida en las etapas adultas y mucho más restringida en pacientes deprimidos comparados con los controles. Se ha reportado que el tratamiento crónico con antidepresivos incrementa la plasticidad neuronal en la corteza visual de roedores y humanos. Los cambios en las redes neuronales pueden ser ocasionados por factores genéticos o por factores psicosociales (Castrén *et al.*, 2013).

2.5.3. Factores Psicosociales

Los factores psicosociales en la depresión involucran experiencias adversas durante la vida temprana, estrés continuo durante la adultez, red social limitada, eventos indeseables en la vida y baja autoestima (Guadarrama *et al.*, 2006). Cabe resaltar que los factores psicosociales influyen como desencadenantes del TDM más no etiopatogénicos *per se* de dicho trastorno. Cada individuo es el resultado tanto del genotipo como del fenotipo, no excluyendo la perspectiva biológica de los factores psicosociales. La predisposición genética heredada al TDM, reaccionará de distinta manera ante diferentes factores psicosociales; por lo cual, la herencia sería necesaria pero no siempre suficiente, puesto que requeriría el complemento de ciertos factores psicosociales. Si bien, en la actualidad se conocen causas de la depresión, tales como el desequilibrio de ciertos sistemas de neurotransmisión, anormalidades anatómicas y funcionales de sistemas neuronales, aún es tema de investigación el conocer como interactuarían estas alteraciones junto a lo psicológico personal y a lo ambiental (Sarason y Sarason, 2006; Chinchilla, 2004).

Las experiencias vitales que aumentan el riesgo del TDM son los que despiertan sentimientos de atrapamiento y humillación (percepción de ataques a la autoestima, socavamiento de la sensación de rango y las experiencias que parecen no dejar posibilidad de escapatoria). La fase de la trayectoria vital en la que se encuentra un individuo puede determinar la exposición a estrés; por ejemplo, los factores

estresantes infantiles son sufrir de abuso, pérdida de alguno de sus padres, rechazo social, etc. En los adultos las principales causas estresantes son las enfermedades, pérdida del cónyuge, padecer alguna discapacidad, falta de contacto social, problemas económicos, etc. En cuanto a los roles sociales, se ha observado que parece no existir diferencias significativas en las tasas de depresión entre sexos, cuando se analizaban grupos de varones que se encargaban de responsabilidades domésticas (Chinchilla, 2008).

En la actualidad se ha propuesto teoría de la transducción de señales sociales de la depresión, la cual sugiere que las experiencias de amenaza social y la adversidad sobre activan componentes del sistema inmune que participan en la inflamación; siendo las citocinas proinflamatorias, mediadores clave de esta respuesta. Las citocinas pueden provocar profundos cambios en el comportamiento, que incluyen el inicio de los síntomas depresivos; esta respuesta biológica a la adversidad es fundamental para la supervivencia por amenazas físicas reales. Sin embargo, esta respuesta también puede ser activada por amenazas sociales o imaginarias, que conduce a un incrementado fenotipo proinflamatorio, lo cual que puede ser clave en impulsar la patogénesis y la recurrencia de la depresión (Slavich y Irwin, 2014)

2.6. Tratamiento Psicológico del TDM

Existen dos psicoterapias principales para tratar la depresión: La terapia interpersonal (PTI) y la terapia cognitiva-conductual (TCC). La PTI es una terapia que se basa en la importancia de las relaciones y el papel protector del apoyo social cuando el estrés de la vida ocurre; esta terapia se utiliza con frecuencia para ayudar a prevenir la recaída después de la recuperación de un episodio depresivo. El tratamiento conductual para la depresión está basado en la capacitación en habilidades sociales, que se centran tanto en la conducta apropiada como en mejorar las habilidades, para comprender las señales que dan otras personas en las interacciones sociales, obtener un reforzamiento social. En la TCC los terapeutas trabajan con el paciente para cambiar

sus patrones de pensamiento disfuncional. La TCC presta especial atención a la identificación de los pensamientos automáticos de los pacientes y eventualmente la modificación de sus primeros esquemas desadaptados (Sarason y Sarason, 2006).

2.7. Tratamiento Farmacológico del TDM

El TDM, es una enfermedad integral que requiere la combinación de tratamiento psicológico y el farmacológico, lo cual se demostró en un ensayo clínico de pacientes con depresión hospitalizados. Las tasas de recuperación de los pacientes que recibieron una combinación de psicoterapia interpersonal y terapia farmacológica, fueron más altos que los de pacientes que recibieron una sola (Schramm *et al.*, 2007). Los antidepresivos que se utilizan para tratar la depresión tienen que ver con restablecer los niveles normales de los neurotransmisores implicados en la patología de la depresión (Figura 2.6). A continuación, se muestra la lista de antidepresivos (Cuadro 2.2), junto con sus mecanismos de acción, que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Kupfer *et al.*, 2012).

A pesar de que hace más de 50 años del accidental descubrimiento del primer fármaco antidepresivo, actualmente el tratamiento del trastorno depresivo mayor todavía se basa en un principio de prueba y error, tanto en la elección del fármaco como en el régimen de ajuste. Además, en los tratamientos con antidepresivos se ha observado la existencia de pacientes que responden selectivamente a una clase específica de fármacos, mientras que otros son propensos a responder de manera diferente; no obstante, algunos otros pacientes parecen no responder en absoluto a ningún tratamiento disponible (Trivedi y Daly, 2008; Fabbri *et al.*, 2013).

Cuadro 2.2 Antidepresivos aprobados por la FDA (Kupfer *et al.*, 2012)

Clasificación	Fármaco	Mecanismo de acción propuesto
Inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (SSRI)	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina	Selectivamente inhibe la recaptura de serotonina
Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina, doxepina, imipramina, trimipramina	Inhibidores no selectivos de la recaptura de monoaminas, incluyendo 5-HT, DA y NE
Inhibidores de la recaptura de NE-DA	Bupropion	Inhibe la recaptura de NE y DA
Moduladores de 5-HT	Nefazodona, trazodona	Antagoniza principalmente a los receptores 5-HT ₂
Inhibidores de la recaptura de NE-5HT	Desvenlafaxina, duloxetina, venlafaxina	Inhibe la recaptura de 5-HT y NE
Moduladores noradrenérgicos y serotoninérgicos	Mirtazapina	Antagoniza a los receptores α -2 y 5-HT _{2C}
Agonista parcial del receptor 5-HT _{1A}	Vilazodona	Inhibidor potente y selectivo de la recaptura de 5-HTy actúa como un agonista parcial en el receptor 5-HT _{1A}
Inhibidores de la MAO	Isocarboxazida, tranilcipromina; Selegilina	Inhibidor no selectivo de las enzimas MAO-A y MAO-B, involucradas en el catabolismo de monoaminas

Los resultados del estudio de las alternativas de tratamiento en secuencia para aliviar la depresión (STAR* D, por sus siglas en inglés) demostraron que solo un tercio de los pacientes con TDM alcanzan la remisión después del tratamiento con antidepresivos tradicionales (Trivedi *et al.*, 2006). Además, en los tratamientos antidepresivos se ha observado la existencia de pacientes que responden selectivamente a una clase específica de fármacos, mientras que otros son propensos a responder de manera diferente; no obstante, algunos otros pacientes parecen no responder en absoluto a ningún tratamiento disponible (Trivedi y Daly, 2008). En este contexto hoy en día ha surgido interés por proponer nuevos blancos que puedan generar tratamientos novedosos para el desorden de depresión mayor que sean más efectivos y rápidos,

de mayor tolerancia y disponibilidad, así como una disminución de los efectos secundarios (Machado-Vieria *et al.*, 2010).

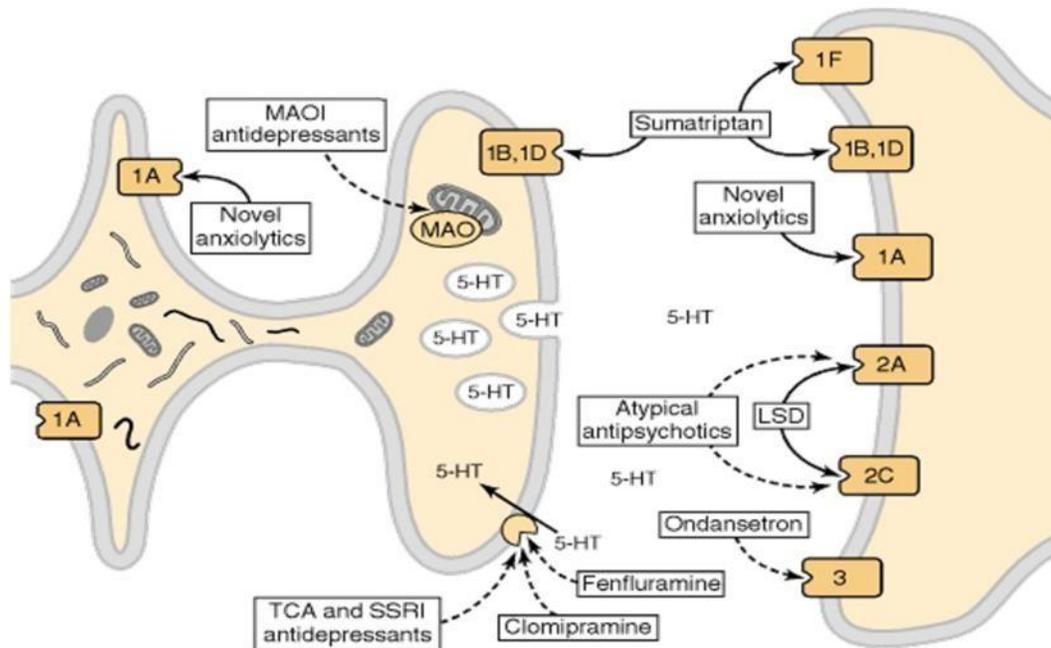


Figura 2.6. Mecanismos de acción de antidepresivos comerciales (modificado de Siegel *et al.*, 1999).

2.8. Nuevos enfoques en el tratamiento del TDM

Los fármacos existentes para el tratamiento del TDM son muchas veces no efectivos para varios pacientes. El tratamiento de los trastornos del estado de ánimo se ha centrado generalmente en el alivio de los síntomas y la prevención de la recurrencia de los episodios, pero otros aspectos clínicos como la función cognitiva, los síntomas residuales, y la ideación suicida también son relevantes a la idea de un tratamiento eficaz. En este sentido, recientemente, nuevas moléculas empiezan a ser probadas en modelos animales preclínicos de depresión. Los nuevos *targets* propuestos como potenciales terapéuticos para el tratamiento de la depresión son: 1) Glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) y la proteína quinasa C (PKC); 2) el estrés oxidativo y la bioenergética; 3) la histona deacetilasa (HDAC); 4) el sistema melatonérgico; 5) el sistema de neuropéptidos de taquiquinina; 6) el sistema glutamatérgico; y 7) el sistema purinérgico (Machado-Vieria *et al.*, 2010; Machado-Vieria *et al.*, 2011).

2.9. Señalización purinérgica en el cerebro

El sistema purinérgico consiste en una serie de transportadores, enzimas y receptores responsables para la síntesis, liberación, la acción e inactivación extracelular de adenosina 5'-trifosfato (ATP) y su degradación extracelular a adenosina para llevar a cabo la señalización. A pesar de que el ATP era universalmente bien conocido como la moneda energética del metabolismo celular, se observó que también era una importante molécula de señalización celular, llamándose señalización purinérgica, por pertenecer a la familia de las purinas. El concepto de señalización purinérgica nació en 1972, cuando se demostró que la adenosina 5'-trifosfato (ATP) funcionaba como transmisor en nervios inhibidores no-adrenérgicos, no colinérgicos (NANC) (Sperlagh *et al.*, 2013).

Posteriormente el ATP fue identificado como un co-transmisor en los nervios simpáticos y parasimpáticos, además de reconocérsele como un co-transmisor en la mayoría de los nervios, tanto en el sistema nervioso periférico como en el central. Recientemente se le reconoce como un co-transmisor con glutamato, NE, GABA, acetilcolina y DA en el SNC. Tanto el ATP, junto con algunos de sus productos de degradación enzimática (ADP y adenosina, ADO) actúan a través de los canales de iónicos P2X y receptores acoplados a la proteína G (P2Y y P1); los cuales fueron llamados purinérgicos (Figura 2.7) por responder a purinas y llevar a cabo la transducción de la neurotransmisión purinérgica (Burnstock *et al.*, 2011).

Los receptores purinérgicos se definieron por primera vez en 1976 (Burnstock y Knight, 2004) y 2 años más tarde se distinguieron dos tipos de purinoceptor, identificados como: P1 (los cuales responden a ADO y son metabotrópicos) y P2, para ATP / ADP. En 1985 los receptores P2 fueron subdivididos en los subtipos P2X (ionotrópicos) y P2Y (metabotrópicos) basados en diferencias farmacológicas. Los receptores purinérgicos fueron clonados a principios de los años 90's generando 4 subtipos de

receptores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), 8 subtipos de receptores P2Y y 7 subtipos de receptores P2X (Burnstock, 2007). Desde 1992, ha habido una explosión de interés en la neurotransmisión y neuromodulación purinérgica en diferentes regiones del cerebro y la médula espinal; ésto debido a que los diferentes subtipos de receptores purinérgicos están distribuidos a lo largo del SNC (North y Verkhratsky, 2006).

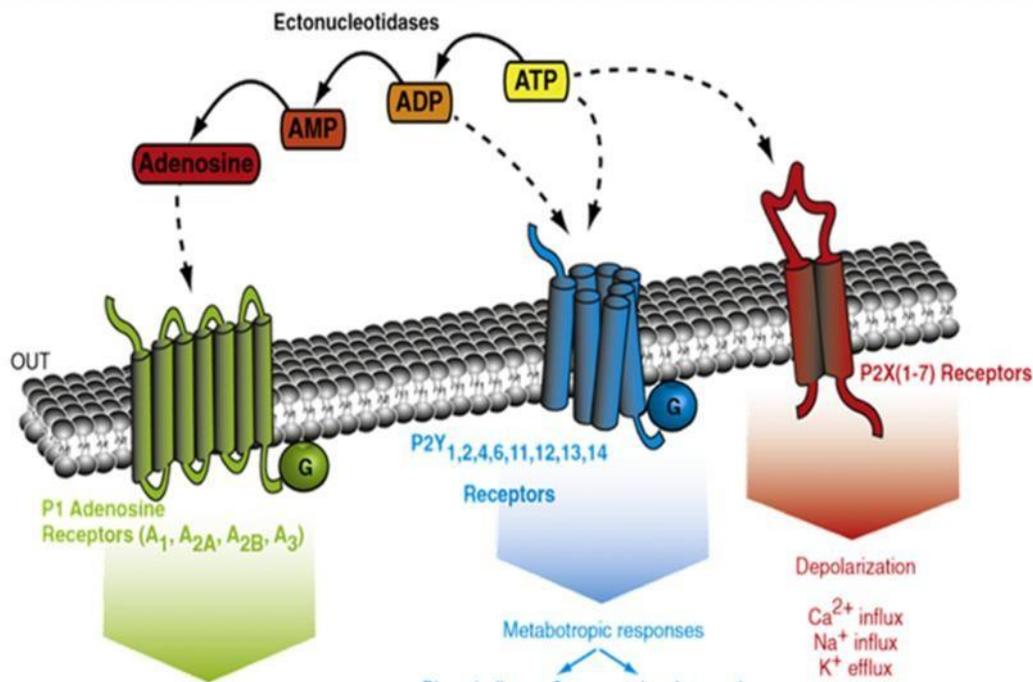


Figura 2.7. Clasificación de receptores purinérgicos. Familia de receptores purinérgicos P1 y P2 dependientes del ligando al que responden (modificado Baroja-Mazo *et al.*, 2013).

Los receptores purinérgicos controlan el comportamiento de redes neuronales locales, mediante la regulación del equilibrio entre la liberación y los efectos del ATP, la ADO y las ectonucleotidasas, en la transmisión sináptica. Además, también se han identificado receptores purinérgicos en las células gliales, incluyendo astrocitos, oligodendrocitos y microglia. También se han reportado los mecanismos que involucran la interacción entre neurona y glía (Figura 2.8). Las funciones fisiológicas

de los receptores purinérgicos se llevan a cabo por la unión de sus ligandos (ATP/ADP o ADO), que son liberados al espacio extracelular por diferentes mecanismos (Burnstock y Knigh, 2004; Burnstock *et al.*, 2011).

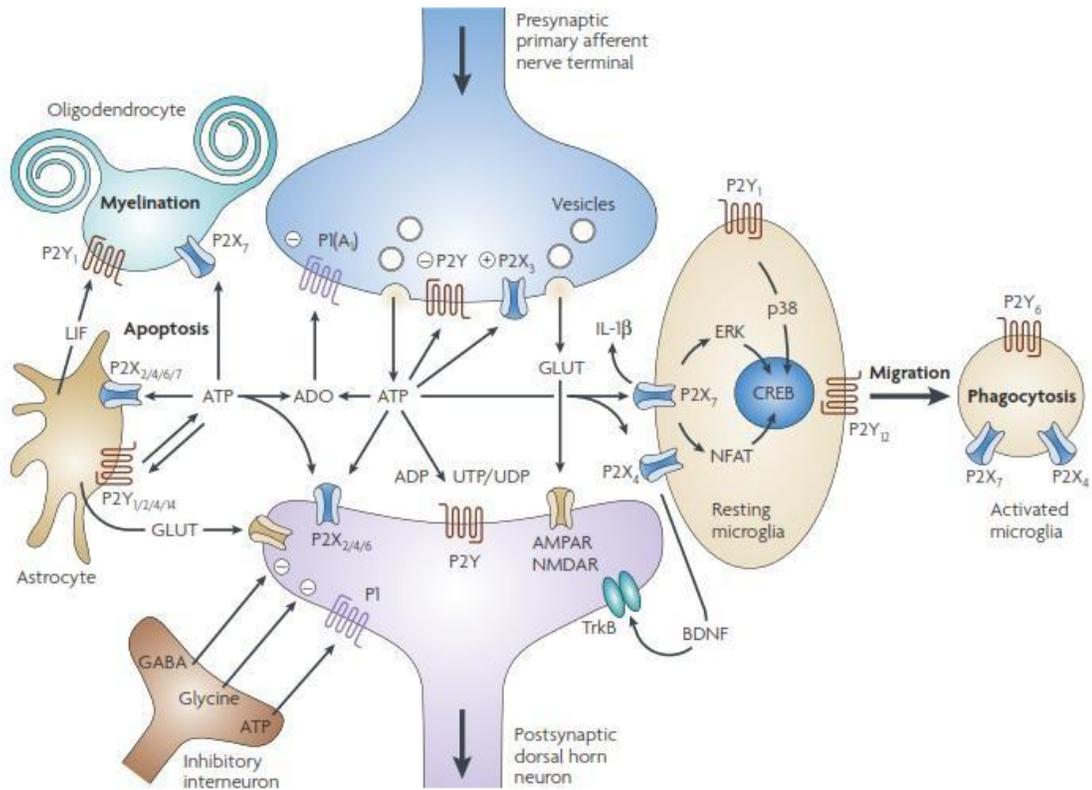


Figura 2.8. Neurotransmisión purinérgica (modificado Burnstock *et al.*, 2008).

La liberación de ATP al espacio extracelular, puede llevarse a cabo mediante una exocitosis neuronal a través de vesículas; sin embargo, también se ha encontrado la liberación de ATP desde los astrocitos. Después de la liberación del ATP, ocurre su degradación enzimática por ectonucleotidasas (trifosfato defosfohidrolasas, E-NTPDasas; la pirofosfatasa/ fosfodiesterasas, E-NPP, las fosfatasa alcalinas y la 5'ectonucleotidasa), generando metabolitos que funcionan como ligandos, fisiológicamente activos, para varios receptores purinérgicos, como la ADO (la cual

puede encontrarse en el espacio extracelular no solo por degradación del ATP, sino también por transportadores membranales) (Pankratov *et al.*, 2007; Zimmermann y Chelminski, 2005).

Las acciones de la ADO han sido reconocidas desde los años 80's y hasta hace poco se resaltaron sus implicaciones en diversas patologías del SNC. Por ejemplo, un interesante descubrimiento fue el conocer que las ectonucleotidasas tienen actividades diferentes dependiendo de la zona del cerebro. Un estudio reveló que las enzimas NTPDasa1 y NTPDasa2, tuvieron una mayor actividad en las membranas sinápticas de la corteza e hipocampo, en comparación con las encontradas en el cerebelo y la médula oblongada. Así mismo, ha sido reportada la presencia de las enzimas degradadoras de la ADO, la 5'ectonucleotidasa y la adenosina desaminasa, en la mayoría de las regiones del cerebro (Kukulski *et al.*, 2004).

A continuación, se observó que el receptor A₁ es el más predominante en el cerebro, el cual funciona como un modulador de la liberación de transmisores excitatorios presinápticos. Además, se atribuyeron actividades neuroprotectoras a los antagonistas de los receptores A_{2A} y A_{2B} y fue identificada la expresión de los receptores A₃ en algunas regiones del cerebro. Otro descubrimiento interesante fue que la ADO estimulaba la liberación de glutamato de los astrocitos, por medio de los receptores A_{2A} (Nishizaki, 2004).

En cuanto al rol desempeñado por el ATP en el SNC se ha encontrado que éste puede estimular el crecimiento de neuritas de células de neuroblastoma, de forma independiente al factor de crecimiento nervioso (NGF). Incluso existe evidencia de la co-liberación de ATP con catecolaminas en las neuronas de LC e hipotálamo, así como con GABA en neuronas hipotalámicas y con glutamato en las neuronas CA1 del hipocampo. Es interesante mencionar que, en las terminales neuronales centrales, el

ATP es principalmente almacenado y liberado por un grupo distinto de vesículas y que su co-liberación con el GABA o glutamato no es sincronizada (Pankratov *et al.*, 2007).

Con estos hallazgos, la señalización purinérgica ha cobrado interés en la integración de la actividad funcional entre neuronas y células gliales en el SNC. Además, ahora se conoce que las purinas tienen un papel clave en la neurotransmisión y neuromodulación, con sus efectos mediados por los receptores purinérgicos, P1, P2X y P2Y, los cuales se ha demostrado que están involucrados en diversas condiciones patológicas, incluyendo trauma cerebral y la isquemia, enfermedades neurodegenerativas (que implican reacciones neuroinflamatorias) y en enfermedades neuropsiquiátricas, como la depresión (Burnstock, 2008; Burnstock *et al.*, 2011).

2.10. Receptores purinérgicos y depresión

Los receptores purinérgicos involucrados principalmente en los trastornos de ánimo, tales como TDM y desorden bipolar han sido el receptor ionotrópico P2X7 y los receptores metabotrópicos A₁ y A_{2A}. Erhardt *et al.* (2007) sugieren que el cromosoma 12q24.31, en humanos, contiene el gen que codifica para receptores P2X7 y P2X4 y que ésta es una región genética importante para la ansiedad. Además se ha reportado que las personas con predisposición padecer trastornos del estado de ánimo como el TDM, se asocian con los alelos de riesgo del gen del receptor P2X7 y se encontró una correlación con la evolución clínica del trastorno (Soronen *et al.*, 2011).

Por otro lado, en un estudio clínico se reportó una reducción de expresión de ARNm del receptor P2X7, en la sangre periférica en un conjunto de pacientes que sufrían depresión, lo que plantea la posibilidad de utilizar la expresión P2RX7, como un biomarcador de los trastornos del estado de ánimo (Zhang *et al.*, 2011). También se ha reportado, mediante pruebas de nado forzado y de suspensión de cola, que los

ratones *knockout* P2rX₇ (P2rX₇^{-/-}) tienen un fenotipo antidepresivo y aumento en la ingesta de alimentos, sin cambios en la actividad locomotora basal (Boucher *et al.*, 2011). Otros candidatos para nuevos tratamientos del TDM son los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, por encontrarse ampliamente expresados en el sistema límbico y tener acciones moduladoras pre y post-sináptica de la transmisión glutamatérgica y monoaminérgica (Burnstock *et al.*, 2011). Existe evidencia de que los agonistas de ADO y medicamentos que aumentan su biodisponibilidad, tales como inhibidores de la adenosina desaminasa, imitan el comportamiento depresivo en ratas. Además, se ha reportado que los antagonistas de adenosina, tales como la cafeína (antagonista no selectivo) y el SCH412348 (antagonista selectivo del receptor A_{2A}), mostraron efecto antidepresivo en pruebas predictivas de la acción antidepresiva (prueba de nadofrozado, FST, y la prueba de suspensión de cola, TST) (Sperlagh *et al.*, 2012).

2.11. Receptores A_{2A} y depresión

Los receptores A_{2A} responden a adenosina. La adenosina es un neuromodulador endógeno que influye en varias de las funciones del SNC. Los niveles de adenosina aumentan, cuando hay un desbalance entre la tasa de la energía utilizada con respecto a la energía entregada. Por lo tanto, cuando se incrementa la actividad neuronal, particularmente en la hipoxia o en la isquemia, hay una marcada elevación de los niveles de adenosina extracelulares. Debido a que la adenosina tiende a hacer un restablecimiento los balances energéticos, ha sido llamado “metabolito represalia”. La adenosina también desempeña un rol de neuroprotector endógeno. Otro impulso importante para desarrollar estudios sobre el papel de la adenosina en la función cerebral, ha sido la constatación de que muchos de los efectos de los compuestos psicoactivos más utilizados, se ejerce mediante el bloqueo de los efectos de la adenosina (Fredholm *et al.*, 2005).

Cabe resaltar que la adenosina no actúa como un neurotransmisor clásico, ya que no se almacena en las vesículas, no se libera por exocitosis, ni transfiere información de forma unidireccional, desde la terminación presináptica a la postsináptica y no actúa sólo en las sinapsis. En cambio, la adenosina desempeña una función doble, que actúa tanto como un mensajero homeostático transcelular y como neuromodulador, controlando la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal. La adenosina puede ser liberada al espacio extracelular tanto por neuronas como por glía, mediante tres mecanismos: 1) la liberación de adenosina a través de transportadores de nucleótidos, después de un incremento en los niveles intracelulares de adenosina o una inversión del gradiente de sodio; 2) la formación de adenosina extracelular por la vía de las ectonucleotidasas (Figura 2.9) y 3) la formación extracelular de adenosina a partir de la liberación de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Dunwiddie y Masino, 2001).

El papel de la adenosina a nivel extracelular ha sido también asociado con la fisiopatología de los desórdenes del humor. Se ha reportado que la activación de los receptores a ADO en el SNC conduce a un estado llamado “de indefensión aprendida” similar al provocado por modelos animales, para evaluar la depresión. En este sentido se ha investigado el efecto de los antagonistas selectivos del receptor A_{2A} , para evaluar su posible efecto antidepresivo. Actualmente el efecto antidepresivo de los antagonistas a A_{2A} solo ha sido reportado en pruebas agudas como FST y TST (El Yacubi *et al.*, 2003).

El interés en apuntar los receptores de adenosina A_{2A} en el ámbito de las enfermedades psiquiátricas surgió por primera vez en función de su interacción física y funcional estrecha con los receptores D_2 de la dopamina; sin embargo, el papel de los receptores A_{2A} , actualmente se considera más amplio que sólo el control de la función del receptor D_2 . Existe un gran interés en la capacidad de los receptores A_{2A} para controlar la plasticidad sináptica en las sinapsis glutamatérgicas, debido a una

capacidad combinada de los receptores A_{2A} para facilitar la liberación de glutamato y la activación del receptor NMDA. Por lo tanto, los receptores A_{2A} están para restablecer la adecuada respuesta de circuitos neuronales dañados, un papel similar al que cumple con la DA.

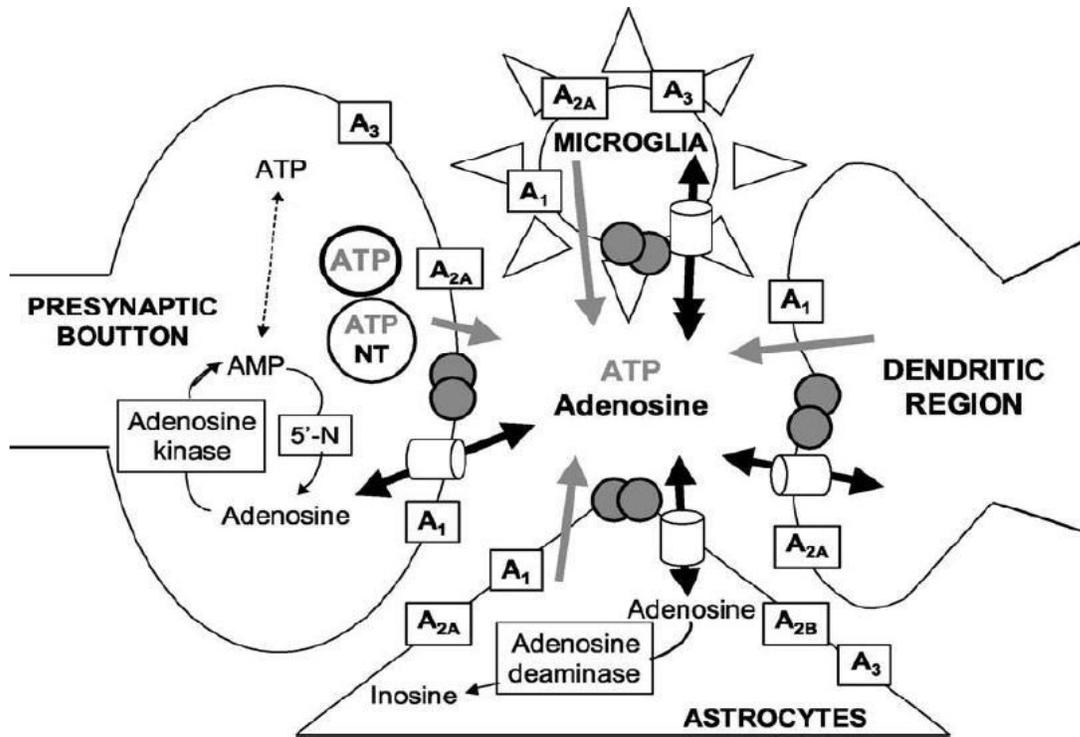


Figura 2.9. Representación esquemática de la formación y acciones de la adenosina en los diferentes tipos de células del cerebro. Se muestra la liberación de ATP (líneas grises) y adenosina (líneas negras). Se observan las ectonucleotidasas (círculos rellenos) para convertir el ATP en adenosina y los transportadores de adenosina (cilindros), para el transporte de adenosina bidireccionalmente a través de la membrana plasmática (Fredholm *et al.*, 2005).

Es por ello que los receptores A_{2A} son un objetivo particularmente atractivo para tratar los trastornos psiquiátricos, ya que la adenosina puede actuar como intermediario entre el glutamato y la dopamina, dos de los jugadores clave en el procesamiento de estado de ánimo. Por otra parte, los receptores A_{2A} también controlan la función de la glía y la adaptación metabólica cerebral, otros dos mecanismos emergentes para entender el procesamiento anormal de estado de ánimo. No obstante, fuera de las pruebas predictivas de la acción antidepresiva, han surgido pocos estudios en la actividad de los antagonistas del receptor A_{2A} en modelos animales crónicos de depresión (Cunha *et al.*, 2008). Un estudio reveló que la expresión de los receptores A_1 y A_{2A} cambiaban su distribución y niveles de expresión dependiendo del modelo de depresión utilizado (Crema *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

La depresión mayor representa un problema de salud, la prevalencia es de 7.8% en México. Ésta puede evolucionar desfavorablemente, trayendo consecuencias graves como el suicidio y la disfunción sociofamiliar. En la depresión mayor se consideran tres tipos de factores etiopatogénicos: genéticos, biológicos y sociales. Por lo tanto, el tratamiento de la depresión mayor deberá basarse en la comprensión de su etiología, integrando la farmacoterapia y las intervenciones psicoterapéuticas, en beneficio del paciente. Se ha reportado solo un tercio de los pacientes con TDM alcanzan la remisión después del tratamiento con antidepresivos tradicionales. Por otro lado, la mayoría de los antidepresivos actuales han tenido un éxito limitado, ya que se han desarrollado para mejorar los síntomas agudos basados en modelos de animales agudos, que resultan en la ruptura de la medicación y, por lo tanto, la recurrencia de los síntomas depresivos.

En consecuencia, surge la necesidad de investigar nuevos blancos terapéuticos que mejoren los trastornos del estado de ánimo y éstos deben estudiarse en modelos animales apropiados que modelen la etiología de los pacientes con depresión. En este contexto, los receptores purinérgicos a adenosina A2A (A2AR) han sido propuestos como blancos farmacológicos de interés para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas debido a su amplia distribución en el sistema límbico. Además, se ha reportado la capacidad de los A2AR para controlar la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores, la función glial, la adaptación metabólica cerebral y formación de heterodímeros. Sin embargo, sigue siendo debatido qué ligandos de los A2AR ejercen efecto antidepresivo. Estudios previos informaron que tanto el agonista como el antagonista, pueden ejercer un comportamiento antidepresivo en modelos animales agudos. Por lo cual, es necesario el estudio de estos estos ligandos en modelos de depresión crónica como el de bulbectomía olfatoria bilateral, el cual nos permite el estudio del efecto de la administración crónica del agonista y antagonista en la conducta, así como en la expresión y distribución de los A2AR.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con el antagonista ZM 241385 tendrá un efecto antidepresivo e inducirá cambios en la expresión y distribución de los receptores purinérgicos A_{2A} en el modelo de depresión de bulbectomía olfatoria bilateral.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

Estudiar el efecto antidepresivo del tratamiento con el antagonista ZM 241385 y los cambios en la expresión y distribución del receptor purinérgico A_{2A} en el sistema límbico en un modelo de depresión crónica, inducido por cirugía de bulbectomía olfatoria bilateral.

5.2. ESPECÍFICOS

1.- Implementar y validar el modelo de cirugía bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) en ratas *Sprague Dawley*, para desarrollar el fenotipo de depresión crónica.

2.- Evaluar el efecto antidepresivo del tratamiento crónico tanto del antagonista ZM241385 (ZM), como del agonista Adenosina del receptor A_{2A} , en el modelo OBX mediante las pruebas de nado forzado, de campo abierto e ingesta de sacarosa.

3.- Comparar las interacciones proteína-ligando de ZM y Adenosina con el receptor A_{2A} , en estudios de acoplamiento molecular *in silico*.

4.- Determinar el efecto del tratamiento crónico con el ligando al receptor A_{2A} que logró revertir los cambios conductuales inducidos por la cirugía OBX, en la densidad neuronal del giro dentado.

5.- Conocer la distribución del receptor purinérgico A_{2A} en el sistema límbico de las ratas OBX y posterior al tratamiento con el ligando al receptor A_{2A} por medio de técnicas de inmunofluorescencia.

6.- Comparar la expresión de los genes que codifican para el receptor A_{2A} , en las diferentes estructuras del sistema límbico en las ratas OBX, así como en las ratas OBX con tratamiento, empleando RT-PCR en tiempo real

6. METODOLOGÍA

6.1. Manejo de animales

Para este estudio se utilizaron ratas macho *Sprague-Dawley* de entre 7 y 8 semanas de edad (aproximadamente 200-300 g). Las cuales fueron alojadas en grupos de 3 ratas por jaula (45 x 25 x 20 cm), en una habitación con temperatura controlada (21 ± 1 °C), con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h y con una humedad relativa de 60%. Las cajas de los animales contaban con el suficiente aserrín, para garantizar la absorción de su orina y excremento, favorecer su aislamiento térmico y construcción de nido. El aserrín fue cambiado 3 veces por semana según la norma NOM-029-ZOO-1995.

Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar de laboratorio (la composición bromatológica requerida para roedores de laboratorio según la norma NOM-062ZOO-1999) y agua potable *ad libitum*, excepto durante los períodos en los que se aplicó restricción de alimento y privación de agua para las pruebas conductuales. Los animales fueron revisados dos veces por día con el fin de corroborar que no hiciera falta más alimento o agua. Las pruebas conductuales de referencia (pruebas basales, tiempo cero a la generación del modelo de depresión crónico) se aplicaron después del período de adaptación de las ratas (4 días de la llegada de las ratas a la unidad), todos los ensayos se llevaron a cabo durante la fase de luz.

Una vez transcurrido el tiempo de adaptación y las pruebas conductuales basales, las ratas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos para generar el modelo de depresión crónica a) las ratas control de cirugía simulada (Sham) y b) las ratas con la cirugía de bulbectomía (OBX). La cirugía fue llevada a cabo en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) en colaboración con el Dr. Andrés Quintanar Stephano.

6.1.1 Sacrificio de animales

El sacrificio de los animales se llevó a cabo con una administración previa de anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/Kg); para ello los animales tuvieron un período de ayuno suficiente para vaciar estómago, con el fin de prevenir la regurgitación o aspiración del contenido gástrico (NOM-062ZOO-1999). Antes del sacrificio, los animales se anestesiaron y se fijaron en una tabla de sacrificio. Se abrió una incisión en la línea media anterior del tórax y la pared abdominal. A continuación, a través del corazón se perfundieron los animales con 60 ml de solución salina al 0.9% y luego se perfundieron con 60 ml de paraformaldehído al 4% pre-enfriado. Después de la perfusión, los animales fueron decapitados y sus cerebros removidos. Se utilizaron cinco ratas de cada grupo para estudios inmunohistoquímicos y los otros 5 animales se usaron para estudios de RT-qPCR. De cada cerebro fueron disectados: la corteza cerebral prefrontal (PFC), el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo y conservados adecuadamente para su posterior análisis. La separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos se realizó conforme a la norma NOM-087-ECOL-1995. En breve, los cadáveres se guardaron en bolsas de desechos orgánicos, congelados a -20°C y entregados a PIREBSA, SA de CV (Planta Incineradora de Residuos Bioinfecciosos).

6.2. Modelo de depresión: Cirugía Bulbectomía Olfatoria Bilateral (OBX)

La cirugía OBX (modificado de Bhatt *et al.*, 2013), se realizó anestesiando las ratas con isoflurano [Abbot Laboratories, Berkshire, Reino Unido (3% de inducción, 1,5% de mantenimiento en 0,5 l / min de O₂)]. La cabeza fue rapada con el fin de realizar una incisión sagital de 1 cm en la línea media del cuero cabelludo, posteriormente se realizó otra incisión bilateral de 12 mm. A continuación, se perforaron dos orificios de trepanación de 2 mm de diámetro a 8 mm anterior al bregma y 2 mm en cada lado de la línea media, en un punto correspondiente al margen posterior de la órbita del ojo. Después, la duramadre fue puncionada para poder eliminar los bulbos olfatorios, por

una aspiración suave con una aguja hipodérmica despuntada atada a una bomba de vacío de agua, con cuidado de no dañar la corteza frontal. Se utilizó una esponja hemostática para prevenir el sangrado excesivo y llenar el espacio muerto.

Al completar la succión, el cuero cabelludo fue limpiado con una solución antiséptica y se suturó la herida. La cirugía simulada (*sham*) fue llevada a cabo de la misma manera, incluyendo la punción de la dura madre con excepción de que los bulbos olfatorios se dejaron intactos. Al final la cirugía, se administró 6,000 U de procaína penicilina G más bencilpenicilina cristalina (PiSA, México) a cada rata (inyección intramuscular [i.m.] cada 24 h durante tres días) para prevenir infección. Además, durante el tiempo de rehabilitación de 14 días, se permitió un período de 14 días después de la cirugía, para la recuperación del procedimiento quirúrgico. Los animales fueron monitoreados diariamente durante este período, y durante la primera semana, se administró paracetamol (Bayer, Alemania; 24 mg / ml) para controlar el dolor. Después de la cirugía los animales fueron alojados individualmente en cajas con el fin de evitar agresión. Al final del experimento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg / kg i.p) y se decapitaron. Los cerebros se disectaron para confirmar la eliminación exitosa del bulbo olfatorio, los cerebros con eliminación incompleta de los bulbos olfatorios fueron eliminados del análisis.

6.3. Pruebas conductuales

6.3.1 Prueba de Nado Forzado (PNF)

Los animales fueron colocados en cilindros de plexiglás individuales (40 cm de altura, y 18 cm de diámetro), con $\frac{3}{4}$ del volumen total de agua a 25°C. Se realizaron dos sesiones diferentes: una sesión de entrenamiento, la cual consistió en 15 minutos de adaptación y las sesiones de prueba, en las cuales se colocó cada animal individualmente durante 6 minutos dentro del cilindro (2 minutos de adaptación y de 4 minutos de prueba), de acuerdo con lo reportado por Abelaira *et al.* (2013). En la

prueba de nado forzado fueron evaluadas dos conductas: inmovilidad y lucha. El tiempo de inmovilización fue determinado cuando no se observaba ninguna actividad adicional a los movimientos necesarios para mantener la cabeza de la rata sobre el agua. Por otro lado, el tiempo de lucha corresponde al tiempo que la rata bracea durante la prueba. El braceo fue considerado cuando las patas delanteras de la rata salen y cortan la superficie del agua.

6.3.2 Pruebas de campo abierto (PCA)

La prueba de comportamiento en campo abierto se llevó a cabo de la siguiente manera: la primera se realizó un día antes de la cirugía OBX, la segunda se efectuó 2 semanas después de la cirugía OBX y, la última, una vez que finalizó el tratamiento farmacológico. La arena de campo abierto consiste en una caja de madera con las siguientes dimensiones: 35 cm de altura y una base cuadrada de 120 x 120 cm. La base contiene líneas que dividen la superficie en 16 cuadrantes iguales y la iluminación fue proporcionada en la parte superior por medio de tres luces fluorescentes. El día de la prueba cada animal fue retirado de la jaula de alojamiento, durante la fase de luz entre 1000h y 1200h y se colocó individualmente al centro de una arena de campo abierto.

Una vez dentro de la arena los animales fueron examinados en un ambiente tranquilo por un período de 10 min, en el cual se evaluó la actividad locomotora (distancia total recorrida en el aparato) y el tiempo empleado (segundos) sin moverse de un cuadrante, correspondiente a 60 cm², el cual fue determinado como tiempo de aislamiento. La actividad de las ratas fue registrada con el programa Etholog 2.5. La arena de campo abierto se limpió con alcohol al 70% entre cada prueba con el fin de eliminar el posible sesgo debido al olor que se podría dejar por la rata anterior (Al-Rahbi *et al.*, 2013). Por lo tanto, el aumento del tiempo en un solo cuadrante (latencia de aislamiento) fue utilizado como índice de ansiedad (Mutlu *et al.*, 2012).

6.3.3 Prueba de preferencia de sacarosa

Una vez transcurridos 4 días de adaptación de las ratas posterior a su llegada a la unidad, se iniciaron 2 semanas de entrenamiento, donde se expuso a las ratas a consumir una solución al 1% de sacarosa (peso/volumen) antes de empezar el protocolo cirugía OBX, según sea el caso. El entrenamiento constó en dos sesiones de una hora (lunes y jueves) a la semana, en las cuales los animales fueron alojados 1 h individualmente en jaulas que contenían 2 botellas simultáneamente, una con solución de sacarosa de 1% peso/volumen y la otra con agua potable. Una vez finalizado el entrenamiento se realizaron 3 pruebas: la primera antes de realizar la cirugía, la segunda una vez finalizado el tiempo de rehabilitación de las ratas operadas (OBX) y la tercera al finalizar el tratamiento con ZM 241385.

Las pruebas se llevaron a cabo conforme al procedimiento anteriormente mencionado en una sola sesión, con la diferencia de una duración de 4h de prueba con las dos botellas. Para prevenir la preferencia por la posición, la localización de las dos botellas será variada durante el período de prueba (cada 30 minutos). Las sesiones fueron efectuadas con un ayuno de comida y agua de 18 h (modificado de Moreau *et al.*, 1994). La cantidad total del líquido remanente en cada botella fue medida al final del período de prueba. La puntuación para la preferencia de sacarosa fue expresada como porcentaje de la ingesta de líquido total y se calculó con la ecuación reportada por Rinwa et al. (2013):

$$S = \frac{I_s}{I_s + W} * 100 \quad [1]$$

Donde, IS= ingesta de sacarosa en gramos y WI= ingesta de agua en gramos.

La prueba de ingesta de sacarosa se utilizó como indicador del síntoma de la anhedonia, el cual es característico de los pacientes con depresión mayor. La anhedonia (considerada como la disminución de la preferencia de ingesta de sacarosa) le proporciona la validez de apariencia al modelo animal usado para la depresión (Krishnan *et al.*, 2008; Abelaira *et al.*, 2013).

6.4. Diseño y tratamientos experimentales

El diseño experimental (Figura 6.1) constó de 4 días de adaptación de las ratas una vez llegadas al bioterio, posteriormente se realizó dos semanas de entrenamiento de ingesta de sacarosa. Una vez finalizado el entrenamiento de ingesta de sacarosa se realizaron las pruebas conductuales de PNF, IS, PCA. Una vez terminado el tiempo de habituación, las ratas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: el grupo control de cirugía simulada (Sham) y el grupo de cirugía de bulbectomía olfatoria (OBX). La cirugía OBX se realizó después de 2 semanas de habituación. El tratamiento farmacológico comenzó 2 semanas después de la recuperación de la cirugía y se mantuvo durante 14 días. El peso corporal se evaluó semanalmente como una prueba de validación de constructo de la cirugía OBX. Las pruebas conductuales se realizaron antes de la cirugía, después de la cirugía y después del tratamiento (todas las ratas fueron sometidas simultáneamente a una prueba diaria, siempre en la misma secuencia). Después de la recuperación de la cirugía, las ratas OBX se dividieron en los siguientes 4 grupos de tratamiento (n = 10): vehículo OBX + (DMSO), vehículo OBX + (NaCl 0,9%), OBX + ZM (2 mg / kg) y OBX + (Adenosina 5 mg / kg).

Los tratamientos se administraron a través de inyección intraperitoneal (i.p) a razón de una dosis única por día. ZM 241385 (Sigma-Aldrich, Reino Unido Lote n. ° 024M4712V) se disolvió en DMSO (Sigma Chemical Co., St Louis, EE. UU.), posteriormente fue diluido en Cremophor EL (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.), por último, se llevó al volumen final con una solución de NaCl al 0.9% (concentración final 15%

DMSO y 15% Cremophor EL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adenosina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, U.S.A Lote # SLBGG2403V) se disolvió en NaCl al 0,9%. Las concentraciones de dosificación se determinaron con base en estudios previos (Kaster et al. 2004)(El Yacoubi et al. 2001) .

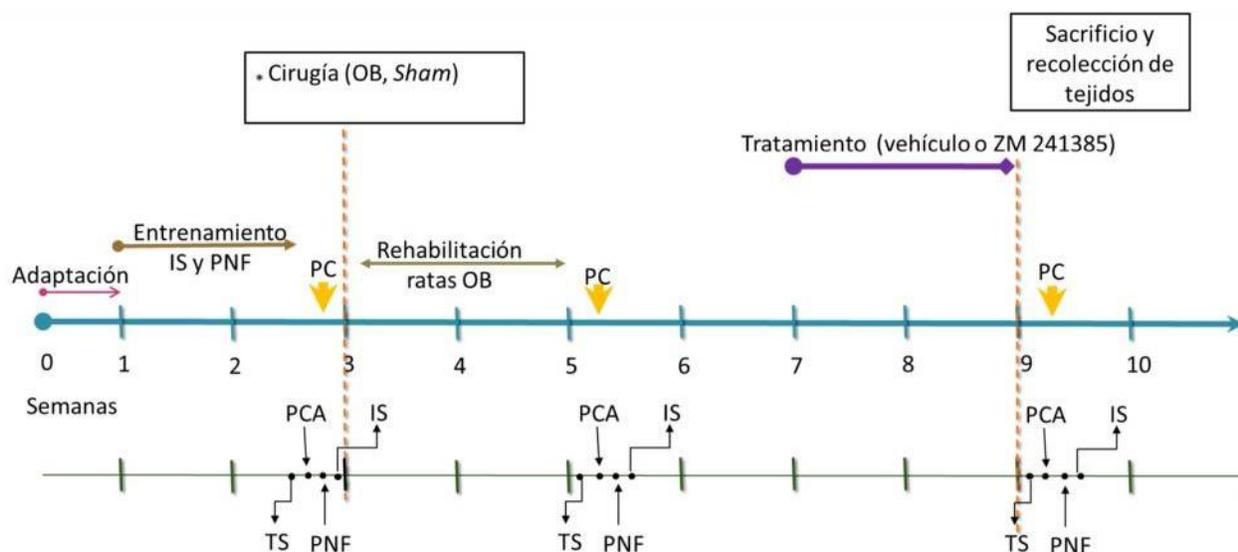


Figura 6.2. Diseño experimental. Se muestra el cronograma del experimento, el cual consta del modelo de cirugía bulbectomía olfatoria (ratas OB) Se pueden observar los períodos de adaptación, entrenamiento, pruebas conductuales (PC). IS= Prueba de ingesta de sacarosa, PNF= Prueba de nado forzado, PCA= Prueba de campo abierto,

6.5. Análisis de interacción ligando proteína *in silico*

Para los estudios de acoplamiento, se evaluaron todas las estructuras cristalográficas activas (unidas con el agonista) e inactivas (unidas con el antagonista) reportadas para la proteína del receptor A2AR humano. Posteriormente se seleccionó la estructura cristalina con el antagonista ZM (PDB: 4EIY) para representar estructuras tanto activas como inactivas. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con AutoDock 4.2.6 y AutoDockTools (ADT) 1.5.6. La preparación de proteínas y ligandos se realizó

con el programa de Free Maestro 10.5 (Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, EE. UU., 2016). Los ligandos y proteínas fueron preparados agregándole: 1) todos los átomos de hidrógeno, incluidos los átomos no polares; 2) las cargas de Gasteiger y Kollman. Los parámetros de solvatación se ajustaron a sus valores predeterminados, y los hidrógenos no polares se fusionaron. Previamente, los estados de protonación del ligando fueron asignados usando ChemAxon Software Marvin y se ajustaron al pH fisiológico ($7,0 \pm 0,5$). El software AutoGrid se utilizó para preparar los mapas de energía, y las dimensiones de la cuadrícula se establecieron en $40x \times 66y \times 48z$ puntos, ajustando el espaciado entre los puntos de la cuadrícula a 0.375 \AA . Las coordenadas de la cuadrícula se centraron en el ligando cristalográfico (ZM). Todas las rotaciones individuales de los ligandos se establecieron automáticamente con AutoTors. Para el análisis de acoplamiento se utilizó el algoritmo genético lamarckiano (LGA) como parámetro de búsqueda. El número de ejecuciones se estableció en 100 corridas y cada solución se agrupaba en grupos con una tolerancia RMSD de $2,0 \text{ \AA}$. Las coordenadas de adenosina se obtuvieron de PDB: 2YDO.

6.6. Inmunofluorescencia

6.6.1. Obtención de muestras

Los animales de este grupo se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (40mg/Kg), una vez completamente sedados se perfundió con paraformaldehído (PFA) al 4%. Rápidamente los animales fueron decapitados con una guillotina para obtener los encéfalos de cada rata, los cuales fueron enjuagados en una solución de PBS 1x estéril, posteriormente los encéfalos se fijaron colocándolos en tubos falcon con PFA al 4% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se retiraron los encéfalos del PFA y se enjuagaron con PBS 1X. A continuación, los encéfalos se almacenaron a 4°C en tubos falcon con 5ml de solución de sacarosa al 30% (como agente crioprotector). Una vez que los encéfalos están en la parte inferior del tubo, se procedió a montarlos en cajas de papel aluminio con medio congelador de tejidos

Tissue-tek. Las cajas fueron congeladas rápidamente y almacenadas a -70°C hasta su uso.

6.6.2. Inmunohistoquímica

Los encéfalos montados en *tissu-tek* fueron utilizados para realizar microcortes longitudinales de $18\ \mu\text{m}$ en un criostato (Leica) a -20°C . Los microcortes fueron adheridos en laminillas (VWR micro slides) e inmediatamente se guardaron a 20°C previo a su uso. Las laminillas con los cortes se etiquetaron debidamente (blanco o muestra) y colocadas en una cámara húmeda, posteriormente se le realizaron lavados con PBS 1X. Después, se hizo un bloqueo con BSA al 1.5 % por 30 minutos a temperatura ambiente para reducir el marcaje inespecífico. Al finalizar el bloqueo se efectuaron 3 lavados con PBS 1x y se incubó con el anticuerpo primario diluido en BSA 3% por 24 h. Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: anti- A_{2A} receptor hecho en conejo (1:100, Thermo Scientific), anti-NeuN hecho en ratón (1:100, Abcam), anti-GFPA hecho en ratón (1:400, Sigma). Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se lavaron las laminillas con PBT 1X tres veces. Enseguida, las laminillas fueron incubadas (2h a temperatura ambiente) con $300\ \mu\text{l}$ de los anticuerpos secundarios correspondientes: Alexa 568 anti-conejo hecho en cabra (1:1500, Invitrogen) o Alexa 488 anti-ratón hecho en conejo (1:1500, Invitrogen). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las laminillas se lavaron con PBS 1X, para finalmente colocar el cubreobjetos fijando con una gota de glicerol para su observación y análisis al microscopio.

Las imágenes de inmunofluorescencia se registraron mediante microscopía confocal (Carl Zeiss LSM 700, Alemania). Los análisis de densitometría se llevaron a cabo con el uso del software ZEN 2009 (Carl Zeiss). Para medir la densidad de inmunoreactividad, todas las imágenes se tomaron en el mismo modo de adquisición. La intensidad de la señal se calculó dividiendo la suma de los valores verdes o rojos (según el anticuerpo secundario) de todos los píxeles en el área por el número de

píxeles dentro del área. Las intensidades de señal promedio se calcularon en el hipocampo (giro dentado y CA3), amígdala, corteza prefrontal (PFC) y regiones hipotalámicas de cada grupo. En cada diapositiva, se seleccionaron dos áreas al azar de las estructuras cerebrales completas y se evaluaron. El análisis densitométrico fue realizado con tres laminillas por rata, y por cada grupo fue evaluado por triplicado (es decir tres ratas por grupo), dando así un total de 18 imágenes para cada grupo experimental.

6.7. Análisis de la expresión génica por qRT-PCR

6.7.1 Obtención de muestras

Una vez sacrificado el animal se realizó la disección de las siguientes estructuras: amígdala, hipocampo y ganglios basales, las cuales se lavaron de manera inmediata en una solución de PBS 1x estéril, posteriormente fueron colocados en tubos *ependorf*® previamente enfriados y debidamente etiquetados, inmediatamente fueron congelados con nitrógeno líquido. Por último, fueron almacenados a -70°C hasta su utilización; la toma de estas muestras se realizó lo más rápido posible (sin pasar más de 5 minutos entre el sacrificio del animal y la congelación en nitrógeno líquido).

6.7.2 Extracción de ARN

Las muestras congeladas de la porción del sistema límbico de las ratas fueron pulverizadas mediante un mortero con pistilo (previamente estéril y frío) utilizando nitrógeno líquido. El pulverizado obtenido fue alícuotado en porciones de 10 mg de muestra aproximadamente, en tubos estériles de 1.5 ml. La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el kit MagNA Pure Compact RNA isolation (Roche, applied science). Para ello primero se realizó la homogenización de las muestras adicionando 10 mg del pulverizado a 350 µl de buffer de lisis, enseguida las muestras se pasaron varias veces a través de una aguja (diámetro 0.6 mm) de una jeringa. A continuación, las muestras

se incubaron por 30 minutos a 15-25 °C, posteriormente se centrifugaron a 13,000 x g (15-25 °C) durante 2 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se transfirieron 350 µl del sobrenadante al tubo muestra del kit.

Por último, el tubo muestra del kit se colocó en el tubo Rack para realizar la extracción en el equipo de extracción automatizada de ácidos nucleicos (MAGNA Pure compact®, Roche). La extracción de ARN se realizó acorde a las instrucciones del proveedor, en breve las muestras lisadas y homogenizadas fueron colocadas en los tubos de prueba a los cuales se les adicionó 20 µl de DNAsa I por muestra, con el objetivo de evitar contaminación con ADN. Después el equipo fue programado con el número de muestras y el volumen de elución final deseado, para poder empezar la corrida. Al finalizar la extracción, las muestras fueron retiradas del equipo y se cerraron los tubos de elución para ser almacenados inmediatamente a -70 °C.

6.7.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ARN fue cuantificado utilizando en espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000. Con la concentración obtenida del ARN, se hicieron los cálculos para obtener los microlitros necesarios para tener 1 µg de ARN, para posteriormente realizar la retrotranscripción a ADNc mediante un kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche). Los microlitros de ARN necesarios para 1 µg de ARN fueron colocados en tubos de 0.2 ml para PCR estériles, posteriormente se añadió 1 µl de oligo-DT y se completó a un volumen final de 13 µl con agua grado PCR. A continuación, la mezcla anterior se desnaturalizó calentando a 65°C por 10 minutos. Por otro lado, la síntesis de ADNc, se realizó en un tubo estéril de 0.2 ml, en el cual se colocaron: 4 µl de buffer de incubación RT, 0.5 µl de inhibidor de ARNasas, 2 µl mezcla de nucleótidos y 0.5 µl de enzima RT (retrotranscriptasa) por cada reacción. La mezcla se incubó a 55°C durante 30 minutos, después se inactivó la enzima calentando por 5 minutos a 85°C, y por último se almacenó el ADNc recién sintetizado a -20°C.

6.7.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción se realizó mediante el kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), con la preparación de la mezcla de reacción. La mezcla fue preparada de la siguiente manera: 4 µl de agua grado PCR, 1.5 µl de cloruro de magnesio 25 mM, 0.5 µl de oligonucleótidos (*primer*) *forward*, 0.5 µl de primer *reverse* y 1 µl del vial que contiene la enzima y el Syber Green. Los primers que se emplearon corresponden a los genes que codifican para el receptor purinérgicos A_{2A} y para la proteína constitutiva de β-actina. Los *primers* fueron diseñados en el programa primer 3 y se muestran en el Cuadro 6.1. Posteriormente, la mezcla de reacción fue homogenizada y se colocaron 7 µl de la mezcla de reacción en cada capilar del termociclador. A continuación, se añadió 2 µl del ADNc sintetizado de cada muestra por capilar. Los capilares cargados con la mezcla de reacción y la muestra se centrifugaron por 1 minuto a 2000 x g, enseguida los capilares fueron montados en el carrusel del termociclador para ser colocado en el Light Cycler 1.5® (Roche). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: pre-activación a 95°C por 10 minutos, desnaturalización a 95°C por 10 segundos; alineamiento a 70°C por 10 segundos y una extensión de 72°C por 10 segundos, se realizaron 40 ciclos con estas condiciones.

Cuadro 6.1 *Primers* utilizados para la amplificación del ADNc

Gen (Gen Bank)	Secuencia	Tm (°C)	% GC	Amplicón (bp)
A2AR (AF228684.1)	F: TGACCTGTCTGTTCGAGGAC R: CAAAGAGCCCGACGATGATG	59 59	55 55	237
b-actina (NM_031144.2)	F: AGCCATGTACGTAGCCATCC R: TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	55 55	50 50	210

* F= *primer forward* (correspondiente a la cadena adelantada), R= *primer reverse* (cadena atrasada), Tm= temperatura de fusión, bp = pares de bases por sus siglas en inglés

6.8. Análisis estadístico

Los datos de las pruebas conductuales se presentan como histogramas de la media \pm desviación estándar (SD). Con el objetivo de examinar diferencias significativas entre grupos se utilizó una ANOVA de dos vías. Además, se realizó una comparación múltiple post hoc de Bonferroni. Los valores p de las comparaciones post hoc se indican en las figuras. Los resultados de densitometría y RT-qPCR se analizaron por medio de un ANOVA de dos vías y una prueba de Tukey *post hoc* al 95% de nivel de confianza. Todas las pruebas se llevaron a cabo al azar por triplicado. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Prisma 5.

7. RESULTADOS

7.1 Modelo de depresión: Cirugía Bulbectomía Olfatoria Bilateral (OBX)

Con el objetivo de evaluar la validez de constructo del modelo de bulbectomía, las ratas se pesaron cada dos semanas. En la Figura 7.1 se puede observar que no existe diferencia significativa en los pesos corporales de las ratas durante las primeras tres primeras semanas, lo cual corresponde al lapso de habituación de las ratas. A continuación, se observa que en el grupo *sham* se mantuvo la tendencia a aumentar de peso durante las semanas posteriores, mientras que en el grupo OBX se observó una disminución de peso estadísticamente significativa (OBX vs *sham*: $t = 2,79$, $p < 0,05$) en la semana 5. Por otro lado, el efecto de la administración de los ligandos al receptor A_{2A} sobre la recuperación en el peso corporal fue evaluado en las ratas OBX.

7.1.1 Efecto del tratamiento de ligandos al receptor A_{2A} sobre el peso corporal

El tratamiento con el antagonista ZM mostró un aumento estadísticamente significativo (OBX + ZM vs OBX + DMSO: $t = 8,04$, $p < 0,001$) del peso corporal con respecto al grupo OBX + vehículo en la semana 7 (Figura 7.1 A); sin embargo, este aumento no representó una recuperación total del peso corporal, comparado con el grupo control (Sham vs OBX + ZM: $t = 19,42$, $p < 0,001$). En la semana 10, todos los grupos experimentales tuvieron pesos corporales significativamente más altos que en la semana 7. No obstante, el grupo OBX + ZM no llegó a ser estadísticamente igual al grupo Sham (OBX + ZM vs Sham: $t = 12,89$, $p < 0,001$). Además, en la semana 10 no se encontró diferencia significativa entre el grupo con el tratamiento ZM y el grupo con el vehículo (OBX + ZM vs OBX + DMSO; $t = 1,78$, $p > 0,05$).

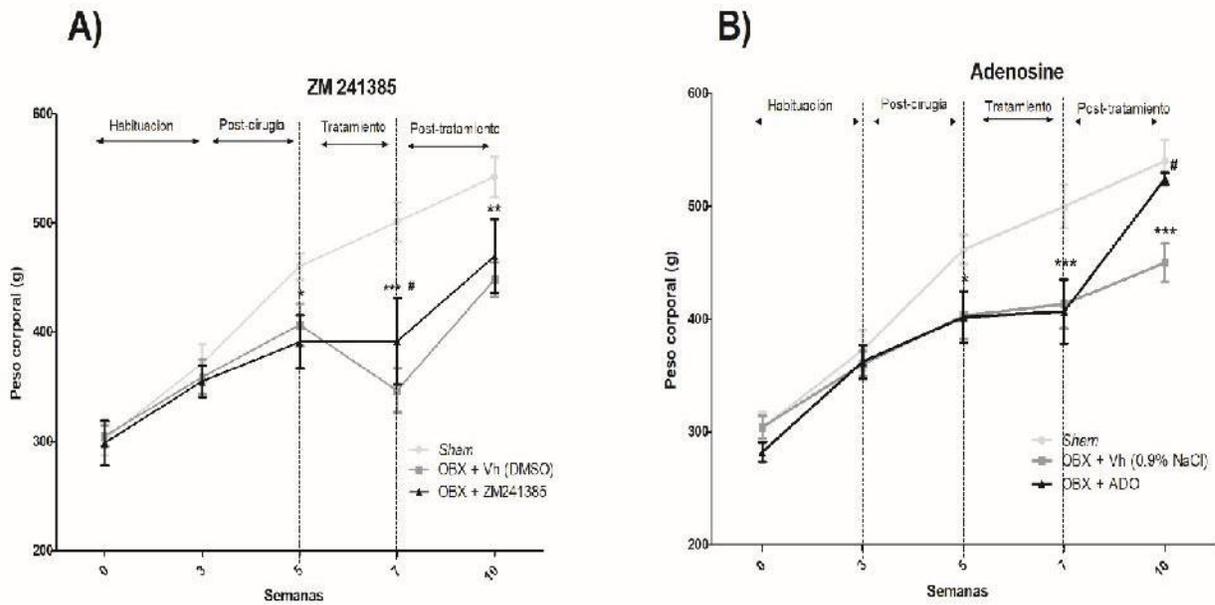


Figura 7.1 Efectos de ZM 241385 y adenosina sobre el peso corporal. Todos los tratamientos comenzaron 2 semanas después de la cirugía OBX y continuaron durante 2 semanas. Cada punto representa la media \pm SD. Se utilizaron ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Bonferroni para evaluar las diferencias entre los grupos cada semana ($p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$ indican diferencias significativas en comparación con el grupo simulado) ($\# p < 0,01$ indica diferencias significativas en comparación con el grupo vehículo- Vh: DMSO).

El efecto de la administración del agonista adenosina en el peso corporal de las ratas bulbectomizadas se puede observar en la figura 7.1 (B). El grupo OBX + ADO no mostró recuperación de peso después de dos semanas de tratamiento (semana 7) en comparación con el grupo control (OBX + ADO vs Sham: $t = 3,323$, $p < 0,01$). Sin embargo, en la semana 10, el grupo OBX + ADO logró una recuperación total del peso corporal, debido a que no se observó diferencia significativa con respecto al grupo Sham (OBX + ADO vs Sham: $t = 2,214$, $p > 0,05$).

7.2 Evaluación del efecto de la cirugía OBX y los tratamientos farmacológicos en las pruebas conductuales

7.2.1 Efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado

La prueba de nado forzado es una herramienta que permite detectar posibles moléculas con efecto antidepresivo, debido a que mide el comportamiento de “desesperación” mediante la latencia de las siguientes conductas: inmovilidad y lucha (braceo). Los resultados mostraron que en las ratas OBX, el tiempo de inmovilidad aumentó un 65% (Sham vs OBX: $t = 9,85$, $p < 0,001$), mientras que el tiempo de braceo disminuyó significativamente (Sham vs OBX $t = 16,99$, $p < 0,001$) comparadas con el grupo Sham (Figura 7.2). Sin embargo, el tiempo de inmovilidad se redujo en un 39% en las ratas OBX a las que se les administró el antagonista ZM, en comparación con el grupo con vehículo (OBX + ZM vs OBX + DMSO: $t = 8,43$, $p < 0,001$) así como un aumento del 56% en el tiempo de braceo (OBX + ZM vs OBX + DMSO: $t = 12,08$, $p < 0,001$).

A pesar de la reducción en el tiempo de inmovilidad y el aumento en el tiempo de braceo por efecto de ZM, no se observó una recuperación total de las ratas OBX, ya que se encontró diferencia significativa entre el grupo OBX + ZM y el grupo Sham ($t = 0,43$, $p > 0,05$) (Figura 7.2 A y 7B). En contraste, la administración crónica de adenosina en ratas OBX durante 14 días no mostró diferencia significativa con respecto al grupo vehículo (OBX + ADO vs OBX + NaCl: $t = 1,56$, $p > 0,05$) en ambas conductas: tiempo de inmovilidad ni tiempo de braceo (Figura 7.2 C y D).

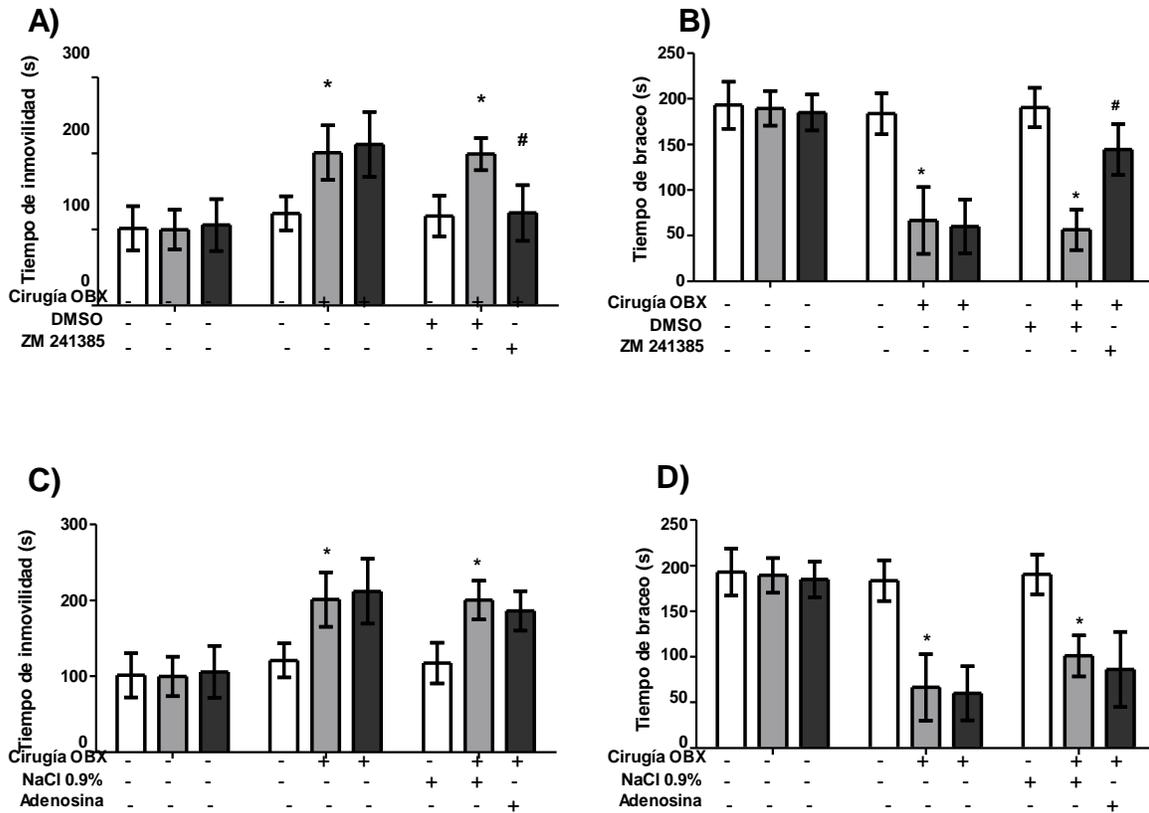


Figura 7.2 Efectos de ZM 241385 y adenosina en la prueba de nado forzado. El tiempo de inmovilidad aumentó significativamente, después de la cirugía OBX. A) El tiempo de inmovilidad disminuyó después de la administración de ZM 241385 (2 mg / kg, i.p.) y B) aumentó el tiempo de bruceo. La administración de Adenosina no mostró efecto en el C) tiempo de inmovilidad ni el D) el tiempo de bruceo. Las barras representan la media \pm SD (n = 10-2). Se utilizó ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* de Bonferroni para evaluar las diferencias entre los grupos (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 indican diferencias significativas comparadas al grupo simulado).

7.2.2 Efecto ansiolítico en la prueba de campo abierto

Con el fin de evaluar el comportamiento de la ansiedad se midió el tiempo de aislamiento, el cual se definió como el tiempo que las ratas permanecieron inmóviles en un cuadrante del campo abierto. En la figura 7.3 se muestra un aumento significativo

en un 74% en el comportamiento de ansiedad (OBX vs Sham: $t = 8,85$, $p < 0,001$) en las ratas OBX en comparación con el grupo Sham. La administración crónica de ZM en las ratas OBX ejerció una disminución del 42% en el tiempo de aislamiento en comparación con el grupo (OBX + ZM vs vehículo OBX + DMSO: $t = 9,27$, $p < 0,001$). Por otro lado, el tratamiento con adenosina disminuyó el tiempo de aislamiento solo en un 10,7%, sin lograr diferencia significativa con respecto al grupo OBX + vehículo (OBX + ADO vs OBX + NaCl 0.9%: $t = 1,29$, $p > 0,05$) (Figura 7.3 B). Además, el tiempo de deambulaci3n de las ratas durante la prueba de campo abierto tambi3n fue medido. Los resultados indicaron que la deambulaci3n de las ratas que fueron sometidas a la cirug3a OBX disminuy3 un 30% (OBX vs Sham: $t = 4,55$, $p < 0,001$), pero que el tratamiento de estas ratas con ZM indujo la recuperaci3n de la conducta deambulatoria (OBX + ZM vs Sham: $t = 0,45$, $p > 0,05$). Es importante mencionar que el grupo de ratas OBX tratado con la Adenosina, no mostr3 una recuperaci3n del tiempo de deambulaci3n comparado con el grupo OBX + veh3culo NaCl 0.9% ($t = 0,74$, $p > 0,05$).

Las frecuencias de pases por el centro, as3 como de los movimientos corporales de acicalarse y husmeo est3n representadas en la Figura 7.3 C. La ablaci3n del bulbo olfatorio ocasion3 una disminuci3n significativa en la frecuencia de husmeo y de acicalamiento de las ratas con respecto al grupo Sham ($t = 15,35$, *** $p < 0,001$ y $t = 2,68$, * $p < 0,05$, respectivamente). S3lo el tratamiento con ZM mostr3 una reversi3n significativa de las anomal3as de comportamiento de las ratas OBX incrementando as3 la frecuencia de husmeo ($t = 15,60$, *** $p < 0,001$) y acicalamiento ($t = 2,68$, * $p < 0,05$) en comparaci3n con el OBX + veh3culo (DMSO). Tambi3n hay que se3alar que no se encontr3 diferencia significativa entre el grupo ZM y el grupo sham en ambos comportamientos ($t = 0,45$, $p > 0,05$).

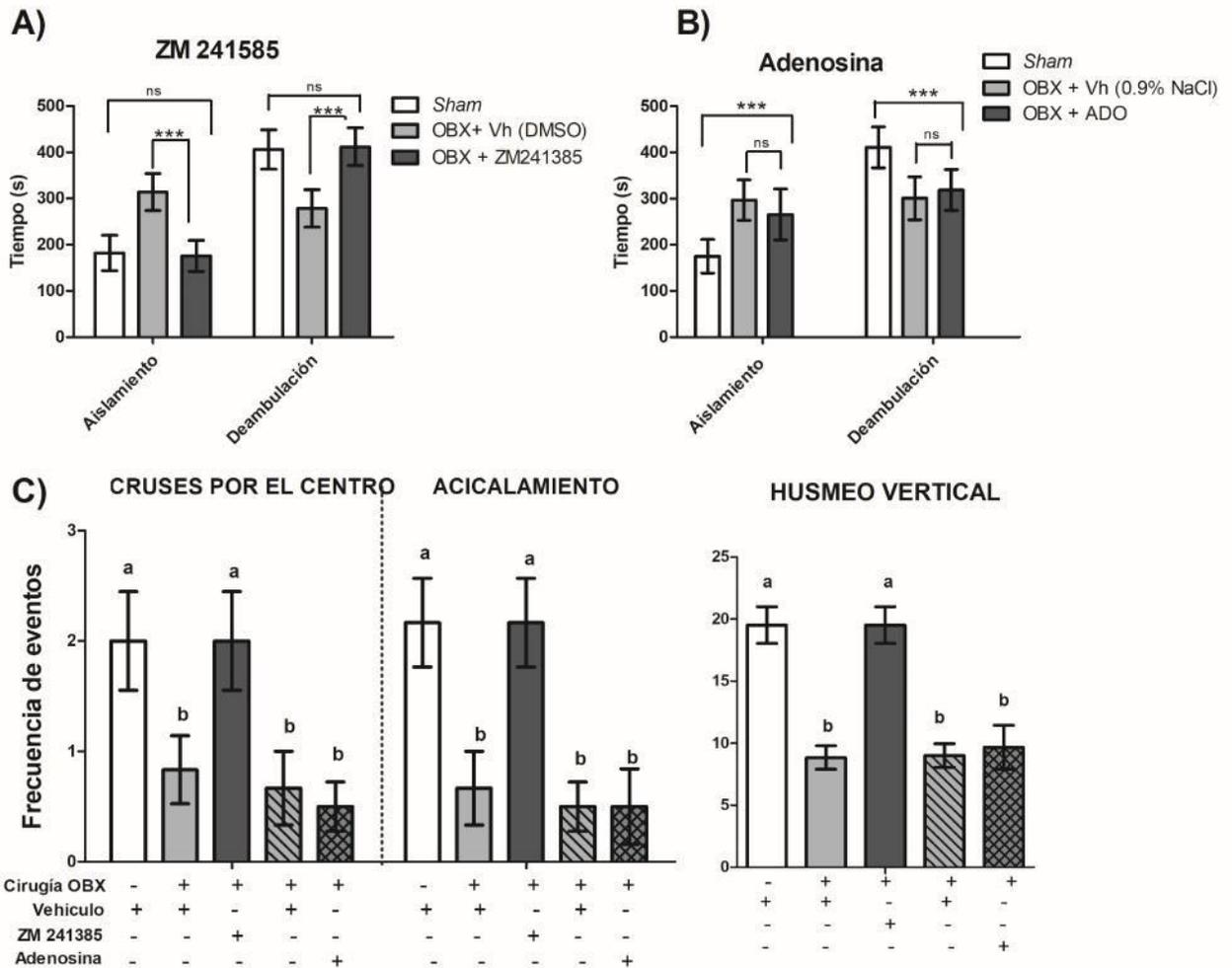


Figura 7.3 Efectos de ZM241385 y adenosina en la prueba de campo abierto (PCA). A) La administraci3n de ZM 241385 (i.p.) durante dos semanas disminuy3 la latencia de aislamiento y aument3 la latencia de la ambulaci3n. B) La administraci3n de adenosina (i.p.) correspondi3a a una diferencia significativa en comparaci3n con el grupo control (sham), y por lo tanto la adenosina no revirti3 el comportamiento depresivo revelado por la PCA. C) Frecuencia de los comportamientos durante 10 min de la PCA. Las barras representan las medias \pm SD ($n = 10-2$). Se utiliz3 ANOVA de dos v3as para evaluar las diferencias entre los grupos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indican diferencias significativas en comparaci3n con el grupo simulado). Las diferentes letras (a y b) representan diferencias significativas

7.2.3 Efecto anti-hedónico en la prueba de ingesta de sacarosa

Los resultados de la prueba de preferencia de sacarosa revelaron una reducción del 70% en el consumo de sacarosa en las ratas bulbectomizadas (OBX vs Sham: $t = 15,14$, $p < 0,001$). Las ratas OBX a las que se les administró ZM aumentaron significativamente su ingesta de sacarosa en comparación con las del grupo OBX + vehículo DMSO. La preferencia por la solución de sacarosa fue igual ($t = 2,20$, $p > 0,05$) entre el grupo OBX + ZM y el grupo Sham (Figura 7.4 A). Para el caso del grupo OBX con tratamiento de adenosina se observó que estas ratas incrementaron en un 25% la ingesta de sacarosa, en comparación con el grupo OBX + Vehículo (OBX + ADO vs OBX + NaCl 0.9%: $t = 3,35$, $p < 0,01$); sin embargo, la ingesta de sacarosa aún no llega a ser igual al que se observó en el grupo Sham ($t = 6,05$, $p < 0,001$) (Figura 7.4 B).

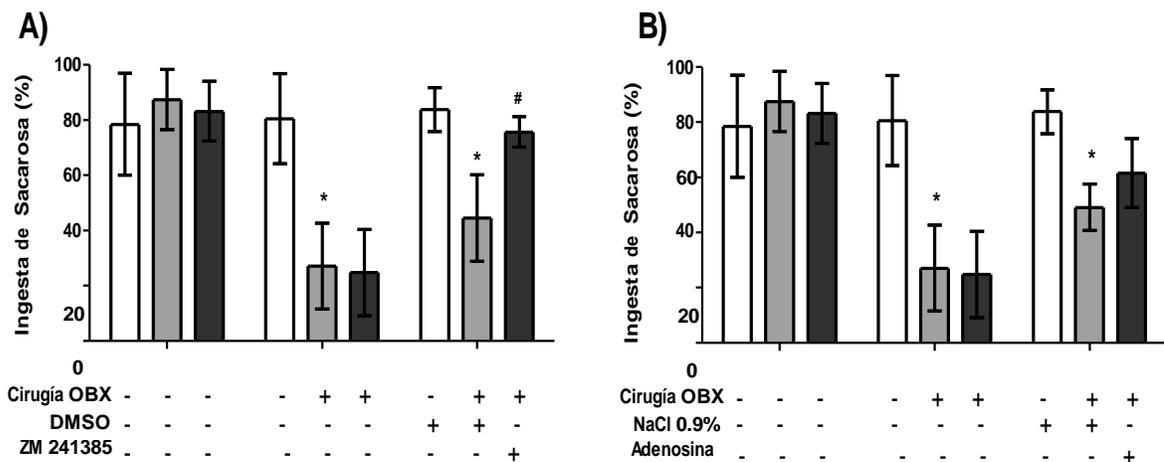


Figura 7.4 Efectos de los ligandos A2AR en la ingesta de sacarosa. La preferencia de sacarosa disminuyó significativamente después de la cirugía OBX. A) El antagonista ZM (2 mg / kg i.p.) restauró la preferencia de sacarosa, mientras que el B) agonista adenosina (5 mg / kg i.p.) indujo recuperación parcial. Cada barra representa la media \pm SD, y las letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, prueba *post hoc* de Tukey).

7.3 Estudios *in silico* del acoplamiento molecular de ZM241385 y adenosina con el receptor A_{2A}

El análisis de acoplamiento molecular sugirió una sola posición de unión plausible para la adenosina con el receptor purinérgico A_{2A} y dos para el ligando ZM. La posición de unión encontrada para la adenosina tuvo una puntuación de acoplamiento de -4,40 kcal / mol) y una desviación cuadrática media (RMSD) de referencia de 1,53 (Figura 7.5 A°). Por otra parte, los dos modos de unión principales de ZM al receptor A_{2A} tuvieron la misma población en cada uno de los *cluster* (33 de 100 corridas). Los dos modos de unión encontrados para ZM fueron: ZM modo 1 con la puntuación de acoplamiento más alta (-8,23 kcal / mol) y un RMSD de 3,3 (Figura 7.5 B); y ZM modo 2 con una puntuación de acoplamiento de: -7,70 kcal / mol) y un RMSD de 1,7 (Figura 7.5 C).

Además, se realizó el análisis de residuos de aminoácidos que participan en la interacción receptor-ligando de ambos modos de unión de ZM (distancia estudiada de 5,0 A °). El análisis anterior reveló que ambos modos de unión de ZM comparten los residuos de aminoácidos que se unen con el anillo de furano, mientras que difieren en los residuos de aminoácidos que se unen a la cadena lateral de 4-hidroxifeniletilo. Cabe destacar que los residuos de que interaccionan con la cadena lateral 4-hidroxifeniletil del ZM modo 1 (Ala63, Phe62, Ser67, Ile80, Ala81, Cys82, Val84 e His278) fueron similares a los encontrados en la interacción de la ribosa del agonista adenosina con el receptor A_{2A} (Figura 7.5 D y 7.5 E). En contraste, ZM modo 2 exhibió interacciones hidrófobas con Leu167, Leu267, Met270 y Tyr271 en la cadena lateral de 4-hidroxifeniletilo. Además, el anillo de fenilo en el ZM modo 2, está estrechamente en contacto con Lys150, Lys153 y Asp170 (Figura 7.5 F).

A continuación, se propusieron modificaciones de la cadena lateral 4-hidroxifeniletíl del ZM con el fin de favorecer la orientación del ligando hacia los residuos de la cavidad antagonista. La primera modificación fue la adición de una insaturación a la cadena alifática (ZM + insaturación), y la segunda modificación fue la adición de un grupo epóxido (ZM + epóxido). Los resultados *in silico* mostraron solo una conformación de unión principal para ambas modificaciones de ligandos en lugar de dos que arrojaba para el ligando original. La modificación ZM + insaturación arrojó una puntuación de acoplamiento de -8,06 kcal / mol y un RSMD de 1,84 (Figura 7.5G); mientras que la modificación ZM + epóxido reveló un puntaje de acoplamiento de -8,61 kcal / mol y un valor RSMD de 1,73 (Figura 7.5 H).

Así mismo, los análisis de interacción proteína-ligandos revelaron que ZM + insaturación comparte las mismas interacciones de residuos de aminoácidos que ZM modo 2 (Figura 7.5 F y 7.5 I). Además, ZM + epóxido mostró interacciones de residuos de aminoácidos similares a la estructura de proteína cristalizado con el ligando ZM (Figura 7.5 J y 7.5 K). Finalmente, análisis de cavidades demuestran que ZM modo 2 tiene una configuración de estado antagonista (cavidad de unión en azul), mientras que el ZM modo 1 corresponde a una "configuración de estado agonista" (cavidad de unión en naranja) en el receptor purinérgico A_{2A} (Figura 7.6).

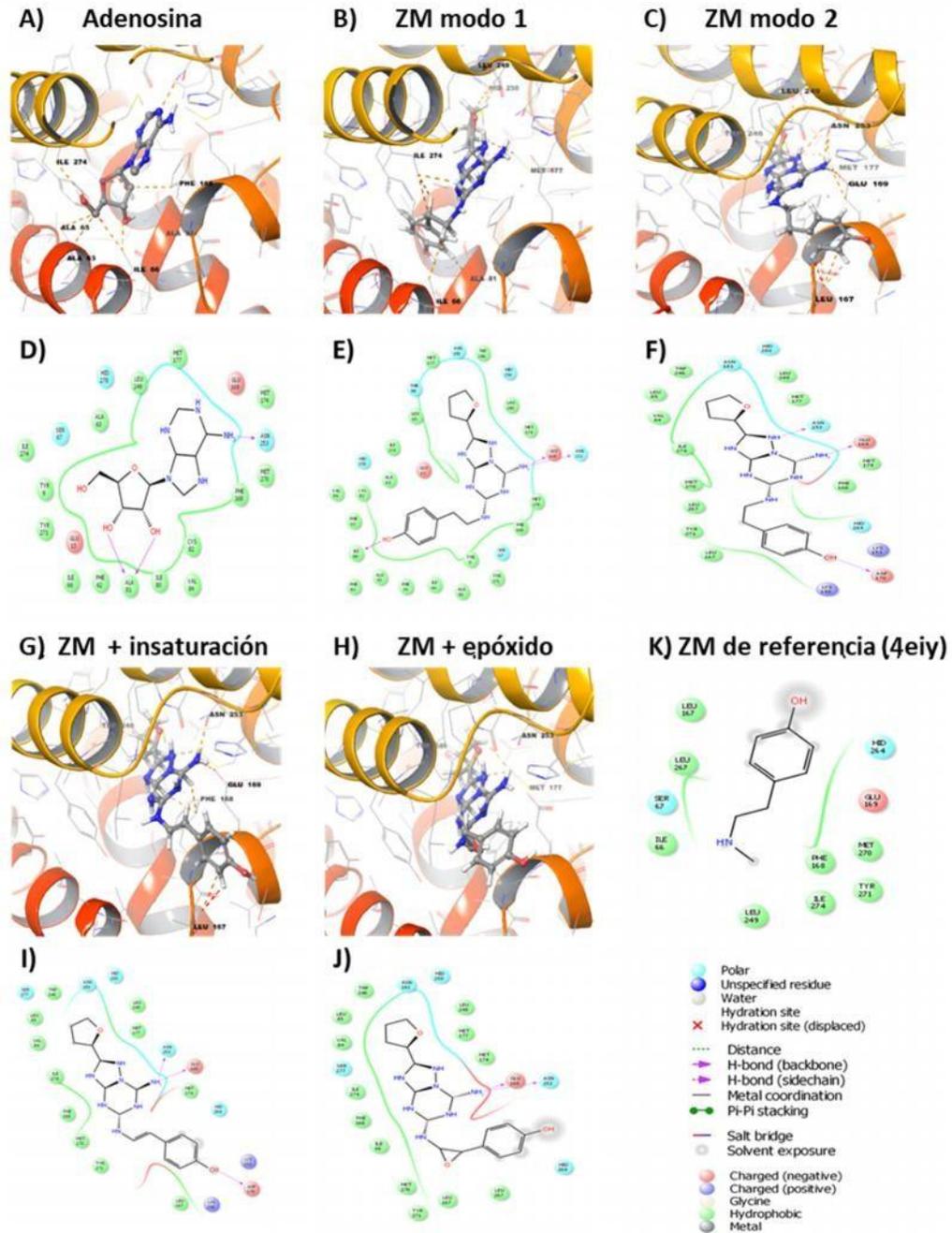


Figura 7.5. Interacciones receptor-ligando para el receptor A_{2A} (PBD: 4E1Y) unidos a A) adenosina, B) ZM 241385 modo de enlace 1 (ZM modo 1) y C) ZM 241385 enlace modo 2 (ZM modo 2). (D, E, F) Restos de aminoácidos de dos dimensiones dentro de 5 Å de los ligandos representados en la parte superior. Resultados del estudio de acoplamiento de las modificaciones al ligando ZM 241385 en tres (G, H) y dos (I, J) dimensiones. K) Restos de aminoácidos bidimensionales de la orientación de unión del ligando co-cristalizado.

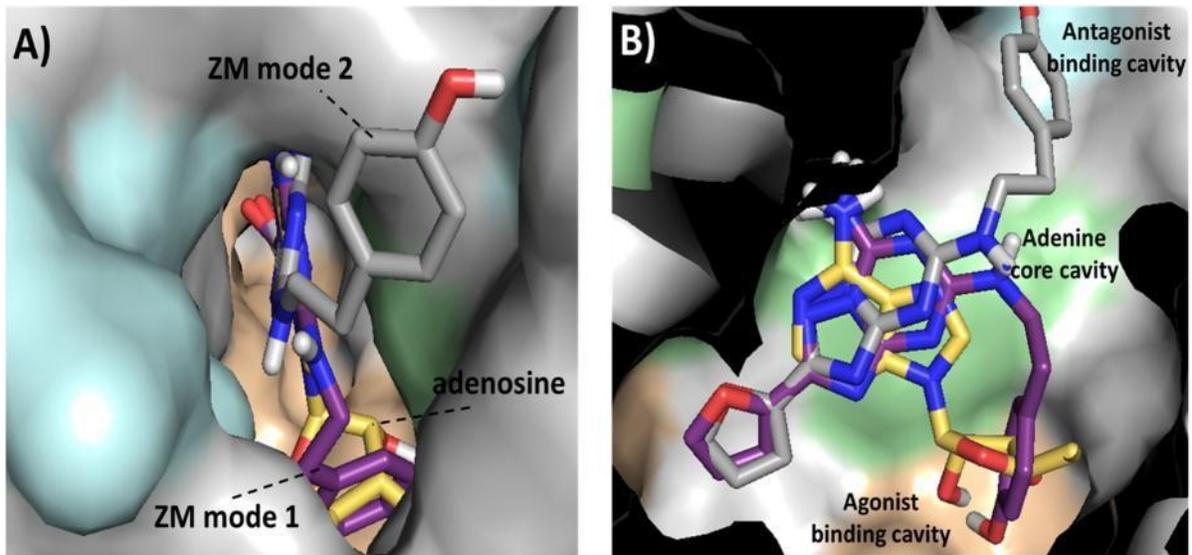


Figura 7.6 Análisis de cavidades de los ligandos al receptor A_{2A}. La figura muestra el modo de unión de la adenosina (en amarillo) y los dos posibles modos de unión de ZM 241385: modo 1 (en púrpura) y modo 2 (en gris). La cavidad de unión se muestra desde la cara extracelular de los receptores (A) y desde una sección transversal del receptor (B). Los restos de aminoácidos importantes para la cavidad de unión del agonista se muestran en naranja, la cavidad antagonista en azul y la cavidad para el anclaje del ligando al receptor en verde.

7.4 Efecto de la cirugía OBX y de la administración de ZM sobre la densidad neuronal en el giro dentado

El grupo de ratas que fueron sometidas a la cirugía tuvieron una reducción significativa del ~50% en la inmunotinción del marcador neuronal anti-NeuN comparado con el grupo Sham (Sham versus OBX + vehículo: $p < 0,01$) en el giro dentado (Figura 7.7). No obstante, el tratamiento con ZM durante 14 días a los animales OBX mostró un incremento en la densidad neuronal (OBX + ZM vs OBX + DMSO: $p < 0,05$). Sin embargo, cabe destacar que en comparación con el grupo Sham, la administración de ZM al grupo OBX, no evitó completamente la pérdida neuronal (Sham vs OBX + ZM: $p < 0,05$).

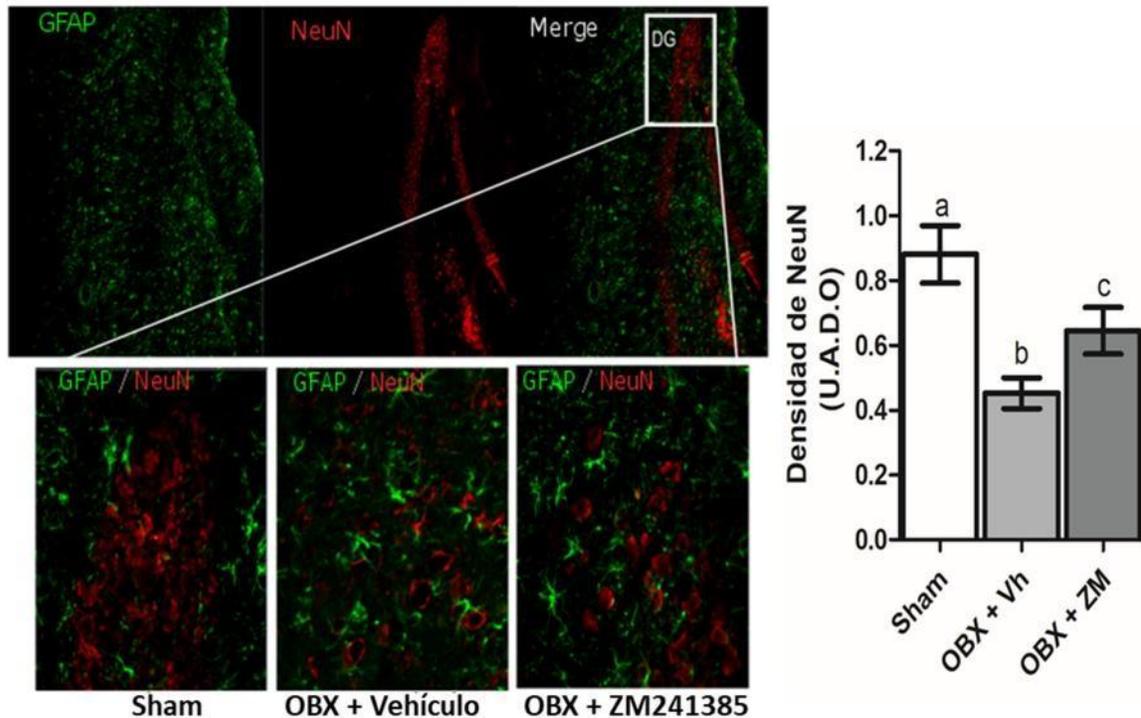


Figura 7.7 Densidad neuronal en el giro dentado (GD) del hipocampo de rata en los distintos grupos experimentales. La figura A) muestra un marcaje doble con el anticuerpo anti-NeuN en rojo y el anticuerpo anti- Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) en verde. El histograma muestra el análisis de densitometría de la densidad neuronal, la cual se realizó con una $n = 18$ secciones por triplicado. Cada barra representa la media \pm desviación estándar (SD) y las diferentes letras son diferencias significativas (ANOVA bidireccional con la comparación *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$). U.A.D.O (Unidades Arbitrarias de densidad óptica).

7.5 El efecto de la administración de ZM sobre la expresión y distribución del receptor A2AR

La localización celular del receptor A_{2A} fue evaluada mediante el uso de marcadores de neuronas (anti-NeuN) y del marcador para células gliales (GFPA). En la figura 7.8 se muestra una inmohistoquímica de doble marcaje en las secciones de hipocampo y se observa mayor co-localización del receptor A_{2A} con el marcador NeuN que con GFPA. Por lo tanto, en este trabajo, el receptor A2AR se expresó más en las

neuronas que en las células gliales. Además, se examinó si la cirugía OBX ejercía efecto en la expresión de la proteína A_{2A} en las áreas del cerebro que se relacionan con la conducta depresiva. Los resultados mostraron un patrón de expresión diferencial para la proteína A_{2A} en el hipocampo. Por ejemplo, mientras que la expresión de la proteína A_{2A} en el DG se observó disminuida en el grupo OBX + vehículo (Figuras 7.9 A y 7.11) en la región del hipocampo CA3 la proteína A_{2A} se encontró sobre-expresada (Figura 7.11).

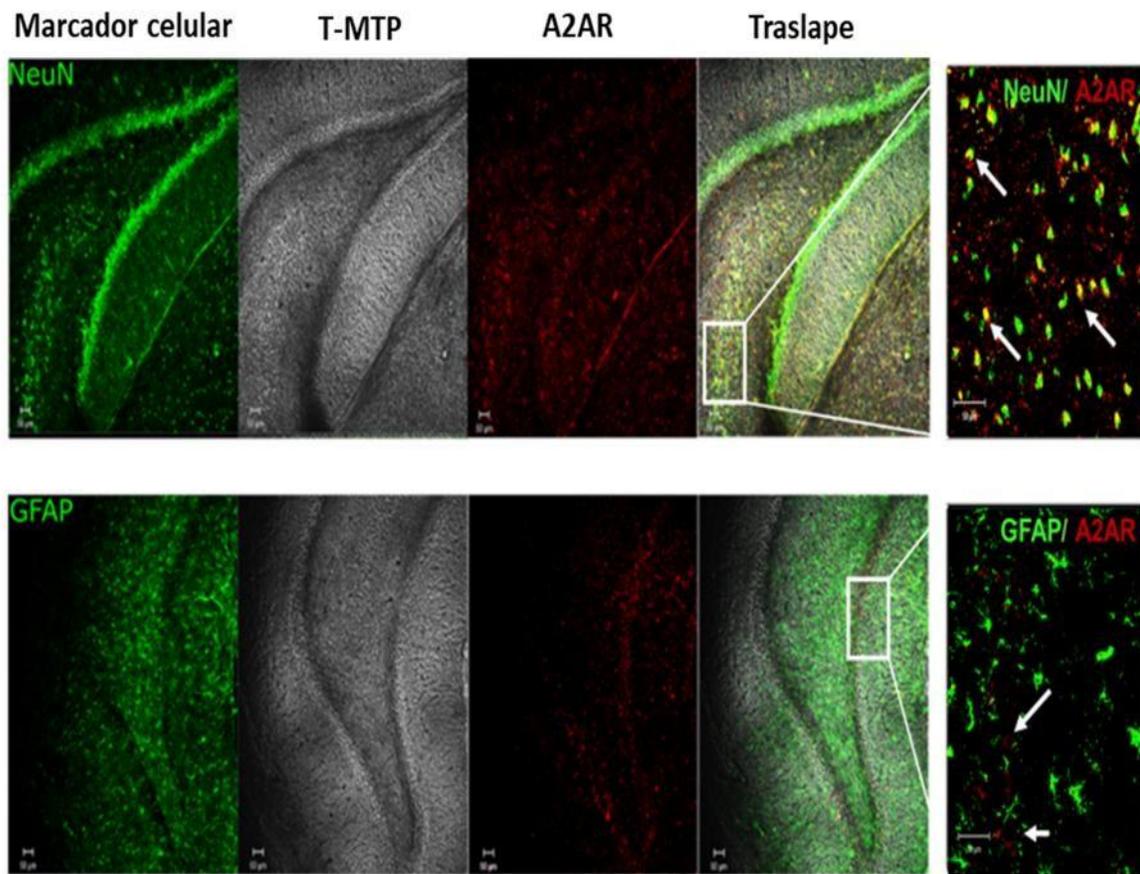
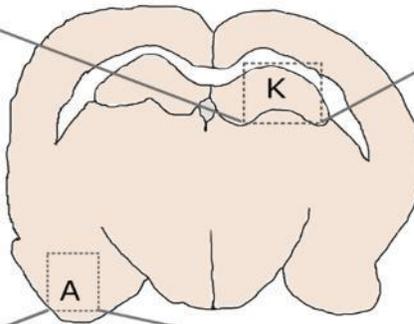
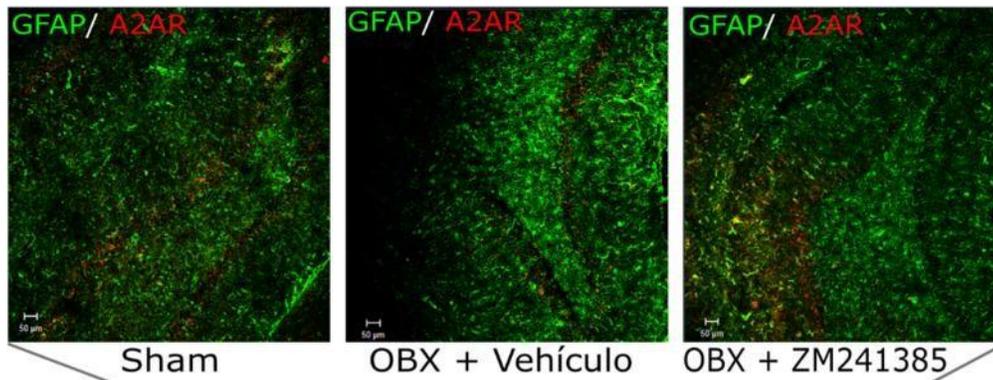


Figura 7.8 Localización del receptor purinérgico A_{2A}. La doble inmunofluorescencia en la sección del hipocampo de rata muestra la co-localización del receptor A_{2A} con el marcador neuronal NeuN (en amarillo) y no con la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP). Barra equivale a 50 μ m.

Adicionalmente, las micrografías confocales de las regiones de la amígdala (Figura 7.9 B), corteza cingulada (Figura 7.10 A) y del hipotálamo (Figura 7.10 B) revelaron un incremento en la expresión del receptor A_{2A} en las ratas OBX, comparadas con la observada en el grupo Sham. Por otra parte, se evaluaron los efectos del tratamiento con ZM en las ratas OBX sobre la expresión de la proteína A_{2A}AR. En la sección de giro dentado la expresión de la proteína A_{2A}AR aumentó con respecto al grupo vehículo (OBX + ZM vs OBX+DMSO: $p < 0,05$) (Figura 7.9 A). Así mismo, el efecto de ZM en ratas OBX observado en amígdala, corteza cingulada e hipotálamo fue la disminución de la expresión del receptor A_{2A} comparada con el grupo vehículo.

El análisis de densitometría de los diferentes grupos experimentales indicó que en el grupo OBX + DMSO la densidad del receptor A_{2A} fue significativamente menor en la región de GD (-63%), mientras que en las regiones restantes (CA3 / CA2 hipocampo, amígdala, PFC e hipotalámico) fue significativamente mayor (53%, 52%, 51% y 72%, respectivamente) (Figura 7.11 A). En la misma figura se observa que la administración de ZM al grupo OBX indujo una disminución significativa de la densidad del receptor A_{2A} (OBX + ZM vs OBX + DMSO: $p < 0,05$). Los resultados mostraron que en el grupo OBX + ZM, la densidad A_{2A}AR se redujo en un 24% en las regiones hipocampales CA3 / CA2, en un 35% en amígdala, en un 40% en la corteza cingulada y en un 63% en hipotálamo en comparación con el OBX + DMSO. Sin embargo, los resultados indican que el tratamiento con ZM, no restauró la densidad basal A_{2A}AR en el hipocampo y la amígdala, mientras que en las zonas PFC e hipotalámica la densidad A_{2A}AR fue completamente restaurada (Figura 7.11).

A)



B)

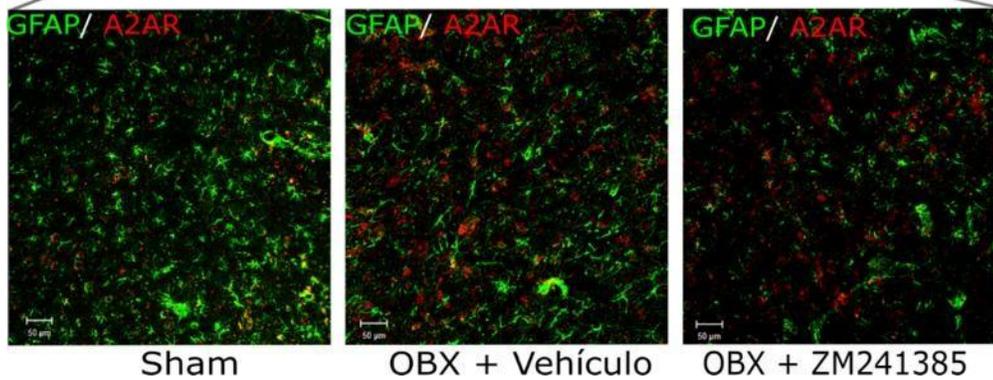


Figura 7.9 Distribución del receptor A_{2A} (rojo) y GFPA (verde) en (A) el giro dentado del hipocampo (K), así como en (B) la amígdala (A) de: ratas control (Sham), ratas con el modelo de depresión (OBX + Vehículo) y ratas tratadas (OBX + ZM). Obsérvese disminución de A_{2A} en el hipocampo, mientras que en la amígdala se muestra una sobreexpresión del receptor A_{2A} en ratas deprimidas, en comparación con el grupo de control. Barra de escala 50μm.

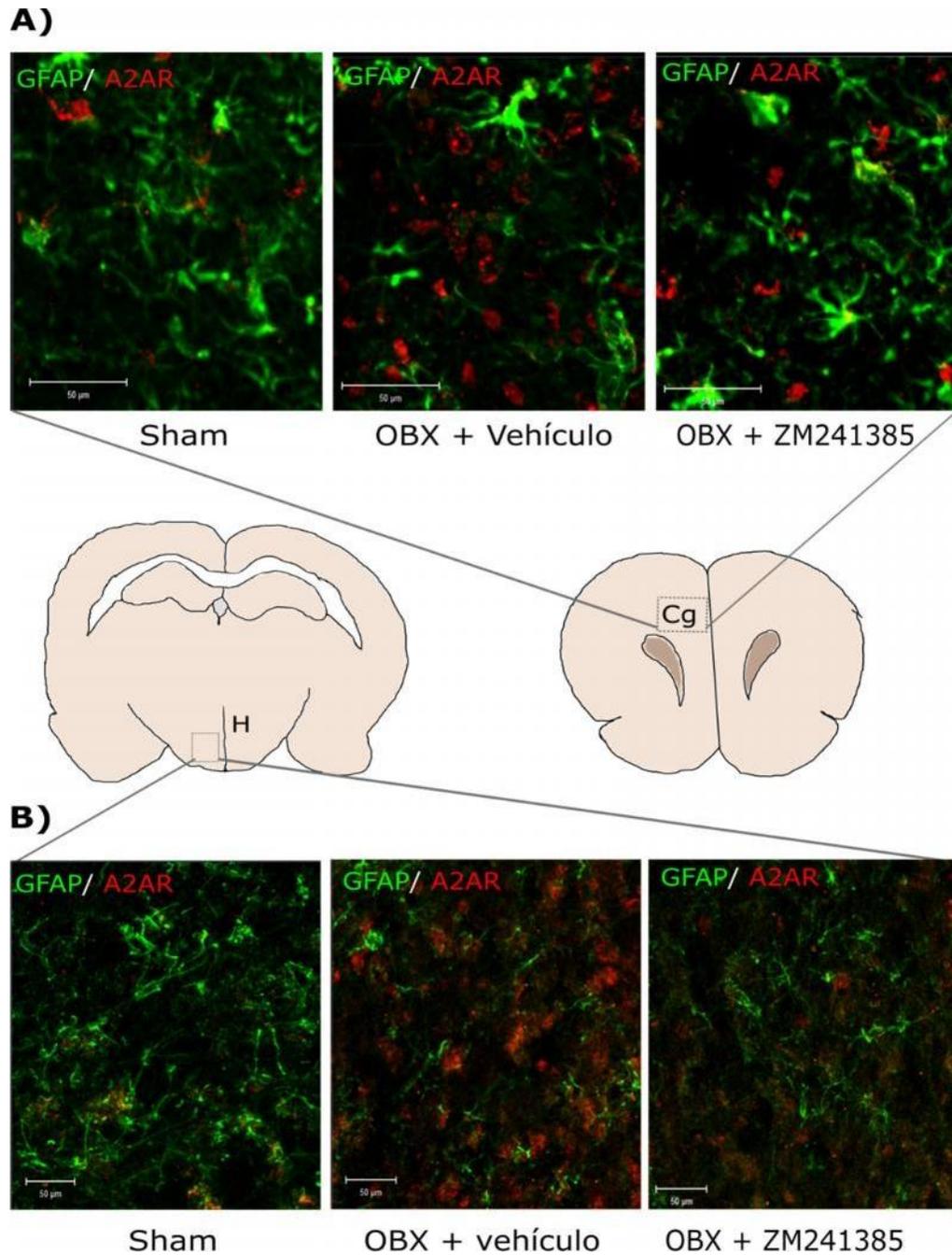


Figura 7.10 Distribución del receptor A2AR (rojo) y GFPA (verde) en (A) la corteza cingulada (cg) en la corteza prefrontal de las ratas control (Sham), las ratas deprimidas (OBX + Vehículo) y las ratas tratadas (OBX + ZM) así como en (B) el hipotálamo (H). Obsérvese la sobreexpresión de A2AR en ratas deprimidas en comparación con el grupo de control en ambas áreas cerebrales. Barra de escala 50μm.

7.6 El efecto de la administración de ZM sobre la expresión génica del receptor A2AR

Por último, se evaluó el efecto de la cirugía y el tratamiento con ZM sobre la expresión génica de la A2AR. Los resultados del grupo de vehículos OBX + muestran que la expresión de ARNm de A2AR, aumentó significativamente en el hipocampo y en PFC en comparación con el Sham ($p < 0,05$: Sham versus vehículo OBX +) (Figura 7.11B). La comparación entre el grupo OBX + DMSO y el grupo OBX + ZM muestra que el tratamiento ZM al grupo OBX disminuyó la expresión del ARNm del receptor A_{2A}, en comparación a la observada en el grupo Sham (Sham vs OBX + ZM: NS). También se observó que ni el grupo OBX + DMSO ni el grupo con tratamiento OBX + ZM ejercieron cambios en la expresión del ARNm del receptor A_{2A} de la amígdala y del hipotálamo (Figura 7.11B).

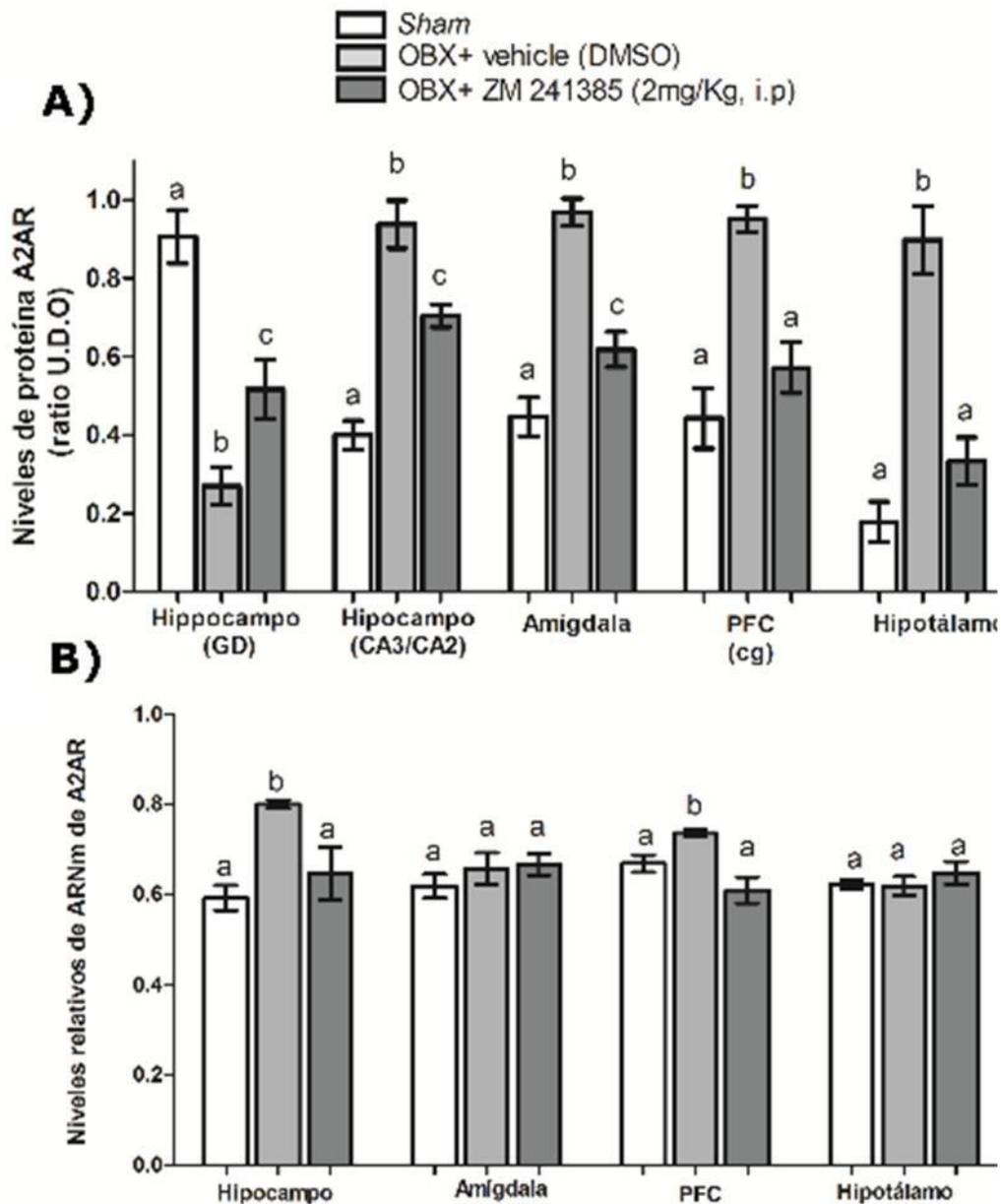


Figura 7.11 Cuantificación del receptor A_{2A} en diferentes estructuras cerebrales de rata. A) Densitometría de la expresión de la proteína A2AR entre ratas deprimidas (OBX + DMSO) y ratas tratadas con el antagonista ZM (OBX + ZM). Los análisis de densitometría se realizaron con n = 12 secciones, 3 ratas para cada grupo. B) Niveles de mRNA del gen que codifica para la proteína A2R, se muestran valores normalizados con el gen constitutivo de β -actina. Los valores se presentan como la media \pm DE. Las diferentes letras representan diferencias significativas (ANOVA bidireccional con la comparación *post hoc* de Tukey p <0,05).

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se comparó que ligando (agonista o antagonista) al receptor A2AR ejerce el efecto antidepresivo, debido a la controversia de trabajos previo. Para ellos, se buscó evaluar el posible efecto antidepresivo en modelos animales que cumpla los criterios esenciales para la validación de un modelo animal: validez aparente, de constructo y predictiva (Abelaira *et al.*, 2013). Por lo tanto, la evaluación del efecto antidepresivo de los ligandos ZM y adenosina se llevaron a cabo en el modelo animal bulbectomía OBX. Dos semanas posteriores a la cirugía, las ratas OBX mostraron una disminución significativa en el peso corporal en comparación con el grupo Sham, lo cual se asocia con la validación de constructo para el modelo de OBX (Abelaira *et al.*, 2013; Mucignat-Caretta *et al.* 2006). En las pruebas conductuales de nado forzado e ingesta de sacarosa, las OBX exhibieron cambios significativos de comportamiento mostrando un aumento en el tiempo de inmovilidad y con una disminución de la ingesta de sacarosa, lo cual es consistente con lo reportado para este modelo (Mucignat-Caretta *et al.*, 2006) (Hellweg *et al.*, 2007). Sin embargo, en la prueba de campo abierto, el grupo de OBX mostró un tiempo de deambulación, significativamente disminuido a diferencia de la hiperactividad reportada anteriormente para el modelo de OBX (Song y Leonard 2005). La reducción en la deambulación de las ratas OBX encontrada en este trabajo, podría estar asociada como un síntoma de fatiga, el cual ha sido reportado en pacientes con depresión mayor (Fava *et al.*, 2014).

En cuanto al cambio en peso observado por efecto de la administración de ZM o adenosina en las ratas OBX, se observó que solo el tratamiento con adenosina logró una recuperación de peso, dos semanas después su administración vía intraperitoneal. La recuperación en el peso corporal de las ratas tratadas con adenosina pudiera estar relacionado con la capacidad de ésta en modular los circuitos conductuales de alimentación a través de receptores A1 (Yang *et al.*, 2015). Si tomamos en cuenta que la adenosina es agonista no selectivo con mayor afinidad al receptor A1 y que ZM es un ligando selectivo para el receptor A_{2A}, entonces el efecto de adenosina en el

aumento de peso, podría estar más asociado con la regulación de la ingesta de alimentos que con un efecto antidepresivo. En contraste en la prueba de nado forzado, los resultados indicaron que sólo la administración crónica del antagonista ZM, tuvo efecto significativo en la reducción del tiempo de inmovilidad y un aumento en el tiempo de braceo. Los efectos anteriormente mencionados, sugieren un papel ZM tanto en vías noradrenérgicas como serotoninérgicas involucradas a las conductas observadas en la PNF (Castagné *et al.* 2011). Además, la recuperación de la conducta similar a la depresión observada en las ratas OBX + ZM, puede asociarse a una recuperación de la disminución de noradrenalina y de serotonina, causada por el modelo OBX (Song y Leonard, 2005). Es importante resaltar que la disfunción de señalización noradrenérgica ha sido asociado con comportamientos suicidas (Mahan y Ressler, 2012).

En la prueba de campo abierto, el tratamiento crónico con ZM ejerció un efecto ansiolítico debido a la disminución en la latencia de aislamiento de las ratas OBX + ZM, la cual se encuentra incrementada en la conducta de ansiedad, comparado con el grupo vehículo OBX+ DMSO. Trabajos previos reportan la participación del receptor A_{2A} en la inducción del síntoma parecido a la ansiedad en ratas, así como el efecto ansiolítico mediante el bloqueo farmacológico de dichos receptores (Wei *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2014). Por lo tanto en este trabajo, el bloqueo de los receptores A_{2A} con el tratamiento de ZM pudiera estar atenuando la hiperexcitabilidad de la amígdala basolateral (BLA) de las ratas OBX, como lo sugiere Rau *et al.* en el 2015. Por otro lado, la prueba de preferencia de sacarosa, mostró que la cirugía generó el síntoma de anhedonia en las ratas OBX el cual es uno de los principales criterios utilizados para el diagnóstico de la depresión (DSM-V). De manera notable, se observó que el tratamiento con ZM aumentó porcentaje de preferencia de sacarosa de las ratas OBX, el cual no mostró diferencia significativa, comparado con ingesta de sacarosa del grupo control Sham. Lo anterior sugiere el rol del receptor A_{2A} en la regulación del circuito dopaminérgico mesolímbico implicado en la toma de decisiones relacionadas con el sistema de recompensa (Yohn *et al.*, 2015). Así mismo, se ha reportado que las

neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) desempeñan un papel importante en comportamientos de recompensa como la depresión (Tye *et al.*, 2013). Debido a que los receptores A_{2A} pueden formar heterorreceptores con receptores dopaminérgicos D2 y D3 en las neuronas estriatales y en el núcleo accumbens puede ejercer su efecto anti-anhedónico, mediante la regulación de la señalización dopaminérgica en circuitos neuronales de recompensa.

En resumen, las pruebas conductuales de nado forzado, campo abierto e ingesta de sacarosa revelaron que la administración de ZM ejerció cambios significativos en recuperación de la conducta similar a la depresión en comparación con la administración de Adenosina. En este contexto, estudios previos han reportado el efecto antidepresivo tanto para el antagonista, así como el agonista para el receptor A_{2A} . Por ejemplo, El Yacoubi *et al.* en 2001 reportaron que una dosis única de ZM ejerce efectos antidepresivos en el modelo animal de nado forzado, mientras que el grupo Kaster *et al.* en el 2004 reporta la administración de adenosina con tal efecto. En ambos estudios, se utilizaron modelos animales de depresión agudos como el de nado forzado o la prueba de suspensión de cola; dichos modelos funcionan mediante el sometimiento de los animales a una situación de estrés aguda. Además, en ambos modelos, la administración del fármaco se lleva a cabo con una dosis y antes de las pruebas (Abelaira *et al.*, 2013). Se ha reportado que la falla en traslación de la investigación pre-clínica a la clínica, es debida en parte a la deficiencia validez de los animales utilizados como modelos de depresión mayor (Belzung, 2014). Por lo cual los resultados obtenidos en modelos animales agudos y / o crónicos pueden ser no consistentes. Sumado a lo anterior, estudios previos indican que la acción antidepresiva clínica requiere administración crónica para obtener resultados favorables y los modelos agudos solo permiten la evaluación de una sola dosis (Fava *et al.*, 2014). En este trabajo se implementó un modelo animal crónico de depresión por medio de la ablación de los bulbos olfatorios, en el cual los cambios de comportamiento inducidos por el modelo OBX sólo pueden ser revertidos por tratamientos antidepresivos crónicos y no tratamientos agudos (Abelaira *et al.*, 2013).

Por otra parte, hay que tomar en cuenta que las diferencias en los efectos encontrados por investigaciones como la de El Yacubi, Kaster y el presente trabajo, pueden deberse a las dosis administradas. Es decir, un fármaco con “posible efecto antidepresivo” puede ejercer dicho efecto en una aplicación única o en aplicación crónica; sin embargo la dosis administrada dependerá de si se efectúa en tratamiento agudo o un tratamiento crónico (Yamada *et al.*, 2014).

Con la finalidad de elucidar la interacción de ambos ligandos con el receptor A_{2A} y con ello ver su relación con los efectos a nivel conductual observados, se realizaron análisis de interacción ligando-proteína. Los estudios *in silico*, mostraron que la adenosina posee solo una orientación con la mayor probabilidad de interacción con el receptor, en cambio ZM reveló dos orientaciones posibles: ZM modo 1 y ZM modo 2. Los resultados anteriores en conjunto con el análisis de cavidades demuestran 3 cavidades principales. Ambos ligandos comparten la interacción con los residuos los aminoácidos Phe168 y Asn253. Lo cual es consistente con lo propuesto por Jaakola *et al.* en el 2008, en donde menciona que las interacciones - con la Phe168, así como las interacciones con el hidrógeno de la Asn253 son necesarios para el ligando pueda acoplarse al receptor A_{2A} . Por lo cual, estas interacciones juegan un papel crucial en la unión del ligando al receptor, pero no contribuye a la actividad “agonista” ni “antagonista” del receptor. En este sentido, estudios de mutagénesis dirigidas al sitio, indican que la actividad de la adenosina como agonista necesita las interacciones del grupo ribosa con los aminoácidos Val84, Thr88, His250, Ser277 y His278 del receptor A_{2A} (Ivanov *et al.*, 2009; Lebon *et al.*, 2011).

Los resultados mostraron que la interacción de la adenosina con el receptor A_{2A} es consistente con lo reportado por (Xu *et al.*, 2011). Sin embargo, los resultados de acoplamiento de ZM con el receptor A_{2A} arrojó que la posición de ZM modo 1, interactúa con los residuos de aminoácidos relacionados con la activación del receptor A_{2A} (Val84 y His278), mientras que ZM modo 2 interactúa con la cavidad antagonista

(Jaakola *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que el acoplamiento de ZM con el receptor, podría interactuar tanto con la cavidad agonista como la antagonista. Un estudio previo *in silico* reportó que los análogos de la vitamina D poseen dos modos de unión al receptor de vitamina D, lo cual sugiere un agonismo parcial por parte de estos (Anami *et al.* 2014). Tomando en cuenta los hallazgos encontrados, ZM podría ejercer un agonismo parcial. En condiciones fisiológicas, los niveles de adenosina (agonista endógeno de los receptores A_{2A}) oscila entre 30-200 nmol / L; sin embargo, en condiciones patológicas los niveles aumentan por encima de 1 mmol / L (Fredholm, 2014). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas la orientación de ZM modo 1 (interacciones con la cavidad agonista) pudiera ser favorecido. En contraste, en patologías como la depresión la orientación de ZM modo 2 pudiera ser la predominante. La hipótesis del agonismo parcial podría explicar los resultados polémicos respecto a qué ligando ejerce el efecto antidepresivo y con respecto al modelo animal utilizado. Sorprendentemente, los nuevos antidepresivos prometedores poseen un perfil agonista parcial (Zhang *et al.*, 2016).

Con la finalidad de validar del efecto antidepresivo por las interacciones de ZM con la cavidad antagonista en estudios posteriores, se propuso la modificación del ligando de ZM favoreciendo dicho como de unión. Los resultados del análisis de interacción proteína-ligando mostraron que las modificaciones de la cadena lateral de 4-hidroxifeniletilo, favorecen las interacciones de unión a la cavidad antagonistas. Cabe mencionar que un estudio reciente propone el diseño de agonistas no parecidos a la adenosina (sin la ribosa), en el cual se observa la activación del receptor, por la interacción con otros residuos diferentes al modo de unión de la adenosina (Lane *et al.*, 2012). Estos hallazgos justifican futuras investigaciones con modificaciones de ZM para estudiar sus efectos antidepresivos en modelos animales crónicos.

Para continuar con la investigación de los posibles mecanismos implicados en el efecto antidepresivo encontrado para el ligando ZM, se evaluaron aspectos moleculares en

el cerebro como: densidad neuronal, expresión y distribución del receptor A_{2A}, así como la expresión génica del receptor. En el presente estudio, se encontró que la cirugía OBX indujo una disminución en la densidad neuronal y en la densidad del receptor A_{2A} en el giro dentado del hipocampo. En contraste, en las regiones CA2 y CA3 del hipocampo se observó un aumento en la densidad de proteínas A_{2AR}, así como una mayor expresión génica en el hipocampo total. En la amígdala y el hipotálamo, mientras que la proteína A_{2AR} se incrementó, la expresión del gen 2A_{2R} permaneció sin cambios. En la corteza cingulada (Cg) se encontró un aumento de la proteína A_{2AR} y de los niveles de mRNA de A_{2AR} en la corteza prefrontal total. La reducción de la densidad neuronal en el hipocampo de ratas bulbectomizadas puede estar asociada al estrés por la condición de anosmia, así como, de los cambios neuroquímicos desarrollados por la cirugía. Previos estudios señalan que el estrés causa una disminución de la neurogénesis, en el hipocampo tanto en humanos como en ratas (Hanson *et al.*, 2011). Además, es importante resaltar que la modulación de la neurogénesis hipocampal adulta ha sido considerada como un elemento clave en los efectos terapéuticos con antidepresivos (Morais *et al.*, 2017).

En ratas adultas, se ha confirmado que la neurogénesis se produce sólo en bulbo olfatorio y en giro dentado (Gould, 2007), por lo que sugiere que la disminución de la neurogénesis en los animales OBX, puede deberse al aumento de los niveles séricos de corticosterona (Mucignat-Caretta *et al.*, 2006, Hanson *et al.*, 2011). Los modelos animales de depresión inducidos por factores fisiológicamente estresantes como la cirugía OBX o por factores socialmente estresantes, como el estrés crónico impredecible reportan una disminución de la tasa de proliferación neuronal y un aumento de la apoptosis (Hanson *et al.*, 2011). Horowitz y Zunszain (2015) sugieren que el TDM está vinculado con las disfunciones en el sistema endocrino, principalmente alteraciones en la retroalimentación el eje HPA y el hipocampo. Por lo tanto, los resultados pudieran asociar el aumento de corticosterona reportado en ratas OBX y la reducción en la densidad neuronal encontrada en este trabajo. De igual manera la investigación presentada por Morales-Medina *et al.* (2013) demuestra que

la neurogénesis del hipocampo adulto está comprometida en las ratas OBX, en donde se reporta una asociación de daño en la plasticidad hipocampal y el déficit de comportamiento emocional.

Un hallazgo interesante de este trabajo es el hecho de que la administración crónica de ZM ejerció un aumento en la densidad neuronal GD y podemos inferir que ZM bien podría promover la neurogénesis en el GD. Esta hipótesis es apoyada por el hallazgo de Kempermann *et al.* (2004), el cual señala que se requieren de 2-3 semanas para que las nuevas células neuronales expresen los marcadores de las neuronas maduras (NeuN). Los resultados de esta investigación indican que la administración por 14 días de ZM aumenta la densidad del marcador neuronal NeuN en el hipocampo de las ratas OBX. Aunado a esto, el grupo OBX + ZM también mostró cambios de comportamiento, los cuales mostraron la tendencia marcado por el grupo Sham en las pruebas conductuales, sugiriendo así una recuperación de la conducta similar a la depresión observada en las ratas OBX. Además, sería interesante considerar para futuras investigaciones si la activación del eje HPA también se normaliza mediante el tratamiento con ZM.

Por otro lado, la explicación al aumento de la densidad neuronal del grupo OBX + ZM pudiera estar relacionado al papel neuroprotector que se reporta para el bloqueo del receptor A_{2A} . Varios estudios describieron que el bloqueo farmacológico o la inactivación genética del receptor A_{2A} proporciona neuroprotección, con lo cual se reporta una mejora en la evolución de varias enfermedades neurodegenerativas, tales como como: lesión cerebral, Parkinson, epilepsia y depresión (Stockwell *et al.*, 2017; Etherington y Frenquelli, 2004, El Yacoubi *et al.*, 2003, Kaster *et al.*, 2015). En el caso particular de la depresión, el estudio de Minor y Hanff (2015) demostró que los antagonistas selectivos A_{1R} y A_{2BR} no revierten el comportamiento depresivo, mientras que tanto antagonistas selectivo como no selectivos del receptor A_{2A} , puede ejercer efecto antidepresivo en el modelo animal de depresión inducido por reserpina.

Cabe destacar que el bloqueo A2AR causa neuroprotección sólo en tratamientos prolongados más no así en una sola dosis (Cunha y Agostinho, 2010). Debido a que el rol neuroprotector de A2AR se ha asociado a su expresión en neuronas, se evaluó la localización de A2AR (Silva *et al.*, 2007; Cunha 2016). Estos resultados indican que la expresión de la proteína A_{2A} se detectó en células neuronales, lo que sugiere que el receptor puede estar involucrado en la neuroprotección del hipocampo. Sin embargo, considerando que la administración de ZM se realizó después de la cirugía OBX, la hipótesis de la neurogénesis inducida por ZM es más factible.

En cuanto a la sobreexpresión de A2AR observada en el hipocampo CA2 / CA3 de las ratas OBX, podría estar relacionada con un aumento de los niveles de adenosina (agonista A1R) como se ha observado durante la lesión cerebral, el estrés y el envejecimiento (Fredholm *et al.*, 2005; Stockwell *et al.*, 2017; Fredholm, 2014). Durante las condiciones fisiológicas, el A1R es capaz de inhibir la neurotoxicidad del hipocampo inducida por A2AR, pero bajo una prolongada activación de A1R se observa una regulación positiva de A2AR (Stockwell *et al.*, 2016). Debe observarse que la sobreexpresión de la proteína A2AR se exhibió en las regiones CA3 / CA2, mientras que en GD se encontró regulada negativamente. Una posible interpretación de esto podría relacionarse a que la región hipocampal CA3 como la primera afectada en un proceso de excitotoxicidad (Dudek y Sutula, 2007). Además, la administración de ZM en ratas OBX mostró una reducción significativa de la expresión de la proteína A2AR de CA3 / CA2, así como de su expresión génica. Estos resultados podrían estar asociados con el hecho de que el bloqueo del receptor A_{2A} revierte la hiper-excitabilidad del hipocampo restaurando así el eje HPA, como ha sido sugerido por el trabajo de Batalha *et al.* (2013) en el modelo de separación materna. Aparte de los cambios del encontrados en el hipocampo, en la amígdala de ratas bulbectomizadas también se encontró un aumento en la densidad de proteína A2AR, lo que es consistente con lo observado en la amígdala de pacientes deprimidos (Castrén, 2013). Además, Rau *et al.* (2015) indican que la activación del receptor A_{2A} aumenta la excitabilidad de la amígdala basolateral de la rata, la cual desempeña un papel importante en los

trastornos de ansiedad (Etkin *et al.*, 2009). También, Coelho *et al.* (2014) encontraron mayor comportamiento parecido a la ansiedad en ratas con sobreexpresión transgénica del receptor A_{2A}. Es importante observar que la sobre-expresión de la proteína A_{2A} en ratas OBX se redujo por la administración de ZM. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos por Simões *et al.*, (2016) en donde la administración del antagonista A_{2A} atenuó la memoria del miedo en modelos de miedo condicionado en ratas.

Otro hallazgo fue el aumento de la proteína A_{2A} en la corteza cingulada de las ratas OBX, la cual está implicada en la regulación automática de las emociones y ha sido reportada una hiper-actividad en pacientes con depresión mayor (Castrén, 2013, Kupfer *et al.*, 2012). La sobreexpresión de A_{2A} en Cg puede explicar el aumento a estímulos emocionales negativos en pacientes con trastornos depresivos mayores (Fales *et al.*, 2007). Además, el tratamiento con ZM también disminuyó los niveles de la densidad proteica y génica del receptor A_{2A} encontrados en el grupo OBX + DMSO. Este resultado coincide con los observados por Surget *et al.* (2009), quienes encontraron que el tratamiento con Fluoxentina invirtió cambios transcriptómicos inducidos por el modelo de estrés crónico impredecible. Por otro lado, se observó que la sobre-regulación del receptor A_{2A} en el hipotálamo de las ratas OBX podría relacionarse con la sobre-activación del eje HPA debido a la bulbectomía. También, un estudio previo por Ferré *et al.* (2007) señala el rol del receptor A_{2A} en el hipotálamo como regulador del sueño, por lo que la expresión de A_{2A} podría inducir trastornos del sueño como los observados en pacientes con depresión (Abelaira *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se ha reportado que la sobreexpresión hipotalámica A_{2A} provoca un comportamiento anti-hedónico en ratas, debido a una posible formación de heterorreceptores con los receptores dopaminérgicos D_{2R} causando daño neuronal de neuronas dopaminérgicas (Coelho *et al.*, 2014). Por lo tanto, las proyecciones hipotalámicas dopaminérgicas a la amígdala pueden también estar disfuncionales

(Pierce y Kumaresan 2006). Es importante señalar que, tanto en la amígdala como en el hipotálamo, el aumento de la densidad de la proteína A2AR se redujo mediante el tratamiento con ZM a pesar de que no había cambios en la expresión del gen A2AR. Esta discrepancia podría atribuirse a los mecanismos citosólicos de la proteína A2AR, por ejemplo: 1) la activación de vías no canónicas como la inducción de b-arrestina o proteasa-4 específica de ubiquitina; 2) la regulación negativa / desensibilización de la A2AR a través de CK2 (caseína cinasa 2), la cual ha sido propuesto recientemente (Stockwell *et al.*, 2017).

Tomados en conjunto, los resultados sugieren que el tratamiento con ZM podría restablecer la actividad basal del hipocampo permitiendo su control inhibitorio del eje HPA; por lo tanto, el eje HPA se regresa a condiciones fisiológicas y la sobreactivación del A2AR en el hipotálamo puede ser atenuada. En resumen, los cambios generales alentados por el tratamiento con ZM provocan una reducción de la sobreexpresión del receptor A2AR en el sistema mesocorticolímbico, que está implicado en la respuesta y el procesamiento emocional. El mecanismo posible es la restauración de la homeostasis sináptica, así como la neurogénesis. No obstante, es necesario investigaciones posteriores para elucidar el efecto del antagonismo A2AR, mediante la administración de ZM en áreas específicas del cerebro.

9. CONCLUSIONES

- La cirugía de Bulbectomía olfatoria bilateral ocasionó una disminución significativa en el peso corporal de las ratas, comparadas con las ratas *sham*.
- El grupo OBX + ZM 241385 no mostró recuperación del peso corporal comparado con el grupo OBX + Vehículo: DMSO. Por otro lado, el grupo OBX + Adenosina aumento el peso corporal de manera significativa comparado con el grupo OBX + vehículo: NaCl 0.9%.
- Las ratas OBX mostraron: aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, incremento en el tiempo de aislamiento en la prueba de campo abierto y una disminución en la preferencia de ingesta de sacarosa en comparación con las ratas *sham*.
- La administración del antagonista del receptor A_{2A} , ZM 241385, a ratas OBX durante 14 días, revirtió de manera significativa la conducta similar a la depresión observada en estas ratas en comparación con el grupo vehículo.
- La administración del agonista del receptor A_{2A} , adenosina, a ratas OBX por 14 días no mostró efecto significativo con el grupo vehículo en la recuperación de la conducta similar a la depresión.
- Los estudios *in silico* revelaron que el ligando ZM 241385 generó dos modos de unión principales con el receptor A_{2A} , en donde ambos *cluster* tuvieron la misma probabilidad de unión.
- Los estudios *in silico* revelaron que el ligando adenosina generó un solo modo de unión principal con receptor A_{2A} .

- El análisis de interacción ligando-proteína, reveló que ZM modo de unión 1 comparte los residuos de aminoácidos que participan en la “cavidad agonista”; mientras que ZM modo de unión 2 interactuó con los aminoácidos de la “cavidad antagonista” del receptor A_{2A}.
- La cirugía OBX indujo una disminución significativa en la densidad neuronal y en la densidad del receptor A_{2A} en el giro dentado del hipocampo. En contraste, en las regiones CA2 y CA3 del hipocampo, amígdala, corteza cingulada y del hipotálamo, se observó un aumento significativo de la proteína A_{2A}R en comparación con las ratas *sham*.
- Los niveles del gen que codifica para la proteína A_{2A}R permaneció sin cambios significativos en la amígdala y el hipotálamo de las ratas OBX en comparación con las *sham*. No obstante, en la corteza prefrontal e hipocampo se incrementó significativamente los niveles del mRNA del receptor A_{2A}.
- La administración de ZM 241385 a ratas OBX por 14 días, aumentó de manera significativa la densidad del marcador neuronal NeuN en el giro dentado comparado con las el grupo OBX + vehículo.
- El tratamiento con ZM 241385 a ratas OBX por 14 días redujo el aumento de la sobre-expresión del receptor A_{2A} observado en el grupo OBX + vehículo, en las siguientes estructuras: CA2/CA3 del hipocampo, amígdala y corteza cingulada.

10. REFERENCIAS

- Abelaira, H., Reus, G., and J. Quevedo. (2013). Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 35:S112–S120.
- Agüero J. (1997). *La depresión y el reverso de la psiquiatría*. 5ta edición. Paidós.
- Alarcón, R. D. (1991). Hacia el DSM-IV: historia reciente, estado actual y opciones futuras. *Acta psiquiátr. psicol. Am. Lat*, 37(2), 105-8.
- Albert, P.R., and C. Benkelfat. (2013). The neurobiology of depression--revisiting the serotonin hypothesis. II. Genetic, epigenetic and clinical studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368(1615):2012-2035.
- Al-Rahbi, B., Zakaria, R., Othman, Z., Hassan, A., Muthuraju, S., and W.N. Wan, Mohammad.(2013). Mood and memory function in ovariectomised rats exposed to social instability stress. *Biomed Res Int*. 249:36-43.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*. Arlington, VA, American Psychiatric Association.
- Anami, Y. Itoh T, Egawa D, Yoshimoto N, Yamamoto K. (2014). A mixed population of antagonist and agonist binding conformers in a single crystal explains partial agonism against vitamin D receptor: active vitamin D analogues with 22 R-alkyl group. *Journal of medicinal chemistry*, 57(10), pp.4351–4367.
- Andrews, G., Anderson, T.M, and T. Slade. (2008). Classification of anxiety and depressive disorders: problems and solutions. *Depression and Anxiety*. 25:274–281.
- Anisman. H., Du, L., Palkovits, M., Faludi, G., Kovacs, G.G., Szontagh-Kishazi, P.,Merali, Z., Poulter, M.O. (2008). Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects. *J Psychiatry Neurosci*.33:131–141.
- Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*. 475(7354):91–95.
- Baroja-mazo, A., Barberà-cremades, M. and Pelegrín, P. (2013). *Biochimica et Biophysica Acta* The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *BBA - Biomembranes*, 1828(1), pp.79–93.

- Batalha, V., Pego JM, Fontinha BM, Costenla AR, Valadas JS, Baqi Y, Radjainia H, Müller CE, Sebastião AM, Lopes LV. (2013). Adenosine A 2A receptor blockade reverts hippocampal stress-induced deficits and restores corticosterone circadian oscillation. *Molecular psychiatry*, 18(3), pp.320–331.
- Belzung, C. (2014). Innovative Drugs to Treat Depression: Did Animal Models Fail to Be Predictive or Did Clinical Trials Fail to Detect Effects and quest. *Neuropsychopharmacology*, 39(5), pp.1041–1051.
- Bhatt, S., Mahesh, R., Devadoss, T., and A.K. Jindal. (2013). Antidepressant-like effect of novel 5-HT₃ receptor antagonist N-n-butyl-3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamide (6p): an approach using rodent behavioral antidepressant tests. *Indian J Pharmacol*: 45(4):348-53.
- Blows, W.T. (2000). Neurotransmitters of the brain: serotonin, noradrenaline (norepinephrine), and dopamine. *J Neurosci Nurs*.32 (4):234-8.
- Boucher, A.A., Arnold, J.C., Hunt, G.E., and A. Spiro. (2011). Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience*, 189: 170-7.
- Bouwman, L., Te, Molder, H., and G. Hiddink. (2006). Patients, evidence and genes: an exploration of GPs' perspectives on gene-based. *Am Pract*. 25(1):i116-22. British Psychological Society. 2010. *Depression: The Treatment and Management of Depression in Adults (Updated Edition)*.
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci*. 64:1471–1483.
- Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7: 575-90.
- Burnstock, G. and G.E. Knight. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol*. 240:31–304.
- Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M.P., and P. Illes. (2011). Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol.*, 95(2):229-74.
- Cash-Padgett, T., and H, Jaaro-Peled. (2013). DISC1 mouse models as a tool to decipher gene-environment interactions in psychiatric disorders. *Front Behav*

- Neurosci; 3:7:113.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., and R. Poulton. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*: 301(5631): 386-389.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., and R. Poulton. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*; 301(5631): 386-389.
- Cassano. P., and M. Fava., (2002). Depression and public health: an overview. *Journal of Psychosomatic Research*; 53:849–857.
- Castagné, V., Moser P., Roux S., Porsolt RD. (2011). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci*, 55(8.10), pp.11–18.
- Castrén, E. (2013). Neuronal Network Plasticity and Recovery from Depression. *JAMA Psychiatry*, 70(9):983-9.
- Chinchilla, A. (2004). *Abordaje práctico de la depresión en atención primaria*. Elsevier España.
- Chinchilla, A. (2008). *La Depresión y sus Máscaras*. Ed. Médica Panamericana.
- Coelho, J.E., Alves P, Canas PM, Valadas JS, Shmidt T, Batalha VL, Ferreira DG, Ribeiro JA, Bader M, Cunha RA, do Couto FS, Lopes LV. (2014). Overexpression of adenosine A2A receptors in rats: Effects on depression, locomotion, and anxiety. *Frontiers in Psychiatry*, 13;5:67.
- Cole, R., and P. Sawchenko. (2002). Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 22 (3):959–969.
- Crema, L., Pettenuzzo, M., Schlabit, M., Diehl, L., Hoppe, J., Laureano, D., Salbego, C., Dalmaz, C., D. Vendite. (2013). The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A1 and striatal A2A adenosine receptors. *Physiology and Behavior*, 109. 1–7.
- Cunha, R.A. and Agostinho, P.M. (2010). Chronic Caffeine Consumption Prevents

- Memory Disturbance in Different Animal Models of Memory Decline. *J Alzheimers Dis*;20 Suppl 1:S95-116.
- Cunha, R.A., 2016. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry*, 139, pp.1019–1055.
- Cunha, R.A., Ferré, S., Vaugeois, J.M., and J.F.Chen. (2008). Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des*, 14 (15):1512-24.
- Dudek, F.E. and Sutula, T.P. (2007). Epileptogenesis in the dentate gyrus : a critical perspective. *Prog Brain Res*;163:755-73.
- Dunwiddie, T. V., and S. A. Masino. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci*, 24, 31–55.
- Dwivedi, Y. (2012). *The Neurobiological Basis of Suicide*. CRC Press; 2012.
- El Yacoubi, M, Costentin, J., and J.M. Vaugeois. (2003). Adenosine A2A receptors and depression *Neurology*, 9; 61(11 Suppl 6):S82-7.
- El Yacoubi, M. Ledent C, Parmentier M, Bertorelli R, Ongini E, Costentin J, Vaugeois JM. (2001). Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *British journal of pharmacology*, 134(1), pp.68–77.
- Epstein J, Pan H, Kocsis JH, et al. Lack of ventral striatal response to positive stimuli in depressed versus normal subjects. (2006). *Am J Psychiatry* 2006, 163: 1784–90.
- Erhardt, A., Lucae, S., Unschuld, P.G., Ising, M., Kern, N., Salyakina, D., Lieb, R., Uhr, M., Binder, E.B., Keck, M.E., Muller-Myhsok, B., and F. Holsboer., (2007). Association of polymorphisms in P2RX7 and CaMKKb with anxiety disorders. *J. Affect.Disord*, 101: pp. 159–168.
- Escobar, A. (2004). Neurobiología de la depresión. En: Velazquez Moctezuma J, Ed. *Temas selectos de Neurociencias III*. UNAM. México, 181-190.
- Etherington, L. V and Frenguelli, B.G. (2004). Endogenous adenosine modulates epileptiform activity in rat hippocampus in a receptor subtype-dependent manner. *Eur J Neurosci*;19(9):2539-50.
- Fabbri, C., Di, Girolamo, G., and A.Serretti. (2013). Pharmacogenetics of

- antidepressant drugs: an update after almost 20 years of research. *Am J Med Genet Neuropsychiatr*, 162B (6):487-520.
- Fales, C. Barch DM, Rundle MM, Mintun MA, Snyder AZ, Cohen JD, Mathews J, Sheline YI. (2007). Altered emotional interference processing in affective and cognitive-control brain circuitry in major depression. *Radiology*, 34(2), pp.733–742.
- Fava, M. Ball S, Nelson JC, Sparks J, Konechnik T, Classi P, Dube S, Thase ME. (2014). Clinical relevance of fatigue as a residual symptom in major depressive disorder. *Depression and anxiety*, 31(3), pp.250–257.
- Ferré, S. Diamond I, Goldberg SR, Yao L, Hourani SM, Huang ZL, Urade Y, Kitchen I. (2007). Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry. Implications for drug addiction, sleep and pain. *Progress in Neurobiology*, 83(5), pp.332–347.
- Fitzgerald, P.B., Laird, A.R., Allen, J., and Z.J. Daskalakis. (2008). A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Hum Brain Mapp*; 29: 683–95.
- Flint, J., and K.S. Kendler. (2014). The genetics of major depression. *Neuron*. 81(3):484-503.
- Fredholm, B.B. (2014). Adenosine — a physiological or pathophysiological agent? *JMolMed*. 92: 201–206.
- Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P. (2005) and J.M. Vaugeois., Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol*; 63:191-270.
- García, C. E., and A.S. Sánchez. (2001). Clasificaciones de la OMS sobre discapacidad. *Boletín del RPD*, 50, 15-30.
- Gold, P., Goodwin, F., Chrousos, G. (1988). Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to neurobiology of stress. *N Engl J Med* 319: 348 -353.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals?. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jun;8(6):481-8.pp.481–488.
- Guadarrama, L., Escobar, A., and L.Zhang. (2006). Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión. *Rev Fac Med UNAM*.49(2):62-72.
- Guyton and Hall, J.E. (2011). *Tratado de fisiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- Hanson, N.D., Owens, M.J. and Nemeroff, C.B. (2011). Depression , Antidepressants , and Neurogenesis : A Critical Reappraisal. *Neuropsychopharmacology*, 36(13),

pp.2589–2602.

- Hellweg, R., Zueger M., Fink K., Hörtnagl H., Gass P. (2007). Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiology of disease*, 25(1), pp.1–7.
- Heninger, G. R., Delgado, P. L., Charney, D. S. (1996). The revised monoamine theory of depression: A modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*.29:2–11.
- Homberg, J.R., Molteni, R., Calabrese, F., and M.A. Riva. (2014). The serotonin-BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*.3(43C):35-47.
- Horowitz, M.A. and Zunszain, P.A. (2015). Neuroimmune and neuroendocrine abnormalities in depression : two sides of the same coin. , 1351, pp.68–79.
- Ingram, R.E. (2009). *The International Encyclopedia of Depression*. Springer Publishing Company.
- Ivanov, A.A., Barak, D. and Jacobson, K.A. (2009). Evaluation of homology modeling of G-protein-coupled receptors in light of the A2A adenosine receptor crystallographic structure. *Journal of medicinal chemistry*, 52(10), pp.3284–3292.
- Jaakola, V.-P. Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*, 322(5905), pp.1211–1217.
- Jaakola, V.-P. Lane JR, Lin JY, Katriitch V, Ijzerman AP, Stevens RC. (2010). Ligand Binding and Subtype Selectivity of the Human A2A Adenosine Receptor identification and characterization of essential amino acid residues. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), pp.13032–13044.
- Jacobson, J., and A. Jacobson. (2002). *Secretos de la psiquiatría*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2da Edición.
- Kaster M,P, Machado NJ, Silva HB, Nunes A, Ardais AP, Santana M,et al., (2015). Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23;112(25):7833-8.
- Kaster, M.P. et al., (2004). Adenosine administration produces an antidepressant-like

- effect in mice: evidence for the involvement of A₁ and A_{2A} receptors. *Neuroscience letters*, 355(1), pp.21–24.
- Kempermann, G. Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27(8):447-52.
- Kessler, R.C., Angermeyer, M., Anthony, J.C.(2007). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry.* 6: 168–76.
- Krishnan, V., and E.J. Nestler. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 455:894-902.
- Kukulski, F., Sevigny, J., Komoszynski, M. (2004). Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Res.* 1030, 49–56.
- Kupfer, D., Frank, E., and M. Phillips. (2012). Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet.* 379(9820):1045-55
- Lane, J.R. Klein Herenbrink C, van Westen GJ, Spoorendonk JA, Hoffmann C, IJzerman AP. (2012). A novel nonribose agonist, LUF5834, engages residues that are distinct from those of adenosine-like ligands to activate the adenosine A_{2A} receptor. *Molecular pharmacology*, 81(3), pp.475–487.
- Lebon, G. Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AG, Tate CG. (2011). Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*, 474(7352), pp.521–525.
- Lee, S.H., Ripke, S., Neale, B.M., Faraone, S.V., Purcell, S.M., Perlis, R.H., Mowry, B.J., Thapar, A, Goddard, M.E., and J.S Witte. (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat. Genet.*45:984–994.
- Levinson, D., (2006). The Genetics of depression: A Review. *Biol Psychiatry.* 15;60(2):84-92.
- López-Muñoz, (2011). Neurobiological background for the development of new drugs in schizophrenia. *Clinical Neuropharmacology.* 111-126.
- Lubke, G.H., Hottenga, J.J., Walters, R., Laurin, C., de Geus E.J., Willemsen, G., Smit,

- J.H., Middeldorp, C.M., Penninx, B.W., Vink, J.M, and D.I. Boomsma. (2012). Estimating the genetic variance of major depressive disorder due to all single nucleotide polymorphisms. *Biol. Psychiatry*. 2012; 72:707–709.
- Machado-Vieria, V. R., and Zarate, C.A. Jr. (2011). Proof of Concept Trials in Bipolar Disorder and Major Depressive Disorder: A Translational Perspective in the Search for Improved Treatments. *Depress Anxiety*. 28(4). 267–281.
- Machado-Vieria, V.R., Salvadore, G., Díaz, G.N., Ibrahim, L., Latov, D., Wheeler-Castillo, C., Baumann, J., Ioline, D., and Zarate C.A Jr., (2010). New Therapeutic Targets for Mood Disorders. *Scientific World Journal*. 10. 713–726.
- Maes, M., Bosmans, E. De Jongh, R., Kenis, G., Vandoolaeghe, E. and H. Neels., (1997). Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 9, 853-858.
- Mahan, A.L. and Ressler, K.J. (2012). Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends in neurosciences*, 35(1), pp.24–35.
- Mathers, CD., and D. Loncar. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442.
- Melia, K.R., Nestler, E.J., and R.S. Duman. (1992). Chronic imipramine treatment normalizes levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of chronically stressed rats. *Psychopharmacology*. 108:1–2. 23–26.
- Minor, T.R., Hanff TC2. (2015). Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. *Behav Brain Res*. 286:184-91.
- Morais, M. et al., (2017). The modulation of adult neuroplasticity is involved in the mood-improving actions of atypical antipsychotics in an animal model of depression. *Nature Publishing Group*, pp.1–9.
- Morales-Medina JC1, Juarez I, Venancio-García E, Cabrera SN, Menard C, Yu W, Flores G, Mechawar N, Quirion R. (2013). Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience*. 16;236:233-43
- Moreau, J.L., Borgulya, J., Jenck, F., and J.R. Martin. (1994). Tolcapone: a potential new antidepressant detected in a novel animal model of depression. *Behav*

- Pharmacol. 5(3):344-350.
- Moussavi, S., Chatterji, S., and E. Verdes. (2007). Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*.370:851–858.
- Mucignat-Caretta, C., Bondi, M. and Caretta, A. (2006). Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. *Physiology and behavior*, 89(5), pp.637–643.
- Mutlu, O., Gumuslu, E., Guner, U., Komsuoglu I., Celikyurt, M.H., Randall P.A. A., Nunes, E.J., Simone, L., et al., (2012). Stimulant effects of adenosine antagonists on operant behavior: differential actions of selective A2A and A1 antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. 216(2): 173–186.
- Nishizaki, T. (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine stimulates glutamate release from astrocytes via A2a adenosine receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 100–102.
- North, R. A., and A. Verkhratsky. (2006). Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch.* 452:479–485.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., and R.A.North. (2007). Quantal release of ATP in mouse cortex. *J. Gen. Physiol.* 129:257–265.
- Pavcovich, L.A., Cancela, L.M., Volosin, M., Molina, V.A., and O.A. Ramirez. (1990). Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. *Brain Research Bulletin*. 1990;24(2):293–296.
- Philips, M.L., Ladouceur, C.D., and W.C. Drevets. (2008). A neural model of voluntary and automatic emotion regulation: implications for understanding the pathophysiology and neurodevelopment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 13: 833–57.
- Pierce, R.C. and Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), pp.215–238.
- Purves, D., Augustine. G.J., and D. Fitzpatrick. (2001). *Neuroscience*. Sinauer Associates. 2nd edition. 2001.
- Rau, A.R., Ariwodola, O.J. and Weiner, J.L., (2015). Postsynaptic adenosine A2A receptors modulate intrinsic excitability of pyramidal cells in the rat basolateral

- amygdala. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, p.pyv017.
- Rinwa, P1. Kumar, A., and S. Garg. (2013). Suppression of neuroinflammatory and apoptotic signaling cascade by curcumin alone and in combination with piperine in rat model of olfactory bulbectomy induced depression. *PLoS One*. 17;8(4):e61052.
- Sarason, I.G., and B.R. Sarason (2006). *Psicopatología: psicología anormal: el problema de la conducta inadaptada*. Pearson Educación.
- Schramm, E., van Calker, D. and P. Dykierek. (2007). An intensive treatment program of interpersonal psychotherapy plus pharmacotherapy for depressed inpatients: acute and long-term results. *Am J Psychiatry*. 164: 768–777.
- Serby, M., and M. Yu. (2003). Overview: depression in the elderly. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 70:38–44.
- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. (1999). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven. 6th edition.
- Silva, C.G. Porciúncula LO, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. (2007). Blockade of adenosine A_{2A} receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*. 2007 Aug;27(2):182-9.
- Simões, A.P. Machado NJ, Gonçalves N, Kaster MP, Simões AT, Nunes A, Pereira de Almeida L, Goosens KA, Rial D, Cunha RA. (2016). Adenosine A_{2A} receptors in the amygdala control synaptic plasticity and contextual fear memory. *Neuropharmacology*, 41(12):2862-2871.
- Slavich, G., and Irwin, M. (2014). From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression. *Psychol Bull*. 140(3): 774–815.
- Soares, J.C., J.J. Mann. (1997). The functional neuroanatomy of mood disorders. *J Psychiatr Res*. 1997; 31: 393-432.
- Song, C. and B.E. Leonard. (2005). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 627–647.
- Soronen, P., Mantere, O., Melartin, T., Suominen, K., and M. Vuorilehto. (2011). P2RX7 gene is associated consistently with mood disorders and predicts clinical outcome in three clinical cohorts. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B:435-447?
- Sperlagh, B., Csolle, C., Ando, R.D., Goloncser, F., Kittel, A., and M. Baranyi. (2012).

- The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol Hung.* 14 (4):231-8.
- Stockwell, J., Jakova, E. and Cayabyab, F.S. (2017). Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules.* 2017 Apr 23;22(4). pii: E676.
- Surget, A. Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C. (2008). Drug-Dependent Requirement of Hippocampal Neurogenesis in a Model of Depression and of Antidepressant Reversal. *Biol Psychiatry.* 2008 Aug 15;64(4):293-301.
- Swiny, J.D., O'Farrell, E., Bingham, B.C. (2010). Neonatal rearing conditions distinctly shape locus coeruleus neuronal activity, dendritic arborization, and sensitivity to corticotrophin-releasing factor. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(4):515–525.
- Trivedi, M.H., and E.J. Daly. (2008). Treatment strategies to improve and sustain remission in major depressive disorder. *Dialogues Clin Neurosci.* 10(4):377-84.
- Trivedi, M.H., Rush, A.J., Wisniewski, S.R. (2006). Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry.* 163(1):28–40.
- Tye, S.J., Miller, A.D. and Blaha, C.D. (2013). Ventral tegmental ionotropic glutamate receptor stimulation of nucleus accumbens tonic dopamine efflux blunts hindbrain-evoked phasic neurotransmission: implications for dopamine dysregulation disorders. *Neuroscience*, 252, pp.337–345.
- Valentino, R.J., Rudoy, C., Saunders, A., Liu, X.B., and E.J. Van Bockstaele. (2001). Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. *Neuroscience*, 106(2):375–384.
- Valentino, RJ, and E. Van Bockstaele. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European Journal of Pharmacology*, 583:2–3. 194–203.
- Vázquez, C., and F. Jiménez. (2000). Depresión y manía. En: Bulbena A, Berrios G, Fernández de Larrinoa P (eds). *Medición clínica en psiquiatría y psicología.*

Barcelona: Masson S.A. p 265: 288-290

- Wei, C.J. Augusto E., Gomes CA, Singer P, Wang Y, Boison D, Cunha RA, Yee BK, Chen JF. (2014). Regulation of fear responses by striatal and extrastriatal adenosine A_{2A} receptors in forebrain. *Biological psychiatry*, 75(11), pp.855–863.
- Woodson, J.C., Minor, T.R., and R.F. Job. (1998). Inhibition of adenosine Deaminase by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) mimics the effect of inescapable shock on escape learning in rats. *Behav. Neurosci.*, 112 : pp. 399-409.
- Xu, F. Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, Cherezov V, Stevens RC. (2011). Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science*, 332(6027), pp.322–327.
- Yamada, K., Kobayashi, M. and Kanda, T. (2014). Involvement of adenosine A_{2A} receptors in depression and anxiety. *Int Rev Neurobiol*, 119, pp.373–393.
- Yamada, K., Kobayashi, M., Shiozaki, S., et al., (2014). Antidepressant activity of the adenosine A_{2A} receptor antagonist, istradefylline (KW-6002) on learned helplessness in rats. *Psychopharmacology*, 231(14), pp.2839–2849.
- Yang, T. Gao X, Sandberg M, Zollbrecht C, Zhang XM, Hezel M, Liu M, Peleli M, Lai EY, et al., (2015). Abrogation of adenosine A₁ receptor signalling improves metabolic regulation in mice by modulating oxidative stress and inflammatory responses. *Diabetologia*, 58(7), pp.1610–1620.
- Yohn, S.E. Thompson C, Randall PA, Lee CA, Müller CE, Baqi Y, Correa M, Salamone JD. (2015). The VMAT-2 inhibitor tetrabenazine alters effort-related decision making as measured by the T-maze barrier choice task: reversal with the adenosine A_{2A} antagonist MSX-3 and the catecholamine uptake blocker bupropion. *Psychopharmacology*, 232(7), pp.1313–1323.
- Zhang, L., Su, T.P., Choi, K., Maree, W., and C.T. Li., (2011). P11(S100A10) as a potential biomarker of psychiatric patients at risk of suicide. *J Psychiatr Res*, 45: 435-441.
- Zhang, L.Wang XY, Zhao N, Wang YL,3, Hu XX, Ran YH1, Liu YQ, et al., (2016). Neurochemical and behavioral effects of hypidone hydrochloride (YL-0919): A novel combined selective serotonin reuptake inhibitor and partial 5-HT_{1A} agonist. *Br J Pharmacol*. 174(9):769-780.

Zimmerman, M.P., and M.A. Chelminski., (2005). Is the cutoff to define remission on the Hamilton Rating Scale for Depression too high? *J Nerv Ment Dis*, 193(3):170-5.