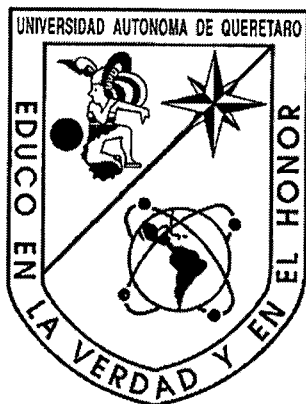


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



EL ZINC Y LOS ANTIDEPRESIVOS MODULAN A LOS
RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES Y FAVORECEN LAS
TERAPIAS ANTIDEPRESIVAS

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
TÍTULO DE LICENCIADO EN

PSICOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:
MARÍA ELIZABETH VÁZQUEZ GÓMEZ

DIRIGIDA POR:
DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO.-MÉXICO
2004

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. F-#696717

No. Título _____

Clas. TS

616.8527

V 393z



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

EL ZINC Y LOS ANTIDEPRESIVOS MODULAN A LOS RECEPTORES
NICOTÍNICOS NEURONALES Y FAVORECEN LAS TERAPIAS ANTIDEPRESIVAS

TESIS
QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN

PSICOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:
MARÍA ELIZABETH VÁZQUEZ GÓMEZ

DIRIGIDA POR:
DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

VOTOS APROBATORIOS

Dr. Marco Alonso Gallegos Corona
Presidente

Firma

Dr. Carlos Germán Barraza
Secretario

Firma

Dr. José Jesús García Colunga
Vocal

Firma

Dra. Gina Lorena Quirarte
Suplente

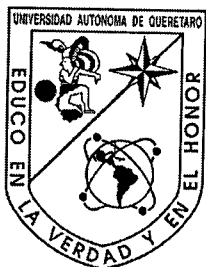
Firma

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Suplente

Firma

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO. QRO.-MÉXICO
2004

INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Universidad autónoma de Querétaro



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Psicología

El Zinc y los Antidepresivos Modulan a los Receptores Nicotínicos Neuronales y Favorecen las Terapias Antidepresivas

Investigadora: María Elizabeth Vázquez Gómez

Director de Tesis: José Jesús García Colunga

Santiago de Querétaro, Qro. Agosto de 2004

ÍNDICE GENERAL

I. ABREVIATURAS.....	9
II. RESUMEN.....	10
III. INTRODUCCIÓN.....	11
III.1 HISTORIA DE LA MELANCOLÍA Y LA DEPRESIÓN.....	11
III.2 LA DEPRESIÓN DESDE UN PUNTO DE VISTA PSIQUÁTRICO.....	18
III.2.1 Definición y formas de la depresión.....	18
III.2.1.1 Depresión unipolar.....	19
III.2.1.2 Depresión bipolar.....	20
III.2.1.3 Depresión somatizante.....	21
III.2.1.4 Factores genéticos en la depresión.....	22
III.3 BASES BIOLÓGICAS DE LA DEPRESIÓN.....	22
III.3.1 Sistema nervioso y la sinapsis.....	22
III.3.2 Neurotransmisores y la depresión	29
III.3.2.1 Serotonina.....	31
III.3.2.2 Noradrenalina.....	31
III.3.2.3 Dopamina.....	31
III.3.2.4 Acetilcolina.....	33
III.4 TRATAMIENTOS DE LA DEPRESIÓN.....	35
III.4.1 Tratamiento farmacológico.....	35
III.4.2 Efectos adversos de los antidepresivos.....	39
III.4.3 Tratamiento electroconvulsivo.....	42
III.5 RECEPTORES PARA ACETILCOLINA NICOTÍNICOS.....	43

III.5.1 Subtipos de receptores nicotínicos.....	46
III.5.2 Estructura molecular de los receptores nicotínicos.....	47
III.5.3 Estados funcionales de los receptores nicotínicos.....	48
III.5.4 Papel funcional de los receptores nicotínicos.....	50
III.6 ZINC.....	53
III.6.1 La neurobiología del zinc.....	53
III.6.2 Zinc y depresión.....	54
III.6.3 Zinc y receptores nicotínicos.....	56
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	56
V. HIPÓTESIS.....	59
VI. OBJETIVOS.....	59
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	60
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
VIII.1 Bacterias competentes.....	61
VIII.2 Transformación de bacterias.....	62
VIII.3 Multiplicación del plásmido.....	62
VIII.4 Detección de DNA en geles de agarosa.....	63
VIII.5 Purificación de DNA.....	64
VIII.6 Cuantificación del DNA.....	66
VIII.7 Linearización con enzimas de restricción	67
VIII.8 Purificación de DNA con fenol-cloroformo.....	68
VIII.9 Transcripción <i>in vitro</i>	69
VIII.10 Purificación de RNA con fenol-cloroformo.....	70
VIII.11 Cuantificación del transcrito.....	71

VIII.12 Disección de la rana y microinyección de ovocitos	72
VIII.13 Registro electrofisiológico.....	73
IX. RESULTADOS.....	74
IX.1 Corrientes control activadas con AcCo.....	74
IX.2 Modo de evaluación de las sustancias de estudio.....	76
IX.3 Formas de aplicación de las sustancias.....	78
IX.4 Acciones combinadas de Zn^{2+} y fluoxetina sobre R-nic.....	78
IX.5 Acciones combinadas de Zn^{2+} y otros antidepresivos sobre R-nic.....	80
IX.6 Efectos en función del voltaje de Zn^{2+} y fluoxetina en R-nic	84
X. DISCUSIÓN.....	87
XI. CONCLUSIONES.....	92
XII. ANEXO. Preparación de Soluciones.....	94
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	97

I. ABREVIATURAS

Acetilcolina	AcCo
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico	RNA
Antidepresivos	AD
Dopamina	DA
Noradrenalina	NA
Receptores nicotínicos	R-nic
RNA mensajero	RNAm
Serotonina	5-HT
Tratamiento Electroconvulsivo	TEC
Zinc	Zn ²⁺

II. RESUMEN

Los receptores nicotínicos (R-nic) son proteínas transmembranales que se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo. Los R-nic en el sistema nervioso central se localizan de manera presináptica, modulando la liberación de neurotransmisores como glutamato, serotonina, noradrenalina, dopamina, acetilcolina (AcCo) y ácido gama-aminobutírico.

Se sabe que los fármacos para el tratamiento de la depresión actúan comúnmente sobre los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico. Sin embargo, otro efecto común de los antidepresivos (imipramina, fluoxetina, sertralina, paroxetina, nefazodona, nixotina, citalopram) es inhibir a los R-nic. También el Zn^{2+} , elemento traza, abundante en el tejido nervioso donde forma parte de múltiples enzimas y proteínas estructurales, modula los R-nic neuronales; además de jugar un papel importante en los estados depresivos. Por ejemplo, la concentración de Zn^{2+} en el suero de pacientes con depresión está reducida y después de una terapia antidepresiva exitosa regresa a su valor normal.

En el presente trabajo estudiamos la modulación de los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$ por Zn^{2+} y antidepresivos. Realizamos un análisis comparativo del bloqueo y/o potenciación del zinc y antidepresivos (fluoxetina, imipramina y trimipramina) sobre la corriente activada con AcCo. Así como también proponemos un posible mecanismo de acción de la combinación de Zn^{2+} y antidepresivos sobre los R-nic.

Para realizar estos estudios la metodología consistió en obtener material genético (DNA y RNA) a partir de los clones que codifican para las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 4$ de los R-nic neuronales. Los plásmidos que contienen estas subunidades se incubaron en medio líquido. El DNA se purificó, linearizó y transcribió para obtener el RNA, el cual se inyectó en ovocitos de ranas *Xenopus laevis*. Se registraron las corrientes de membrana inducidas con AcCo, utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

Los resultados del presente estudio muestran que las corrientes inducidas con AcCo, generadas por la activación de los R-nic $\alpha 4\beta 4$, son moduladas por antidepresivos y por Zn^{2+} y esta modulación depende del orden de aplicación de dichas sustancias. Así, el orden de inhibición de los R-nic por los antidepresivos fue: fluoxetina > imipramina > trimipramina. Mientras que el orden de potenciación de los R-nic por zinc fue: imipramina > trimipramina > fluoxetina. Al combinar los antidepresivos y el Zn^{2+} se observó que la modulación depende del orden de aplicación de estas sustancias.

Además, apoyándose en la hipótesis más aceptada de la etiología de la depresión, que postula una deficiencia de monoaminas (serotonina, noradrenalina y dopamina) y de que la acción de los antidepresivos es inhibir la recaptura de estas monoaminas, podríamos sugerir que el Zn^{2+} ayuda a mejorar la deficiencia de monoaminas en el espacio sináptico, al modular positivamente a los R-nic.

III. INTRODUCCIÓN

III.1 Historia de la melancolía y la depresión

En esta sección se presenta una breve historia de cómo se fue desarrollando el concepto de la melancolía y que dio lugar al concepto de la depresión. El siguiente material fue obtenido principalmente de Cabaleiro et al., 2000.

Es importante señalar que antes del término depresión se consideraba el de melancolía, la cual se comenzó en la antigüedad greco-romana. La depresión no se mencionaba, ya que aún no existía la psiquiatría, y mucho menos el psicoanálisis. Algunos podrán pensar: había depresión pero como no existía el nombre, no se la detectaba. Aun hoy, el diagnóstico psicopatológico se basa en un conjunto de signos que se presentan con cierta regularidad, constituyendo un síndrome.

El fundamento de la melancolía se inició con "la teoría de los humores", formulada por Hipócrates (460-380 a.C.), la cual se repetiría durante más de 1500 años. Esta teoría partía de la hipótesis de que la salud era efecto del equilibrio entre ciertos humores o sustancias: sangre, flema, bilis amarilla estaban establecidos como los tres humores en cuyo equilibrio se sustentaba la idea de salud, mientras que la enfermedad era la ruptura de ese equilibrio, creyéndose que la bilis negra era un producto tóxico, una desviación de los considerados humores antes citados, y causal de múltiples enfermedades, como el dolor de cabeza, vértigo, parálisis, espasmos, epilepsia, desórdenes mentales y otros.

Más tarde, Empédocles (445 a.C.) sugirió que en el curso de las estaciones cada una de estas sustancias tomaba su primacía. Pero como habíamos anticipado, es Hipócrates, en su libro "De la naturaleza del hombre", quien cambia de estatuto a la bilis negra incluyéndola en la lista de los humores naturales básicos del cuerpo. Además, integra en una teoría los conocimientos hasta entonces dispersos. Relacionó los cuatro humores con las estaciones del año y sus cualidades climáticas, lo cual determinaba los temperamentos del hombre (Tabla 1).

Humor	Estación	Cualidades
Sangre	Primavera	Templado y húmedo
Bilis amarilla	Verano	Caliente y seco
Bilis negra	Otoño	Frío y seco
Flema	Invierno	Frío y húmedo

Tabla 1. Esquematización de la relación de las cuatro estaciones del año y el humor, así como también las cualidades.

Con la concepción causalista de la enfermedad, Hipócrates constituyó la Escuela Dogmática, en contra de cuyos postulados surgió lo que se denominó la Escuela Empírica, que sin miramientos por las causas, sólo consideraba a la experiencia directa.

Surgió luego la Escuela Metodista, que incluía aspectos de las dos anteriores. Su fundador fue Asclepiades (100 a.C.), cuyas ideas se conocieron a

través de Celio Aureliano (siglo V.), quien asentó que "La melancolía toma su nombre del hecho de que el enfermo vomita a menudo bilis negra...".

Sorano de Efeso (100 d.C.) médico de esta escuela rechazaba la teoría humoral, postulando: "... el nombre no deriva como creen muchos, de la idea de que la bilis negra es la causa de la enfermedad, sino que en realidad parte del hecho de que frecuentemente el paciente devuelve bilis negra".

Describió a la melancolía y la manía como enfermedades crónicas sin fiebre y las asociaba a la frenitis en tanto las consideraba "pérdida de la razón". Consideraba los signos de la melancolía como: "angustia mental, aflicción, silencio, animosidad hacia los miembros de la familia, a veces un deseo de vivir y otras un deseo vehemente de morir, sospecha por parte del paciente de que se está tramando algo contra él, llanto sin razón, murmullos incomprensibles, y de nuevo, jovialidad ocasional: distensión precardiaca, sobre todo después de las comidas, frialdad en los miembros, sudor suave, dolor agudo en el esófago o el corazón, pesadez de cabeza, tez verdosa-negrucza o algo azulada, cuerpo delgado, debilidad, indigestión con eructos con mal olor, retortijones, vómitos a veces sin echar nada o con sustancias amarillas, rojizas o negruzcas, descargas similares por el año." (Cabaleiro et al., 2000).

El objetivo del tratamiento era conseguir la relajación del estado de constricción, el cual producía síntomas mentales. También proponía medidas que se referían a un cambio en el ambiente inmediato del enfermo. Vemos así como, si bien destituye a la bilis negra del lugar de la causa, el origen de la enfermedad continuaba en la línea biológica que se venía desarrollando, agregando ahora, y coherente con lo anterior, prescripciones ambientalistas.

Rufo de Efeso (siglo II), representante de la escuela metodista tuvo gran incidencia en el pensamiento médico. Su obra fue retomada por Galeno y los árabes del S. IX. Probablemente fue el primero que asoció la melancolía con un grado limitado de locura. Afirmaba que quienes la padecían estaban abatidos, tristes y llenos de miedos. Sus signos principales eran el miedo y la duda como única idea engañosa, el resto era normal. Decía que "algunos sienten ansiedad con los ruidos fuertes, otros desean estar muertos, otros tienen la manía de lavarse, otros sienten aversión hacia cualquier comida o bebida, o detestan éste o aquel tipo de animal y finalmente otros creen haber tragado culebras y similares" (Cabaleiro et al., 2000).

Finalmente, la escuela más importante de la antigüedad grecolatina fue la Ecléctica, cuyos representantes fueron los iniciadores de la historia de la medicina: Celso y Areteo de Capadocia (siglo I), Galeno (siglo II), Celio Aureliano (siglo III) y Alejandro de Tralles (siglo IV), último autor considerado antiguo.

Celso no utilizaba sistemáticamente ninguna teoría, pero en sus ideas se veían rastros de la teoría de los humores: "La enfermedad de la bilis negra sobreviene en casos de desánimo prolongado acompañado por miedo e insomnio. Es una forma de locura que se inicia sin fiebre y parece producida por la bilis negra" (Cabaleiro et al., 2000).

Areteo de Capadocia incluye un capítulo de melancolía en "De las causas y síntomas de las enfermedades crónicas". La describe como "Una caída del espíritu como única fantasía, sin fiebre: ... se trastorna el entendimiento... en los melancólicos que se ven llenos de tristeza y desesperación... pero no todos los afectados por la melancolía se ven afectados en la misma forma, sino que unos

temen ser envenenados, otros huyen al desierto por misantropía, o se vuelven supersticiosos o les entra el odio por la vida.” (Cabaleiro et al., 2000).

La descripción de la melancolía de Galeno es polimórfica: “Normalmente se ven acosados por el miedo aunque no siempre presentan el mismo tipo de imágenes sensoriales anormales... Aunque cada paciente melancólico actúa bastante diferente que los demás, todos ellos muestran miedo o desesperación. Creen que la vida es mala y odian a los demás, aunque no todos quieren morir. Para algunos, el miedo a la muerte es la preocupación fundamental durante la melancolía. Otros, bastante extrañamente, temen la muerte a la vez que la desean”.

El siguiente periodo, la Edad Media (siglo V hasta 1453) también abordó el tema de la melancolía. Aquí se sumó la fuerte influencia cristiana, el *patrístico* (por los Padres de la Iglesia) cuya última y máxima figura fue San Agustín de Hipona (354-430) con su marcado misticismo, que se dice encontró su paralelismo filosófico en Platón y el período *escolástico* que encontró en Santo Tomás Aquino (1225-1274) su expositor más genial, vinculado con el "racionalismo" y la filosofía aristotélica.

Tanto en Bizancio como en el hospital morisco del Cairo en 1280 proliferan los hospitales y lugares de protección. La consideración de los trastornos mentales era compleja. Por un lado, los locos eran amados por Dios y considerados como concedores de la verdad, gozaban de absoluta libertad, incluso para suicidarse, ya que Alá les permitiría renacer bajo otra forma más bella. Pero por otro lado, siguiendo la tradición hipocrática y la teoría de los humores, muchos tratamientos eran de naturaleza mecánica y traumáticos. La decadencia de Bizancio y Bagdad

en el siglo XIII en manos de los mongoles, fomentó para los trastornos mentales, la creencia de la posesión demoníaca.

En el Renacimiento (siglos XV y XVI) la creencia en la posesión se extendió hasta tal punto que se instaura una auténtica demonología y los enfermos mentales eran quemados con los herejes.

De acuerdo con Descartes (1596-1665), la sede de las pasiones ha de estar en la fisiología del cuerpo, precisamente en la glándula pineal, localizada en el centro del cerebro, desde donde irradia a través de todo el cuerpo. En consecuencia, para Descartes, el estado de ánimo es en realidad un estado del cuerpo. La tristeza, por ejemplo, se convierte en un fenómeno esencialmente nervioso: es, dice, "*un dolor que ofende a los nervios*".

En 1751, el médico inglés W. Battie creó el Hospital de San Lucas, donde eliminó las medidas de fuerza en el trato de los enfermos mentales y creó un tratamiento más humanitario, el *Moral Management*. Su enseñanza tuvo su máximo exponente en el "*Retreat*" de York fundado por W. Tuke en 1776. En estados Unidos B. Rush (1745-1813) escribe el primer tratado de psiquiatría americano (*Medical Inquiries and Observations upon the Diseases of the Mind*).

Gall (1758-1828) creó la Frenología, en la que postuló la existencia de zonas cerebrales de las que dependían las facultades mentales; éstas basándose en la antropología cosmológica de Paracelso. Planteó que los astros influían en los procesos fisiológicos y psicológicos; el hombre presentaba un fluido magnético especial que al liberarse producía efectos curativos. El desarrollo posterior del Mesmerismo devino en la hipnosis y fue un intento de definir los procesos neuróticos en contraposición a los psicóticos.

Ahora bien, la psiquiatría de la Ilustración [siglo XVII-XIX] introduce una serie de planteamientos en el estudio de las enfermedades. Es una psiquiatría esencialmente clínica y terapéutica. Considera la locura como una *enfermedad mental*, definiéndola como una alteración funcional del sistema nervioso. Se intenta crear una metodología de trabajo, mediante la observación de casos individuales para inferir las características comunes y descubrir la historia natural de los procesos de la enfermedad mental.

Pinel establece una clasificación y descripción médica de las enfermedades mentales, basándose en la observación de los síntomas y el agrupamiento de éstos en síndromes más o menos fijos (Bercherie 1980).

Jean-Etienne Dominique Siqurol (1772-1840) deja la melancolía a los poetas y propone el nombre de lipemanía (del griego, locura afligida), que es una monomanía triste. La noción monomanía y su aplicación a la lipemanía, ya Rufo de Efeso la había definido como monomanía sin utilizar el término.

La lipemanía recobró, después de Esquirol, el nombre de melancolía en un sentido renovado. La tristeza puede ser patológica por su sola intensidad. Las ilustraciones clínicas fueron proporcionadas sobre todo por hebefrénicos y por paráliticos generales: el concepto de depresión patológica alcanzó dimensión sociológica al conceder categoría de enfermos a personas que, sin delirar, se habían remitido hasta entonces a la moral y al auxilio sacerdotal.

III.2 LA DEPRESIÓN DESDE UN PUNTO DE VISTA PSIQUIÁTRICO

III.2.1 Definición y formas de depresión

La depresión es una enfermedad que se define como un trastorno del estado de ánimo. Partiendo del significado del término "depresión" como "hundimiento" de algo, lo entenderemos como una disminución o baja de energía de algunos componentes de la persona: en la energía vital o biológica se manifiesta como desvitalización (falta de voluntad, iniciativa o ganas de hacer más o menos cosas, trabajos, actividades, etc.); en la afectividad se expresa como tristeza, vacío existencial, autoculpa, soledad, etc.; en la mente se crea ofuscamiento, pesimismo, acrecentamiento descontrolado de pensamientos oscuros dominantes, inseguridad, etc. Hay otros síntomas, pero éstos son los más frecuentes que suelen manifestarse conjuntados -no aislados- en el caso de un estado depresivo; es decir, una persona que únicamente viva la tristeza, el pesimismo, la inseguridad o la desgana, no significa que esté deprimida. Mientras que, las personas que padecen de un trastorno depresivo no pueden decir simplemente "ya basta, me voy a poner bien".

Un paso importante en la elaboración de la clasificación de las enfermedades mentales fue establecer la diferencia entre la alteración de las facultades cognitivas (un trastorno del pensamiento) y la alteración de la emoción (un trastorno del estado de ánimo) (Kandel, 2000a).

Los síntomas en las personas que padecen depresión, sin tratamiento, pueden durar semanas, meses e incluso años. Sin embargo, la mayoría de las personas que padecen depresión pueden mejorar con un tratamiento adecuado, más adelante lo mencionaremos.

Un primer paso de los tratamientos para la depresión es diagnosticar cuáles son los tipos de ésta. Así, se podrá distinguir cuándo una persona necesita tratamiento psicológico y psiquiátrico en conjunto y cuándo no hay necesidad de utilizar medicamento.

La clasificación más reciente de la depresión está dividida en unipolar y bipolar, la primera se resume con facilidad. En las palabras de Hamlet: "¡Qué cansada, rancia, monótona e inútil me parece la vida!" (Shakespeare, 1999). Se caracteriza por un estado de ánimo desagradable (disfórico) que está presente durante la mayor parte del día, casi todos los días, así como una intensa angustia mental, incapacidad para experimentar placer (anhedonia) y una pérdida de interés por las cosas (Kandel 2000a).

III.2.1.1 Depresión unipolar

En la depresión unipolar deben estar presentes por lo menos tres de los siguientes síntomas: alteración del sueño, disminución del apetito y adelgazamiento (a veces hiperfagia), pérdida de energía, disminución del apetito sexual, inquietud (agitación psicomotriz), lentitud del pensamiento y de acción (retardo psicomotor), dificultad para concentrarse, indecisión, sentimientos de inutilidad, culpa, pensamientos pesimistas, pensamientos sobre la muerte y el suicidio (Kandel 2000a).

La depresión unipolar es quizá un grupo de trastornos que, con la finalidad de diferenciarlos se han formado tres subtipos: 1) la depresión melancólica (que se presenta aproximadamente entre un 40 y 60% de los pacientes que sufren depresión), dado que a menudo no hay causa externa obvia desencadenante no

hay una pérdida personal o rechazo, en el pasado se denominó depresión endógena. Los síntomas que se presentan son: depresión con variación diurna en el estado de ánimo (peor durante la mañana), insomnio con despertar matutino precoz, anorexia con adelgazamiento importante, agitación psicomotriz y dolor moral, falta de interés por casi todas las actividades y falta de respuesta a estímulos agradables, y cuando es grave, pérdida de la capacidad de disfrutar (anhedonia). Este tipo de depresión responde al tratamiento electroconvulsivo (TEC), a los antidepresivos tricíclicos y a los inhibidores de la recaptura de serotonina (ver más adelante); 2) La depresión atípica (se presenta en el 15% de los pacientes hospitalizados por depresión mayor) y los síntomas que se muestran son contrarios a lo que es la depresión melancólica, tiende a ser crónica, los pacientes con este tipo de depresión disfrutan de manera transitoria cuando acontece algo agradable, no experimentan pérdida de apetito ni de peso, más bien presentan hiperfagia y engordan, no refieren insomnio, sino que duermen en exceso y su depresión empeora no mejora al atardecer, también presentan intensos síntomas de ansiedad y responden al tratamiento de los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO); 3) la depresión dístimia, depresión leve que no llega a ser depresión mayor (Kandel 2000a).

III.2.1.2 Depresión bipolar

Por otro lado, la depresión bipolar o psicosis maníaco depresiva, en la que una persona puede sufrir alternativamente fases de euforia maníaca y otras depresión. La enfermedad afecta por igual a hombres y mujeres. La mayoría de los episodios se caracterizan por un estado de ánimo exaltado, expansivo o

irritable que dura al menos una semana, junto con varios de los siguientes síntomas: hiperactividad, locuacidad (presión o del habla), indiscreción social, aumento de la energía y de la libido, fuga de ideas, grandiosidad, tendencia a distraerse, disminución de la necesidad de dormir, en los casos más graves delirios y alucinaciones. La mayoría de los episodios no tienen desencadenante psicosocial conocido (Kandel 2000a).

En esta forma de depresión existe una clara predisposición genética, muestran intervalos de normalidad y son más frecuentes los suicidios, aunque los que superan la enfermedad no tiene por qué tener secuelas.

En cuanto al tratamiento se ha utilizado más frecuentemente las sales de litio y, para disminuir las fases maníacas los neurolépticos.

III.2.1.3 Depresión somatizante

Aparte de los dos trastornos depresivos antes mencionados, existen diversas variaciones menos comunes. El "trastorno afectivo estacional", que se presenta durante el otoño y finaliza en la primavera. Existe aun cierta controversia acerca de si permanece el patrón estacional, o si reaparece subsecuentemente en otros periodos del año en la misma persona. Otra variedad se llama depresión somatizante, de la palabra griega soma-cuerpo, en la cual predominan los síntomas físicos, pero no puede encontrarse una causa de ella. No tiene los síntomas más sobresalientes del estado depresivo, pero la persona parece deprimirse por un patrón continuo de pensamientos melancólicos (Cleghorn y Lee et al., 1991).

III.2.1.4 Factores genéticos en la depresión

Para conocer la etiología de la depresión se han dado diferentes aproximaciones, entre las que se incluyen, factores genéticos tanto en el trastorno unipolar como en el bipolar. Por ejemplo, los hijos de familias en la que ambos padres tienen un trastorno afectivo claro parecen tener una posibilidad del 30 al 40% de desarrollar una depresión. Si un gemelo idéntico tiene una depresión importante, hay una probabilidad del 70% de que el otro la desarrolle. Pero en los gemelos fraternos, la posibilidad es sólo del 25% (Cleghorn y Lee et al., 1991). Por otro lado, los factores no genéticos son importantes al diagnosticar si un trastorno afectivo se manifiesta. Su importancia se refleja en dos tendencias importantes de la depresión en los últimos 50 años. Desde 1940, el año aproximado en que dan inicio los tratamientos de la depresión, la edad más frecuente en la que aparecen los estados depresivos ha ido disminuyendo de 35 a 28 años y la incidencia de depresión en familias de los pacientes ha aumentado. Pudiera ser que las personas vulnerables a padecer una depresión tengan en la actualidad más probabilidades de caer en ella que hace medio siglo, debido al aumento de las situaciones de estrés de la vida cotidiana de nuestros días (Kandel, 2000a).

III.3 BASES BIOLÓGICAS DE LA DEPRESIÓN

III.3.1 El sistema nervioso y la sinapsis

Buscando una solución a los desórdenes afectivos, se han formulado diversas teorías. Entre ellas, la más común, la teoría neuroquímica (neurobiológica), menciona que en el origen de la depresión participan

determinadas anomalías de los sistemas de neurotransmisión cerebrales como son: la 5-Hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), la noradrenalina (NA) y la dopamina (DA). El desbalance que se presenta en estos sistemas de neurotransmisores generan los síntomas de la depresión y a su vez, se modifican al administrar los fármacos antidepresivos (AD). Antes de continuar con este tema, es necesario hacer un paréntesis para describir, de manera breve, cómo está constituido el sistema nervioso (SN), que juega un papel muy importante en los procesos de la depresión.

El sistema nervioso es uno de los centros principales de integración y control del cuerpo. En el ser humano sirve para llevar a cabo tres amplias funciones: la sensorial (se sienten cambios en el cuerpo que provienen del ambiente externo), integrativa (se interpretan estos cambios) y la motora (responde a la interpretación por medio de la acción biológica).

A través de la sensación, la integración y la respuesta, el SN es el medio más rápido del cuerpo para mantener la homeostasis, las reacciones de respuesta secundaria, y generan los impulsos nerviosos para hacer los ajustes necesarios para mantener el funcionamiento del cuerpo de manera eficiente.

El SN se divide en dos grandes ramas, el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP).

El SNP se divide en: 1) el sistema nervioso autónomo (SNA), que regula la actividad del músculo liso, el músculo cardíaco y ciertas glándulas. Desde un punto de vista estructural, en dos tipos de neuronas eferentes viscerales una localizada en el SNC, la otra preganglionar y plexos. Desde un punto de vista funcional, opera sin control conciente, aunque no es independiente del todo ya que

está regulado por centros del cerebro, en particular por la corteza cerebral, el hipotálamo y la médula ablongada. Algunas de las actividades viscerales reguladas por el SNP son los cambios en el tamaño de la pupila, la acomodación para la visión cercana, la dilatación de los vasos sanguíneos, la dilatación de la frecuencia e intensidad del latido cardiaco, los movimientos del aparato digestivo y la secreción de la mayor parte de las glándulas. 2) El sistema nervioso somático, que produce los movimientos conscientes de los músculos esqueléticos (Tortora y Anagnostakos et al., 1998).

Por otro lado, el SNC realiza funciones muy complejas, ya que atiende y satisface las necesidades vitales y da respuesta a una amplia gama de estímulos. Ejecuta tres funciones esenciales: La función receptora, son distintas áreas que recogen todas las sensaciones o estímulos que llegan a nuestro organismo; función efectora, originan todos nuestros movimientos como respuesta a los estímulos anteriormente recibidos; funciones propias de la personalidad, donde se abarcan áreas del lenguaje, memoria, emoción etc.

El SNC lo conforman el encéfalo y la médula espinal como se puede observar en la Figura 1. Está protegido por las meninges, distribuidas en tres capas: la duramadre (externa), la aracnoides (intermedia) y la piamadre (interna), es la más delgada y está en conexión con el tejido encefálico y la médula espinal. La mayor parte de impulsos nerviosos que estimulan a que los músculos se contraigan y las glándulas secreten se originan en este sistema Tortora y Anagnostakos et al., 1998).

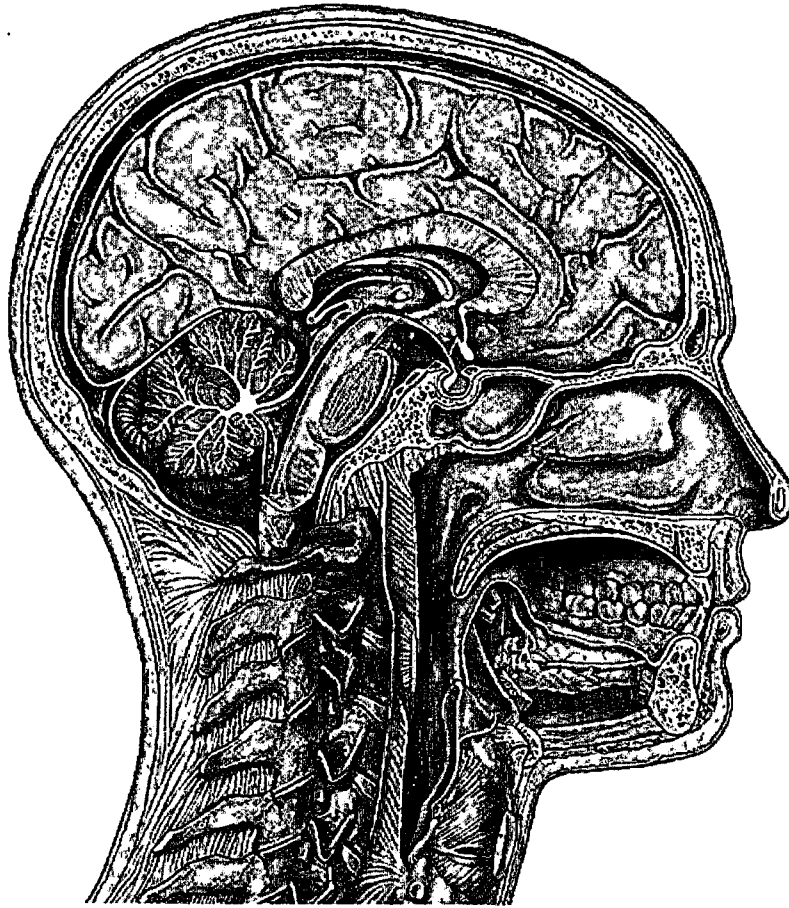


Figura 1. corte transversal del Sistema Nervioso Central.

El SNC está compuesto por células nerviosas (neuronas) y células gliales. Las neuronas están altamente especializadas para la conducción de señales. La glía ha sido asociada con funciones de soporte estructural y como componente protector de las neuronas. Ahora se sabe que las células gliales modulan activamente la comunicación entre las neuronas. Así, la actividad de las neuronas y las glías del SNC y la interacción con el medio externo generan procesos tan complejos como el aprendizaje, los sentimientos, las emociones, la memoria, entre

otros y si su funcionamiento alterado podría conducir a trastornos cognitivos y/o emocionales.

Como todas las células, las neuronas están formadas por una membrana plasmática, núcleo y organelos celulares. Estas células pueden clasificarse por su forma, tamaño, localización o función. Además hay algunos elementos básicos en todas las neuronas: soma (lugar donde se encuentra toda la información genética), axón (largos o cortos), botones sinápticos y dendritas (ver Figura 2). Su forma de comunicación es por medio de la transmisión sináptica química, esto quiere decir que su comunicación depende de la liberación de una molécula llamada neurotransmisor, sustancia química que se encuentran dentro de las vesículas sinápticas (organelos esféricos que se encuentran en la terminal presináptica) y que son liberadas cuando hay una descarga de un potencial de acción. Las vesículas sinápticas pueden contener neurotransmisores como: DA, NA, 5-HT (estas pertenecen a las aminas biogénicas, que se sabe participan en la depresión), acetilcolina (AcCo), histamina, glicina, aspartato o glutamato, entre otros. Dependiendo del neurotransmisor que liberen, estas neuronas son denominadas, dopaminérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas, colinérgicas, etc. En algunos casos se ha reportado que una vesícula contiene más de un neurotransmisor (Purves et al., 1997).

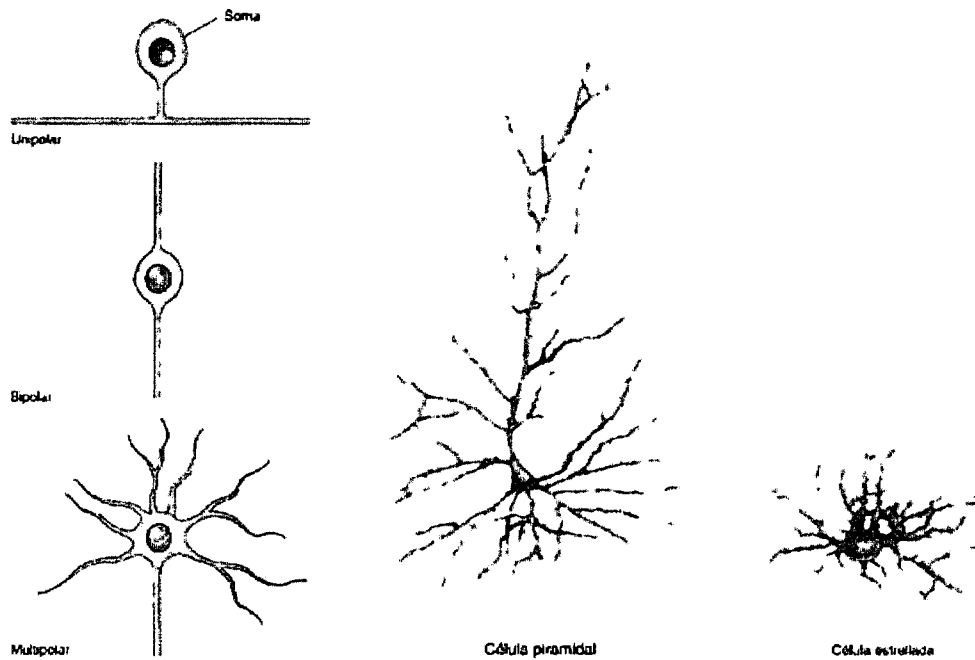


Figura 2. la clasificación de las neuronas se ha dado de acuerdo a distintos criterios taxonómicos, tales como el tamaño, la forma del axón o el árbol dendrítico

La sinápsis química se inicia con la descarga de un potencial de acción presináptico, con esta descarga va a haber una despolarización de la terminal sináptica que hace que los canales de Ca^{2+} activados por voltaje se abran y entre Ca^{2+} a la célula. El aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} hace que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana presináptica y su contenido sea liberado a la hendidura sináptica (separación que hay entre la terminal presináptica y la neurona postsináptica). Luego de esta exocitosis el transmisor se une a los receptores de la membrana de la célula postsináptica. Al activarse los receptores abren los canales iónicos. El flujo de iones resultante, inducido por el

neurotransmisor, altera el potencial de membrana (voltaje) de la neurona postsináptica, aumentando o disminuyendo la probabilidad de que la neurona dispare un potencial de acción (Figura 3).

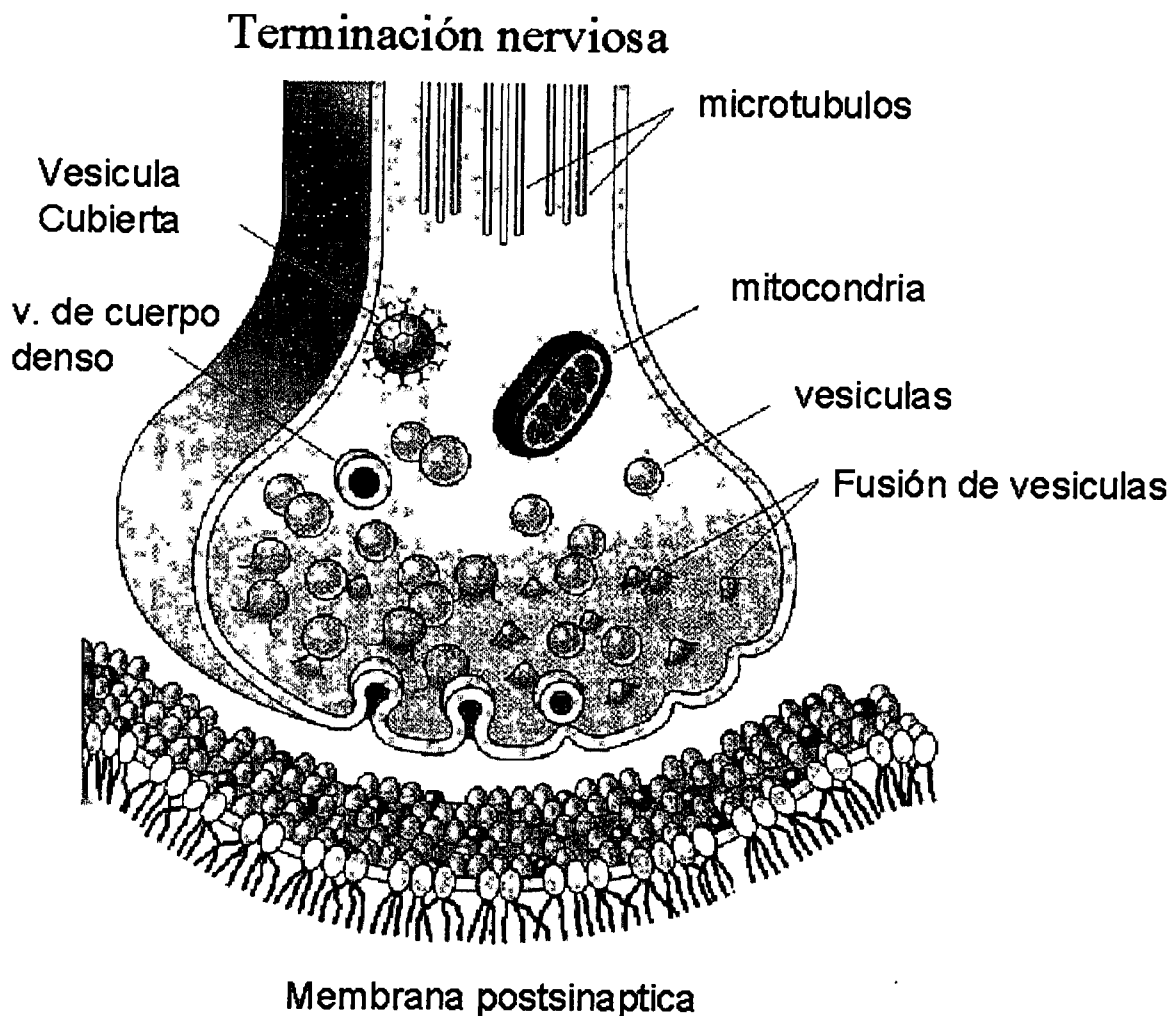


Figura 3. Transmisión de una sinapsis química, tras la estimulación de la terminal nerviosa, se abren canales que permiten la entrada de Ca^{2+} , este provoca que las vesículas sinápticas se fusionen contra la terminal nerviosa permitiendo la liberación de neurotransmisores (Purves et al., 1997).

III.3.2 Neurotransmisores y la depresión

La hipótesis más común acerca de la etiología neurobiológica de la depresión, “la hipótesis de las catecolaminas”, propuesta por Schildkraut y por Bunney y Davis en 1965 (citada en Vetulani y Nalepa, 2000) afirmaba que al menos algunas formas de depresión se asociaban con una reducción en la disponibilidad de catecolaminas, principalmente noradrenalina (NA), y que la manía se relacionaba con el aumento de ésta (Salín Pascual, 1997; De la Fuente, 1998).

Las evidencias en las que se apoya la hipótesis que asocia a las catecolaminas en la depresión son farmacológicas, y consisten en la observación de que ciertos fármacos (metildopa y reserpina) que disminuyen los niveles de NA pueden inducir depresión en algunas personas. Además, los AD conocidos en esa época (tricíclicos e inhibidores de la enzima monoaminooxidasa MAO) tenían efectos farmacológicos que estimulaban el aumento de ese neurotransmisor. Así, la idea central de esta hipótesis es que la cantidad “normal” del neurotransmisor se encuentra disminuida por un proceso desconocido, y que tal disminución conduce a la depresión (Stahl, 2000).

Posteriormente, diversos grupos de investigadores proporcionaron evidencias de que la deficiencia de 5-HT también participaba de forma importante en la etiología de la depresión. En 1974, Prange propuso la hipótesis “permissiva de las aminas biogénicas del desorden afectivo”. La cual sugiere que una deficiencia en la transmisión de 5-HT permite el desorden afectivo, pero no lo

causa, de tal manera que si existe un aumento en la transmisión de catecolaminas y la 5-HT, entonces el paciente presenta depresión (De la Fuente 1998).

Recientemente se ha propuesto que la depresión puede deberse a una deficiencia en los mecanismos de transducción de las señales de monoaminas en las neuronas postsinápticas. Esta hipótesis propone que en las neuronas postsinápticas con receptores para monoaminas existen deficiencias en la expresión del gen que codifica al Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro, (Duman et al., 1997; Stahl, 2000).

Las aminos biogénicas NE, DA y 5-HT son transmisores que se encuentran fuera y dentro del SNC (Delgado 1998). Algunas de sus funciones son:

La dopamina, si bien está presente en varias regiones encefálicas, la principal área del encéfalo que contiene dopamina es la sustancia nigra, la cual desempeña un papel esencial en el control de los movimientos corporales en la enfermedad de Parkinson (Purves et al., 1997).

Las neuronas noradrenérgicas están restringidas en gran medida al locus coeruleus, un núcleo del tronco encefálico que se proyecta difusamente en el mesencéfalo y el telencéfalo. Estas neuronas son especialmente importantes para modular el sueño y la vigilia.

Estas dos catecolaminas junto con la adrenalina son eliminadas por recaptura en las terminales nerviosas o en las células gliales circundantes, las dos enzimas principales que participan en el catabolismo de las catecolaminas son la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol O-metiltransferasa (COMT) ambas presentes en el interior de las terminales nerviosas catecolaminérgicas y son los blancos de muchos agentes psicotrópicos.

III.3.2.1 Serotonina

La serotonina se localiza en grupos discretos de neuronas en los núcleos del Rafé, de la protuberancia, y el tronco encefálico superior. Las células de las partes rostrales de estos núcleos se proyectan al prosencefalo; neuronas serotoninérgicas individuales se proyectan a cientos de células blanco a través de una distribución amplia y difusa. Las células de la parte caudal del núcleo del Rafé se proyectan a la medula espina (Figura 4). Han sido asociadas en la regulación del sueño y la vigilia (Purves et al., 1997).

III.3.2.2 Noradrenalina

Las vías noradrenérgicas se originan en el locus ceruleus y algunos axones ascienden para inervar al hipocampo y todas las regiones de la corteza cerebral. Otras neuronas poseen axones descendentes que alcanzan el asta anterior y posterior de la medula espinal como se muestra en la Figura 4.

III.3.2.3 Dopamina

Las vías dopaminérgicas, se forman en la parte compacta de la sustancia nigra y las áreas adyacentes del techo del mesencéfalo. Envían sus principales aferencias dopaminérgicas ascendentes al telencéfalo incluida la vía negroestriada que inerva el cuerpo estriado. Otros grupos de estas células inervan a la corteza frontal y temporal y las estructuras límbicas de la base del procencéfalo. Mientras que otros grupos son enviados a la medula espinal, Figura 4 (Kandel 2000a).

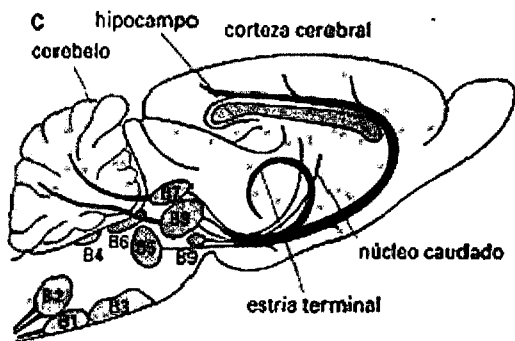
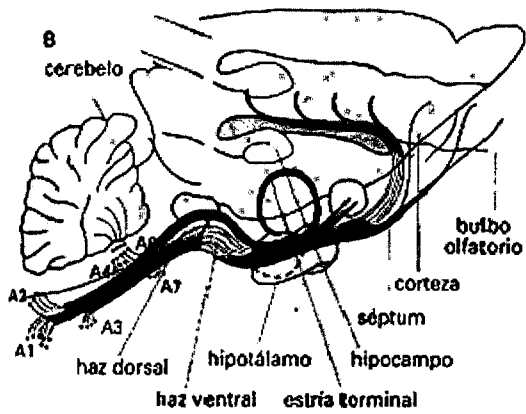
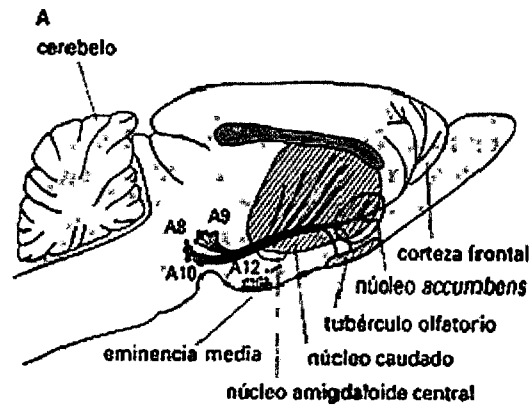


Figura 4. principales vías monoaminérgicas. A) trayecto de las principales vías dopaminérgicas; B) vías noradrenérgicas y C) principales destinos de las neuronas de los núcleos serotoninérgicos (Delgado et al., 1998).

III.3.2.4 Acetilcolina

Se han podido identificar ocho grupos de neurona colinérgicas (Ch1-Ch8), cuya localización no siempre respeta las fronteras de los núcleos individuales que las contiene. En la Tabla 2 se indica la localización de estos núcleos y las zonas inervadas para cada uno de ellos.

Tabla 2. Localización cerebral de las neuronas colinérgicas (Delgado et al., 1998).

Localización de los cuerpos celulares	Áreas inervadas	Aspectos funcionales
Ch1 Séptum medial (Tálamo)	Hipocampo**	Fenómenos de activación cortical, paso del sueño - vigilia, memoria
Ch2 Núcleo vertical de la banda diagonal (Tálamo)	Hipocampo**	Fenómenos de activación cortical, paso del sueño- vigilia, memoria
Ch3 Extremo horizontal de la banda diagonal (Tálamo)	Bulbo olfatorio	Fenómenos de activación cortical, paso del sueño- vigilia, memoria

Ch4 Núcleo basal de Meynert (Tálamo)	Corteza cerebral y amígdala**	Fenómenos de activación cortical, paso del sueño a vigilia, memoria, procesos de aprendizaje lesiones de este grupo provocan pérdidas de memoria.
Ch5 Núcleo pedúnculo pontino del tronco del encéfalo (Corteza)	Tálamo	Participan en los mecanismos que activan el sueño REM
Ch6 Núcleo del tegmento dorsolateral (tronco del encéfalo) (Corteza)	Tálamo	Participan en los mecanismos que activan el sueño REM
Ch7 Núcleo medial de la habénula	Núcleo interpenduncular	
Ch8 Núcleo parabigeminal (Tálamo)	Cóliculo superior	
Estriado	Intrínseca	

*se indica entre paréntesis otras áreas de proyección menores de cada uno de los grupos neuronales.

** Inervación colinérgica más densa.

III.4 TRATAMIENTOS DE LA DEPRESIÓN

III.4.1 Tratamiento farmacológico

En general los tratamientos de los que hasta ahora se dispone son eficaces, siempre y cuando sean respetadas las reglas que se requieren en cada uno de ellos. El tratamiento para la depresión depende del tipo de depresión del paciente, éstos van desde terapias psicológicas, tratamiento médico AD (en combinación con terapia psicológica) y en caso de depresión bipolar tratamiento electroconvulsivo.

Con la llegada de los medicamentos antidepresivos desde finales de la década de los cincuenta, y la constante aparición de nuevos medicamentos, la depresión es un problema médico que puede tratarse con diversos fármacos. Sin embargo, a pesar de la intensa investigación, en la actualidad no se dispone de una explicación adecuada y completa del mecanismo de acción de los antidepresivos (Moreno et al., 1999, Stahl, 2000).

Se sabe que los fármacos eficaces en el tratamiento de la depresión actúan principalmente sobre los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico del cerebro. La acción de estos fármacos ha dado las primeras pistas acerca de la base neuroquímica de los trastornos depresivos (Kandel 2000a).

Los antidepresivos disponibles presentan diferentes estructuras químicas y propiedades farmacológicas. Los estudios intensos han conducido a una clasificación de los antidepresivos bajo criterios estructurales, farmacológicos y mixtos. Si bien, el criterio farmacológico es cada vez más frecuente, existen diversas clasificaciones sustentadas por el efecto del AD. En el siguiente cuadro se muestran los fármacos más utilizados Tabla 3.

En la Tabla 3 se observa una gran variedad de AD. Los primeros que se descubrieron fueron los inhibidores de la monoaminoxidasa, sustancia que se encarga de catabolizar a los neurotransmisores que se supone implicados en las causas de los trastornos depresivos. Estos AD surgieron como resultado de los estudios que se realizaron en 1952, con el fin de encontrar un medicamento para pacientes con tuberculosis. Al probar uno de los medicamentos estudiados la Iproniazida, se mostró que los enfermos que la tomaban no mejoraban de la tuberculosis, pero su ánimo, pese a todo, cada día iba mejor. A partir de este descubrimiento se ensayaron otras sustancias con características químicas semejantes a la iproniazida, ya buscando su efecto AD. Aunque eran muy efectivos, también tenían la desventaja de afectar la presión arterial cuando eran combinados con otros medicamentos, por lo tanto fueron discontinuados y se inició una nueva serie de inhibidores de la MAO, encargados de bloquear la acción de solo una fracción, esto evita los riesgos bruscos de la presión arterial, aunque no tiene la misma potencia antidepresiva (Tamayo, 1997).

Tabla 3. Clasificación de los antidepresivos según el efecto neuroquímico. (Selectivos = acción exclusiva. Preferenciales = acción repartida) (Fernández 2003).

Clasificación de los fármacos utilizados en el tratamiento de la depresión

1. Inhibidores de la recaptura de NA	A. Selectivos noradrenérgicos B. Preferenciales noradrenergicos	Maprotilina, Nomifensina Amoxapina, Reboxetina Amineptino, Bupropion (Estos dos activan también la función de la DA mediante el bloqueo de su receptación) Dexipramina, Viloxacina
2. Inhibidores selectivos de la recaptura de 5HT (ISRS)	A. Selectivoserotoninergicos globales B. Selectivos serotoninergicos con bloqueo de los receptores 5TH2 y 5HT3 C. Preferenciales serotoninergicos	Trazadone, Metazadone Clomipramina
3. Inhibidores mixtos de la recaptura de NA y 5HT (triciclicos)	A. Serotoninérgicos y noradrenérgicos	Imipramina, Amitiptilina, Nortritilina, Doxepín, Venlafaxina, Trimipramina, Nenlafaxina, Lefrepramina
4. Inhibidores de la recaptura de DA	A. Dopaminérgicos	Bupropión
5. AD atípicos	A. Inhibidor de los receptores noredrenérgicos y serotoninérgicos	Mirtazapina

Hasta algunos años, la inhibición de la MAO constituía el tratamiento por excelencia contra la depresión, ya que cuando se impide la acción de esta enzima dedicada a catabolizar ciertos neurotransmisores (dopamina y noradrenalina), aumentan los niveles de serotonina permitiendo el incremento de la actividad neuronal. La serotonina es un neurotransmisor que participa en muchos aspectos de las funciones cognoscitivas superiores, como la planificación y el proceso de toma de decisiones. El incremento en los niveles de serotonina mediante la inhibición de la MAO, que es lo que ocurre normalmente cuando se ejerce el razonamiento, origina un aumento en la actividad de los receptores centrales.

Los AD tricíclicos, llamados así por el núcleo de tres anillos característicos (entre los que se encuentran; la imipramina, amitriptalina, doxepina, desipramina, nortriptilina, clomipramina, trimipramina, protriptilina) se han utilizado en la clínica durante casi cuatro décadas. En 1957 se descubre la imipramina, AD tricíclico inhibidor de la recaptura de serotonina y noradrenalina, al investigar un antipsicótico a partir de sustancias con estructura química semejante a un grupo llamado fenotiazinas, cuya característica es su estructura de tres anillos y con un claro efecto antipsicótico, que consiste en eliminar ideas delirantes y alucinaciones. La imipramina se forma con tres anillos bencénico, pero no tiene efectos antipsicóticos y sí un marcado efecto AD, tan bueno como los inhibidores de la MAO y sin efectos secundarios peligrosos.

Ya en los años 80s y 90s se descubrieron los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, que fueron creados con la idea de disminuir los efectos adversos de los AD tricíclicos. Entre los que se encuentran, la sertalina, paroxetina, fluoxetina (nombre comercial Prozac, AD que se convirtió en la droga

antidepresiva de mayor venta en el mundo), fluvoxamina y citalopram. La serotonina normalmente es reciclada por las células nerviosas, y “los nuevos fármacos AD como el Prozac bloquean esta actividad de reciclaje, con lo que aumenta la serotonina en los niveles sinápticos” (Leonard et al., 2000).

Conociendo las propiedades químicas y algunas teorías de cómo funcionan los AD, se han ido creando fármacos cada vez más selectivos, buscando reducir los efectos secundarios de éstos. Aunque el número de los AD está en constante crecimiento, hasta ahora no se ha encontrado un grupo que plantee una clara ventaja terapéutica sobre los demás.

III.4.2 Efectos adversos de los antidepresivos

Los efectos adversos de los AD pueden manifestarse con reacciones de importancia clínica hasta en el 5% de los pacientes. Los AD tricíclicos producen una mayor incidencia de reacciones adversas. Sin embargo, los AD inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), promocionados como más selectivos y menos tóxicos, no están exentos de efectos colaterales, por ejemplo la administración de fluoxetina ha causado síndromes contusionales, o la paroxetina ha causado síndrome Parkinsoniano (Dos Santos et al.,).

La Tabla 4, muestra la patología farmacológica producida por AD, donde se pone de manifiesto que los ISRS han producido, en comparación con los tricíclicos mayor afectación del SNC y en la esfera sexual. Estos reportes muestran la necesidad de evaluar globalmente la relación entre los beneficio y los riesgos que se pueden derivar del uso de medicamentos, y no solo de los beneficios o los riesgos por separado (estudio realizado por el Sistema Nacional de

Tabla 4. Efectos adversos de los AD.

ANTIDEPRESIVOS	REACCIONES ADVERSAS
Amitriptilina	Disminución de la libido, impotencia sexual, pérdida de la conciencia, hipertemía, taquicardia, disartría, cicloplejía, retención urinaria
Amitriptilina + Lorazepan Propalanol + ácido gama-aminobutírico Amitriptilina + Lorazepam Ciproheptadina + Mianserina (Alprazolam)	Insomnio, nervisismo, coma, insuficiencia respiratoria aguda, fallo renal, anuria
Clorimipramina	Hipotensión ortostática, lipotomía, dificultad en la concentración, retención urinaria, diplopía
Clorimipramina – Atenolol Somazina- L-acetilcarnitina	Hipotensión ortostática severa
Clorimipramina-fluoxetina- clonazepam	Hipotensión arterial, cefalea
Fluoxetina	Constipación, pirosis, vómitos, náuseas, anorexia, sequedad bucal, aumento en el tránsito intestinal, hipertensión, confusión, insomnio, parkinsonismo,

	mareos, aumento de la ansiedad, disminución de la libido, trastornos de erección y eyaculación, impotencia sexual, inmunoalérgias
Fluoxetina + vitaminas + minerales + oligoelementos	Síndrome confucional
Paroxetina	Retraso de la eyaculación, disminución de la libido, erección sin eyaculación, aumento de peso, hiperorexia, dispepsia, flatulencia, cólicos, cefalea, aumento de peso
Paroxetina, clonazepan, zolpidem	Temblor fino de miembro superior, vómito, diarrea
Mianserina	Crisis tónico-clónicas, pérdida del control esfínteres
Sertralina, clonazepan	Erección sin eyaculación, disminución de la libido
Trazadone-Alprazolam	Inquietud, insomnio, angustia
Venlafaxina	Impotencia sexual, disuria, constipación, náuseas, vómitos diarrea
Venlafaxina - enalapril	Mareos, cefalea, astenia, náuseas
Fluvoxamina	Tinnitus

Información tomada de Dos Santos et al., 2000.

III.4.3 Tratamiento electroconvulsivo (TEC)

La TEC actualmente está indicada en depresión severa con alto riesgo suicida, depresión refractaria, psicótica o bipolar, la mejoría es del 70 al 80%. La TEC no es efectiva en esquizofrenia crónica, pero puede ser efectiva en el control de los síntomas catatónicos o control de delirios.

La terapia convulsiva para uso psiquiátrico se ha descrito desde el siglo XVI, utilizando elemento electroconvulsivo como el alcanfor, el uso de electricidad se dio a partir de 1938 en un paciente esquizofrénico con alucinaciones (Vallejo y Rojo 1994). Sin embargo, es hasta 1940 cuando se introduce el uso de relajantes musculares para disminuir el riesgo de fracturas vertebrales que se presentaban en la terapia electroconvulsiva. Aunque este tratamiento empezó a estar en desuso por diferentes motivos, entre los que se encuentra el uso de los AD y poco conocimiento sobre su mecanismo de acción, hoy en día más de 50 mil pacientes por año en el mundo reciben este tratamiento.

El mecanismo de acción de la TEC permanece aún desconocido, aunque se piensa que está relacionado con efectos sobre varios neurotransmisores (incremento sináptico de noradrenalina, serotonina, ácido gama-aminobutírico y β -endorfinas) (Kellar, 1981), sensibilización e incremento en la densidad de receptores 5-HT₂, e incremento de la sensibilidad postsináptica de receptores 5-HT_{1A}, estos son solo algunos de los mecanismos de acción propuestos.

Para la aplicación del TEC es importante descartar la presencia de infarto agudo del miocardio reciente (hasta tres meses después de ocurrido), enfermedad cerebrovascular, hipertensión endocraneana, edema cerebral, tumores cerebrales,

hipertensión arterial severa, insuficiencia cardiaca congestiva y aneurismas cerebrales o aórticos.

III.5 RECEPTORES PARA ACETILCOLINA NICOTÍNICOS

La Acetilcolina (AcCo) es un neurotransmisor que activa a dos clases de receptores. Ambas clases difieren en su estructura química así como en sus propiedades farmacológicas y fisiológicas. Unos son denominados nicotínicos (R-nic) y los otros muscarínicos, debido a que la nicotina y la muscarina funcionan como agonistas específicos de unos y otros respectivamente. Los R-nic son proteínas formadas por cinco subunidades con un canal iónico constitutivo, por el cual fluyen hacia el interior celular iones de Na^{2+} y Ca^{2+} , y salen iones de K^{+} , (Figura 5) mientras que los muscarínicos son proteínas de una sola cadena polipeptídica acoplada a proteínas G (Barrantes, 1996). Los R-nic, pertenecen a una familia génica, de canales iónicos de compuerta activados por ligando, también llamados receptores ionotrópicos (Arias, 1998; Corringer et al., 2000; Le Novère y Changeux, 2001).

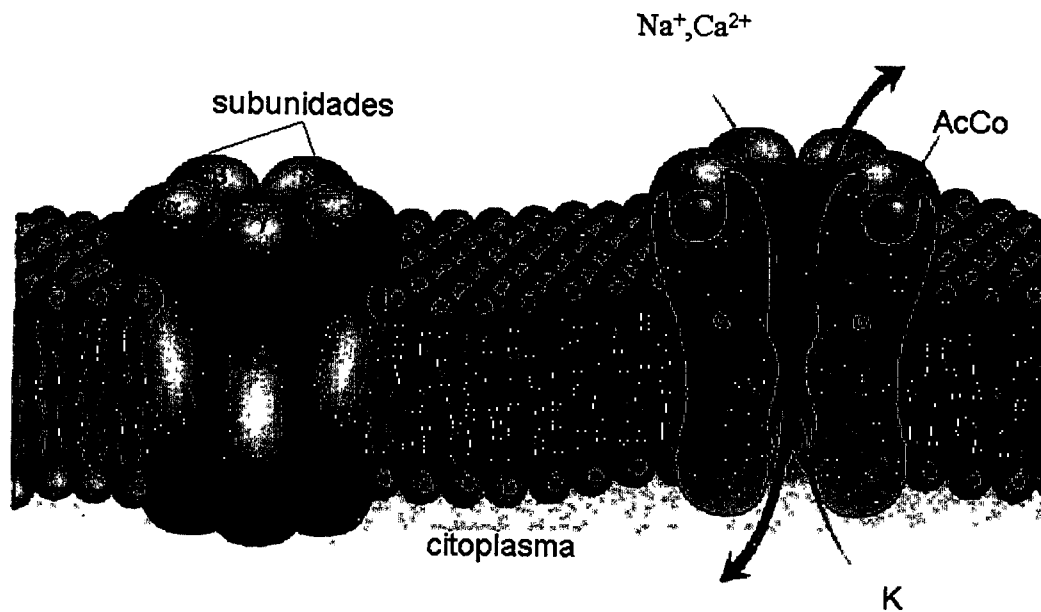


Figura 5. El esquema representativo muestra a la proteína formado por cinco subunidades, el sitio de unión de la AcCo, por último la unión de la AcCo al receptor permitiendo la abertura del canal permitiendo el paso de cationes.

Estructuralmente, todos los miembros de esta familia comparten las siguientes características (Figura 6): a) cada receptor es un oligómero formado por cinco subunidades; b) con base en el análisis de hidrofobicidad (índice hidropático) se ha sugerido que los receptores presentan tres dominios bien diferenciados: extracelular hidrofílico; transmembranal hidrofóbico e intracelular hidrofílico; c) cada subunidad atraviesa la membrana lipídica formando cuatro dominios transmembranales denominados M1-M4. Los amino ácidos (AA) que forman el dominio M2 de cada subunidad forman la pared del canal iónico; d) el dominio intracelular está formado por una asa grande constituida por AA entre M3 y M4, y el asa corta formada por segmentos entre M1 y M2; e) el dominio extracelular contiene las terminales carboxilo y amino de cada subunidad. En la

terminal amino se ubican los sitios de unión al agonista, los dominios M2-M3 están unidos por una asa extracelular corta (Feldman et al., 1999; Arias, 1998; Corringer et al., 2000).

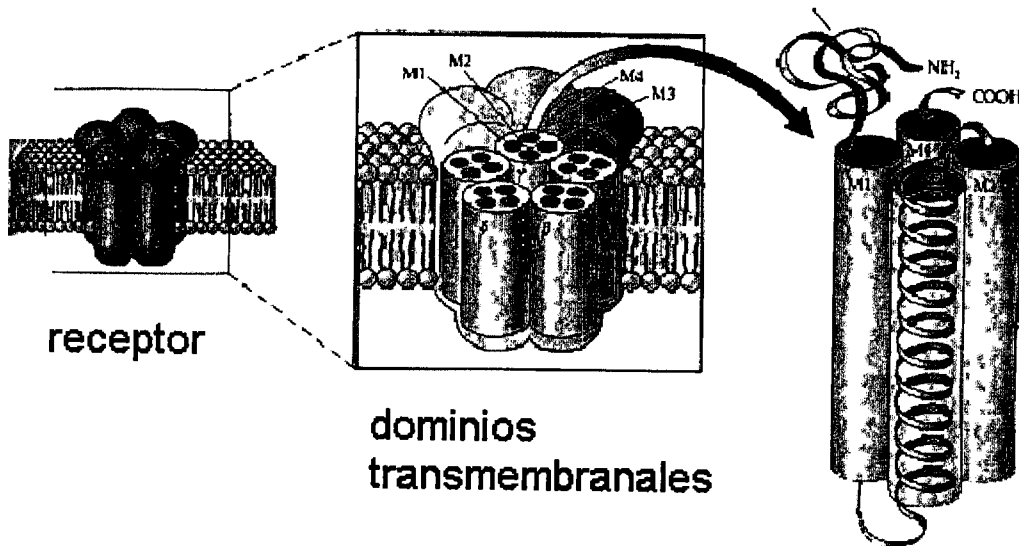


Figura 6. Dominios Transmembranales: el esquema representativo de los receptores nicotínicos muestra, al receptor formado por cinco subunidades, cada subunidad atraviesa la membrana lipídica formando cuatro dominios transmembranales denominados M1-M4, dominio intracelular formado por una asa grande de la M3 a la M4 y una asa corta de la M1 a la M2. (Figura tomada de Feldman et al., 1997).

Las propiedades funcionales comunes observadas en esta familia de receptores ionotrópicos pueden resumirse en cuatro: (1) los receptores tienen capacidad de reconocer y de unir neurotransmisores específicos; (2) la unión del ligando abre el canal iónico intrínseco asociado con cada receptor particular; (3) después de que el canal se ha abierto, se produce un flujo selectivo de iones que

son conducidos a través de la membrana celular y finalmente, (4) en presencia prolongada del agonista, los receptores desensibilizan, y en este estado conformacional el canal no conduce iones (Arias, 1998).

III.5.1 Subtipos de receptores nicotínicos

El R-nic presente en el órgano eléctrico de las rayas *Torpedo (californica y marmota)* es el receptor activado por ligando mejor conocido. Fue el primero en ser purificado, reconstituido, registrado electrofisiológicamente al nivel del canal unitario, clonado y visualizado. Posteriormente el uso de cDNA de las subunidades de este R-nic permitió la identificación de todo un grupo de genes en el sistema nervioso de vertebrados. En aves y mamíferos, se han identificado un total de diecisiete subunidades protéicas, que son codificadas por diferentes genes. Cinco en el músculo estriado esquelético y doce en el sistema nervioso (Lindstrom, 1999; Le Novère y Changeux, 2001).

Por su parte, los R-nic han sido clasificados de acuerdo con las subunidades que los componen y a su distribución en el organismo. Los R-nic musculares, también conocidos como periféricos, están compuestos por las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ y δ . Se localizan de forma difusa en el tejido muscular de embriones de aves y mamíferos, en los órganos eléctricos de las rayas y las anguilas eléctricas. Los R-nic neuronales al parecer también están constituidos por cinco subunidades, producto de la combinación de subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 6$) con β ($\beta 2$ - $\beta 4$) o bien, formados sólo por cinco subunidades α idénticas ($\alpha 7$ - $\alpha 9$) (Lindstrom, 1999; Paterson y Nordberg, 2000; Changeux y Edelstein, 2001).

Es importante resaltar que las características estructurales y funcionales de los R-nic musculares están bien caracterizadas. En contraste, el papel funcional de los R-nic neuronales es muy diverso y en algunos casos desconocido, además, se pueden localizar en la pre, post, para y extrasinapsis, e incluso en tejidos no nerviosos (Lindstrom, 2000).

En los R-nic neuronales, la mayor parte de la información funcional ha sido obtenida *in vitro*, a partir de su expresión en sistemas heterólogos, principalmente en el ovocito de la rana *Xenopus laevis*, y en menor grado en líneas celulares (Luckas 1998; Picciotto et al., 2000; Paterson y Nordberg, 2000; Zoli, 2000).

III.5.2 Estructura molecular de los receptores nicotínicos

En la actualidad se conoce la estructura primaria de todas las subunidades proteicas identificadas, tanto de los R-nic musculares como en los neuronales (Le Novère y Changeux, 2001). Sin embargo, la mayor parte del conocimiento acerca de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, proviene de la investigación realizada esencialmente en los R-nic de tipo muscular, y en menor medida del neuronal $\alpha 7$. No obstante, Karlin y Akabas (1995) propusieron que la estructura general en todos los R-nic es muy semejante, debido a que el análisis de la estructura primaria de las subunidades muestra una alta homología y permite suponer la misma topología para todas. Esta propuesta ha sido apoyada con predicciones computacionales de las estructuras secundaria y terciaria, realizadas para 18 subunidades representativas (Corringer et al., 2000).

El análisis de difracción de rayos X, con una resolución de 9 Å, del R-nic del organo de *Torpedo*, en presencia y ausencia de AcCo y la construcción de imágenes digitales, aportó información básica acerca de la forma tridimensional de los R-nic (Unwin, 1995, 2000). Se observa que las cinco subunidades presentan un arreglo cilíndrico casi simétrico alrededor de un poro central. Un dominio extracelular más ancho y grande que el intracelular, y un dominio transmembranal estrecho. La estequiometría del R-nic es $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ (Karlin y Akabas, 1995; Unwin, 1995, 2000; Arias 1998; Prince y Sine, 1998; Lindstrom, 1999;2000; Corringer et al., 2000).

En los R-nic musculares los sitios de unión difieren en su afinidad. El sitio de alta afinidad se localiza en la interfase entre las subunidades α_1 y δ ; mientras que el de baja afinidad se encuentra en la interfase entre las subunidades α_1 y γ , o, en adultos la subunidad ϵ (Figura 6) (Arias, 1998; Prince y Sine 1998).

Se ha propuesto que en los R-nic neuronales heteropentaméricos los dos sitios de unión de la AcCo están localizados en las interfases entre las subunidades α y β . La región principal se localizaría en las subunidades α y la región complementaria en la subunidad β (Corringer et al., 2000; Paterson y Nordberg, 2000).

III.5.3 Estados Funcionales de los receptores nicotínicos

La acción fisiológica principal de la AcCo sobre los R-nic es desencadenada por la unión de las moléculas de AcCo con sus sitios de unión. El R-nic experimenta cambios conformacionales y se ha sugerido que los R-nic pueden

existir al menos en cuatro estados funcionalmente distintos (Arias, 1998). Estos estados consisten en: (1) un estado de reposo R, que predomina en ausencia del agonista, y en donde la probabilidad de apertura del canal es muy baja; (2) un estado activo A, donde la probabilidad de apertura del canal se eleva al unirse las moléculas de AcCo a sus respectivos sitios de unión. El canal se abre en un intervalo de tiempo de μs a ms y muestra baja afinidad por la AcCo ($1\text{-}10\ \mu\text{M}$), y (3 y 4) dos estados desensibilizados denominados I (inicial) y D (tardío), que predomina después de la exposición del agonista por varios cientos de milisegundos, en los que el canal no conduce iones. Los estados desensibilizados (I) y (D) muestran alta afinidad por la AcCo ($10\ \text{mM}$ - $1\ \mu\text{M}$), y presentan refractariedad a la activación por AcCo en un intervalo de tiempo de milisegundos a minutos (Katz y Thesleff, 1957; Arias 1998; Paterson y Nordberg, 2000).

El proceso de transición en el canal iónico, entre un estado cerrado y uno abierto, y viceversa se conoce como el mecanismo de compuerta (*gating*). En los R-nic este mecanismo no se conoce bien, sin embargo, con base en evidencia experimental se han propuesto dos explicaciones acerca del funcionamiento de la compuerta. Unwin (1995; 2000) comparando las micrografías electrónicas en ausencia y presencia de AcCo, propuso que al unirse la AcCo a sus sitios de unión, se producen cambios locales que se propagan hasta el poro (el anillo de leucina en los R-nic de *Torpedo*) gira de tal manera que permite el flujo iónico. En estado cerrado este anillo constriñe el poro y constituye la compuerta (Kandel y Siegelbaum, 2000b).

III.5.4 Papel funcional de los receptores nicotínicos

Los R-nic se encuentran distribuidos en el organismo de una gran variedad de miembros del reino animal, que incluye tanto invertebrados como vertebrados. En estos últimos (aves y mamíferos) se localizan principalmente en la unión neuromuscular y en el sistema nervioso (Clarke, 1998).

Los R-nic musculares en los vertebrados se encuentran densamente ubicados en las membranas de las fibras musculares esqueléticas de vertebrados y forman sinapsis con las neuronas motoras en una región particular conocida como placa terminal o unión neuromuscular. En contraste, los R-nic musculares fetales, antes de que se forme la placa neuromuscular se encuentran difundidos a lo largo de toda la superficie de las fibras musculares (Aidle, 1998; Kandel y Siegelbaum, 2000b; Lindstrom, 2000).

En el sistema nervioso periférico (SNP), se ha identificado en RNAm de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$ y $\beta 4$ (Paterson y Nodberg, 2000; Sargent, 2000). En los humanos, el RNAm de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ está presente en muchas regiones cerebrales, y en la médula espinal en el primer trimestre de la etapa fetal (Zoli, 2000).

Los R-nic están presentes en varios ganglios del SNP, principalmente en las divisiones simpática y parasimpática. En estas divisiones, al producirse un potencial de acción presináptico, la AcCo es liberada por las terminales de las neuronas preganglionares, que al interactuar con R-nic evocan un potencial excitador postsináptico, lo suficientemente grande para generar un potencial de acción en las neuronas postganglionares (Iversen et al., 2000; Zoli, 2000).

En el SNC de vertebrados, los R-nic, en general, se expresan en baja densidad, y su patrón de distribución es relativamente heterogéneo, ver Tabla 5. (Clarke, 1999; Lukas, 1998; Paterson y Nordberg, 2000).

En las neuronas del SNC, la interacción de la AcCo con los R-nic produce una señal excitadora, la cual es integrada junto con otras señales, que pueden ser tanto excitadoras como inhibitoras, y subsecuentemente, si la señal integrada es suficiente para alcanzar en el cono axónico el potencial umbral, se producirá un potencial de acción. Los potenciales sinápticos excitadores producidos por una sola neurona típicamente son pequeños como para alcanzar el umbral de excitación y provocar un potencial de acción postsináptico (Kandel y Siegelbaum, 2000b).

En las neuronas del SNC los R-nic no están limitados a la terminal postsináptica, también se encuentran presentes en la presinapsis, en sitios extrasinápticos y en la perisinapsis, donde ellos podrían modular funciones neuronales. Además, la evidencia de su presencia en sinapsis típicas (R-nic postsinápticos) en el SNC es limitada y es probable que en muchos sistemas centrales funcione preferencialmente a través de la transmisión de volumen. Los R-nic postsinápticos son importantes en el control de la transmisión sináptica rápida en el hipocampo y la corteza cerebral (Clementi et al., 2000; Zoli, 2000).

Tabla 5. Distribución del RNAm que codifica para las subunidades que conforman los diferentes R-nic, en el sistema nervioso de humanos adultos (h) y ratas adultas (r). Se mencionan los sitios de mayor expresión.

SUBUNIDAD	REGIÓN
$\alpha 2$	Corteza (r), hipocampo(r), tallo cerebral (r)
$\alpha 3$	Corteza (rh), tálamo (rh), hipocampo (rh) y tallo cerebral (r)
$\alpha 4$	Corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (r), hipocampo (r), tallo cerebral (r) y cerebelo (r)
$\alpha 5$	Corteza (rh), hipocampo(rh), tálamo(h), tallo cerebral(r)
$\alpha 6$	Amígdala (r), tálamo (r), tallo cerebral (r)
$\alpha 7$	Corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (h), hipocampo (r), tallo cerebral (r), medula espina (r).
$\alpha 8$	ausente
$\alpha 9$	Adenohipófisis (r)
$\alpha 10$	Oído interno (h)
$\beta 2$	Corteza (rh), hipocampo(r), ganglios basales (r), tálamo(rh), hipotálamo (rh), retina (r), tallo cerebral (r), cerebelo (r) y médula espinal (r)
$\beta 3$	Hipocampo (h), ganglios basales (r), tálamo (rh), retina (r) y tallo cerebral (r)
$\beta 4$	Corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (rh), hipocampo (r) y tallo cerebral (r).

Datos tomados de Peterson y Nordberg, 2000; Sargent, 2000; Le Novère y Changeux, 2001.

Los R-nic presinápticos están involucrados en varias funciones como el aprendizaje, la atención, la consolidación de la memoria, la excitación sexual, la percepción del dolor y la regulación de la temperatura corporal. Los R-nic postsinápticos son importantes en el control de la transmisión sináptica en el hipocampo y la corteza cerebral. (Clementi et al., 2000).

III.6 ZINC

III.6.1 neurobiología del zinc

Un elemento importante que se encuentra relacionado con la depresión es el zinc (Zn^{2+}), cuando los pacientes se encuentran en periodos de depresión, el Zn^{2+} se encuentra alto, y después del tratamiento, el Zn^{2+} regresa a su valor normal. Antes de continuar con este punto, mencionaré algunas características de este elemento.

El zinc es un elemento traza muy abundante en el tejido nervioso donde forma parte de múltiples enzimas, proteínas estructurales y reguladoras (Berg y Shi, 1996). Estos iones han sido encontrados en neuronas por todo el cerebro y con altas concentraciones en la corteza cerebral y áreas límbicas. Aunque las cantidades mas altas se encuentran, riñones, hígado y hueso, y en menor cantidad en pulmón (Frederickson et al., 2000)

Se sabe que del total del Zn^{2+} en el cuerpo, más del 95% se encuentra dentro de las células, esta asociado con todos los organelos de las células y aproximadamente del 60 a 80% del Zn^{2+} celular es encontrado en el citosol. Una parte de este Zn^{2+} se encuentra en vesículas sinápticas de botones axónicos (Pérez-Clausell et al., 1989).

Diversos estudios *in vitro* muestran que los impulsos nerviosos provocan la liberación de Zn^{2+} junto con el neurotransmisor a glutamato (Assaf y Chung, 1984; Howell et al., 1991). Este Zn^{2+} podría actuar sobre los elementos postsinápticos, modulando la acción del neurotransmisor.

A los circuitos neuronales, neuronas y botones sinápticos que contienen Zn^{2+} vesicular se les denomina circuitos/neuronas/botones ricos en Zn^{2+} . Estos se encuentran en todos los vertebrados estudiados hasta ahora: peces, reptiles y aves. Los circuitos ricos en Zn^{2+} se encuentran predominantemente en la neocorteza, hipocampo, corteza periforme y amígdala. Estos circuitos forman vías muy densas de asociación cortical, también originan proyecciones descendentes al estriado y al hipotálamo (Casanovas et al., 1998).

III.6.2 Zinc y depresión

El zinc juega un papel importante en los estados depresivos. Observaciones clínicas mostraron una reducción en la concentración de zinc en el suero de pacientes con depresión (Maes et al., 1997; Schlegel-Zawadka et al 2000). Sin embargo, después de una terapia antidepresiva exitosa la concentración de zinc en el suero regresa a su valor normal (Maes et al., 1997; Nowak et al., 1993; 1999, Schlegel-Zawadka, et al., 2000). Por otro lado, con el

tratamiento electroconvulsivo, el zinc incrementa su concentración en el hipocampo y en menor grado en la corteza y el cerebelo (Nowak et al., 1999, 1991).

Estudios realizados con imipramina o citolopram muestran que la concentración de zinc en el cerebro de rata fue mayor en hipocampo (Nowak et al., 1999; 2001; Vaidya et al., 1999). Además, el zinc genera efectos parecidos a los de antidepresivos y hace más eficiente el efecto de la imipramina en la prueba de nado forzado (Krocza et al., 2000; 2001), este dato muestra que la imipramina induce a un incremento en la potenciación de zinc y a una inhibición del receptor a glutamato tipo NMDA (por las siglas en inglés N-Methyl-D-Aspartate). Así, se ha propuesto que este receptor podría estar participando en el mecanismo de acción de antidepresivos, respaldando la idea del papel crítico de la interacción en el mecanismo de acción de las drogas.

En ratas y ratones sometidos a la prueba de nado forzado y donde se mide la inmovilidad del animal, se observó que cuando se administra Zn^{2+} , una dosis muy baja de imipramina es efectiva en esta prueba, ya que el tiempo de inmovilidad se reducía hasta un 50%. Con esto se puede especular que implementado el zinc podría mejorar la terapia antidepresiva en la depresión de humanos. Si tal suplementación de tratamiento AD con zinc se combinara, se podría además emplear dosis efectivas más bajas de drogas antidepresivas en humanos. Además de que se podría disminuir el costo de los tratamientos antidepresivos (Krocza et al., 2000).

III.6.3 Zinc y receptores nicotínicos

Son pocos los estudios que han examinado el efecto del zinc en R-nic neuronales. Se ha mostrado que el zinc bloquea las respuestas de AcCo de neuronas parasimpaticas intracardiales de rata (Nutre y Adams, 1995), el zinc además reduce la respuesta inducida por AcCo de Zinc de R.nic homomericos $\alpha 7$ en ovocitos de *xenopus* (Palma et al., 1998).

Además se sabe que el grado de potenciación varia marcadamente dependiendo de la composición de las subunidades del receptor (Hsiao et al., 2001).

En las combinaciones de los receptores estudiados $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ se exhibió una modulación bifásica por zinc, mientras que en la combinación $\alpha 3\beta 2$ están solo inhibidos por zinc y la máxima potenciación del efecto del zinc se observo con el receptor $\alpha 4\beta 4$ (Hsiao et al., 2001).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se ha dado gran relevancia al estudio de la depresión desde muchos puntos de vista: estudios conductuales, clínicos y psicológicos. Sin embargo, al parecer aun no hay un tratamiento ideal, ya que gran parte de los pacientes que se encuentran en tratamiento, lo abandonan por la lentitud con la que se ven los resultados favorables. Se sabe que todos los AD, aun los más actuales, causan efectos secundarios: impotencia sexual, sueño, relajación muscular, entre otros. Lo cual lleva a que los pacientes en muchos casos dejen el

tratamiento farmacológico. Por otro lado, el tratamiento psicoanalítico no ofrece medicamentos, sino una terapia donde la palabra es la herramienta principal para poder llegar a esos factores que están causando la depresión.

Con relación a los AD, quizá una de las principales causas por las que el tratamiento es abandonado se debe a que el AD no actúa de inmediato sino semanas después, tiempo en el que el paciente al no ver resultado satisfactorio deja el medicamento. Otra causa es el temor a que el suministro de fármacos los haga dependientes a éstos. Gumnick y Nemeroff (2000) y Nemeroff y colaboradores (2002) mencionan que en general, todos los AD disponibles, a pesar de sus diferentes estructuras químicas, afectan la actividad monoaminérgica y tienen efectos indeseables, incluso lo más rápidos tardan un mínimo de dos semanas en iniciar su efecto terapéutico, no son efectivos en un 30% de los enfermos y no se sabe realmente mediante qué mecanismos de acción mejora la depresión. Estos fármacos no son aún los AD ideales; por lo tanto, es preciso continuar la búsqueda de nuevos AD.

El retardo en el comienzo de la acción de los AD podría explicarse por la activación de autoreceptores inhibidores en las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas, lo que inicialmente atenuaría los efectos de los AD sobre los niveles de Transmisores en la sinapsis; Pero, con el tiempo estos receptores se desensibilizarían y permitirían la emergencia de la respuesta antidepresiva (Nutt, 2002).

Por otro parte, se sabe que el zinc juega un papel importante en los estados depresivos. Observaciones clínicas demostraron una reducción significativa en la concentración de zinc en el suero de pacientes con depresión (Maes et al., 1997;

Schlegel-Zawadzka et al., 2000). Además, después de una terapia antidepresiva exitosa la concentración de zinc en el suero regresa a su valor normal (Maes et al., 1997; Nowak et al., 1993; 1999, Schlegel-Zawadzka et al., 2000). Por otro lado, en el tratamiento electroconvulsivo para la depresión el zinc incrementa su concentración en el hipocampo, en la corteza y el cerebelo (Nowak et al., 1991, 1999).

Además, está bien documentado que la función de los R-nic se modifica por una amplia variedad de sustancias endógenas que incluyen cationes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} (García-Colunga et al., 1997a; Palma et al., 1998; García-Colunga et al., 2001); y otros neurotransmisores, como la serotonina y la sustancia P (Grassi et al., 1993; García-Colunga y Miledi, 1994; 1995; 1996; 1999; García-Colunga y Miledi, 1997a, b; Ni y Miledi, 1997; Owens et al., 1997; Fryer y Lukas, 1999a; 1999b; López-Valdés y García-Colunga, 2001). Los R-nic también son modulados por sustancias antidepresivas, como son: la imipramina, trazadona, clomipramina, zimeldina, fluoxetina y norfluoxetina (García-Colunga et al., 1997a; Palma et al., 1998; García-Colunga et al., 2001).

Otro aspecto importante, es la aportación de Shytle et al. (2002), al proponer que la inhibición de los R-nic presenta evidencias que sugieren que la neurotransmisión hipercolinérgica está asociada con los estados de humor depresivos y podría estar parcialmente mediada a través de la excesiva activación de los R-nic y las acciones terapéuticas de muchos AD, podría estar en parte mediada a través de la inhibición de estos receptores.

En conjunto, tomando esta información y resaltando que los R-nic son modulados por el zinc y los AD, así como la importancia que el zinc tiene en las

terapias con Ad, planteo la siguiente pregunta ¿Cómo están funcionando los R-nic neuronales al co-aplicar zinc y AD?

Este panorama podría presentarse en las personas que toman zinc y AD, estudios que está realizando Nowak y colaboradores en rata, ratón. Nuestra finalidad es comprender qué es lo que está ocurriendo a nivel molecular con los R-nic.

En conjunto, todos estos estudios permiten plantear la siguiente hipótesis de trabajo.

V. HIPÓTESIS

La fluoxetina y algunos antidepresivos, inhibidores de la recaptura de monoaminas, modifican los efectos que el zinc ejerce sobre los R-nic. y viceversa, el zinc modifica los efectos que algunos antidepresivos ejercen sobre los R-nic.

VI. OBJETIVOS

1. Presentar brevemente un enfoque neurobiológico de lo que es la depresión, causas, tratamientos.
2. Desde la neurobiología estudiar la modulación e interacción de los R-nic neuronales ($\alpha 4\beta 4$) por zinc y los antidepresivos (fluoxetina, imipramina y trimipramina).

3. Realizar un análisis comparativo acerca del bloqueo y/o potenciación del zinc y los antidepresivos (fluoxetina, imipramina y trimipramina) sobre los R-nic neuronales ($\alpha 4\beta 4$)
4. Proponer un posible mecanismo de acción de la combinación de ambos tipos de sustancias, aplicados en diferente secuencia: antidepresivos \rightarrow zinc o zinc \rightarrow antidepresivos, a fin de entender cómo actúan estas sustancias, así como la posible participación de los R-nic en la depresión.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

Los protocolos experimentales consistieron básicamente en obtención de RNAm de los R-nic $\alpha 4$, $\beta 4$ y registros electrofisiológicos en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, los cuales fueron utilizados como sistemas de expresión heterólogos de R-nic de la forma fetal del subtipo neuronal de rata ($\alpha 4\beta 4$). La expresión de R-nic se obtuvo mediante la microinyección de ARNm complementario (cRNAm) de las subunidades que conforman cada subtipo R-nic.

Para obtener el material biológico con el que se inyectó a los ovocitos, se utilizaron los siguientes materiales:

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Vector pSP64 donde se encontraba insertado el gen de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 4$ del receptor nicotínico neuronal.

Bacterias competentes.

Medio de cultivo líquido y sólido LB.

Kit Quiagen para purificar bacterias.

Enzimas de linearización.

Kit de transcripción.

Soluciones utilizadas para la conservación de los ovocitos y registro:

De Barts con gentamicina

De registro Ringer para la perfusión

Para los microelectrodos potasio 3 M

Reactivos:

Los inhibidores de los sistemas de recaptura de monoaminas (fluoxetina, imipramina, trimipramina)

Cloruro de Zinc

Para obtener el material biológico con el que se inyectó a los ovocitos, se utilizó el siguiente protocolo:

VIII.1 Bacterias Competentes

Cultivar bacterias TB1 en medio LB a 37 °C en agitador, durante 1 día. Colocar 1 ml del cultivo en 200 ml de medio LB. Medir la absorbancia de la mezcla en el espectrofotómetro y tomarla como referencia para las siguientes determinaciones. Cultivar la mezcla a 37°C en agitador automático, durante 2 horas con 30 minutos o hasta que la absorbancia sea igual a 400 tomando como referencia la primera muestra. Verter la mezcla en tubos Falcon y centrifugar a 7000 rpm por 5 minutos. Tirar el sobrenadante. Agregar 10 ml de CaCl₂ con una temperatura de 4°C. Suspender la solución utilizando el Vortex. Incubar durante 30

minutos. Centrifugar a 7000 rpm durante 5 minutos. Tirar el sobrenadante. Agregar 2 ml de CaCl_2 a 4°C . Suspender la solución en Vortex. Almacenar solución a una temperatura de 4°C . Las que no se utilizan, guardarlas a -80°C , con glicerol. 15ml de bacterias por 5 ml de glicerol.

VIII.2 Transformación de bacterias

Una alícuota de bacterias competentes se deja descongelar el hielo. Se le ponen 5 ng de DNA de interés y se le dan ligeros golpes para agitar toda la solución. Se deja incubar en hielo durante 30 minutos. Se coloca la alícuota del DNA en un baño de agua a 42°C durante 50 segundos. Se coloca la alícuota en hielo durante 2 minutos. Se le añade 200 microlitros (μl) de medio LB sin ampicilina. Se pone en agitación durante 45 minutos a 37°C . Una vez terminado el periodo se toman 50 μl , y se colocan sobre una caja Petri con medio LB/ampicilina y se espatula la solución (esto se hace cerca del mechero). Se deja secar el líquido 30 minutos a temperatura ambiente. Se guardan a 37°C durante 16 horas con el agar hacia arriba. Al día siguiente deberán crecer colonias blancas de un solo tipo.

VIII.3 Multiplicación del plásmido

De las bacterias que se obtuvieron de la transformación, se toma una colonia con una asa bacteriológica, de las que se encuentran aisladas, de tal manera que no toque otras colonias. Se pone en 200 ml de medio LB con ampicilina. Se agita a 200 rpm y una temperatura de 37°C durante 16 horas.

Pasado este tiempo se colocan en el hielo para detener el crecimiento, mientras se realiza un MINIPREP (extracción de pequeñas cantidades de DNA).

VIII.4 Detección de DNA en geles de agarosa

Se utiliza el siguiente kit: MINIPREP (SISTEMA DE PURIFICACIÓN RÁPIDA DE PLÁSMIDOS). KIT: CONCERT, Rapid gel extraction system (50 reactions) Gibco BRL No. de Cat. 11456-019.

Procedimiento:

Realizar todas las centrifugaciones a temperatura ambiente. Precalear una alícuota de amortiguador TE a 65-70°C. Verificar que el amortiguador de suspensión de células (G1) contenga la RNasa, si no agregársela. Verificar que la suspensión de lisis de células no tenga precipitados (G2). Verificar que el etanol se haya adicionado al amortiguador de lavado. Recolección celular: Centrifugar de 1 a 5 ml de bacterias durante 2 a 5 minutos a 10,000 rpm (microcentrifuga). Tirar el sobrenadante y trabajar con la pastilla. En la suspensión de células, adicionar 210 µl de amortiguador G1, que contenga RNasa, hacer una mezcla homogénea. Lisis de células: agregar 210 µl de la solución de lisis celular G2. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo 5 veces, la suspensión de células se debe aclarar casi inmediatamente, si no es así, continúe invirtiendo el tubo hasta que se aclare. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Neutralización: agregar 280 µl de amortiguador de neutralización (G3) y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo 5 veces. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10,000 rpm. Cargar el cartucho: colocar un cartucho de centrifugación en un tubo de lavado de 2 ml. Cargar el

sobrenadante obtenido en el paso anterior y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min. Descartar el fluido que pasó a través del cartucho. Lavado opcional (este lavado es recomendado por el protocolo de miniprep, cuando se han usado bacterias ricas en nucleasas, por ejemplo: Poly-A⁺. Colocar la parte de atrás del cartucho de centrifugado en el tubo de lavado de 2 ml y agregar 500 µl de amortiguador de lavado opcional (GX) al cartucho de centrifugado, incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min. Descartar el fluido que pasó a través del cartucho. Lavado del cartucho: colocar la parte de atrás del cartucho de centrifugado dentro de un tubo de lavado de 2 ml. Agregar 700 µl de amortiguador de lavado (G4) asegurarse de que contenga etanol. Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min, descartar el fluido que ha pasado por el cartucho, centrifugar por 1 min. Para remover el amortiguador residual. Elución del plásmido: Colocar el cartucho de centrifugado dentro de un tubo de recuperación de 1.5 ml. Agregar 75 µl de amortiguador TE caliente directamente al centro del cartucho de centrifugado, incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos. Preparar un gel, y cargar con 1 – 2 µl de la muestra. Observar la calidad del DNA en la cámara de electroforesis.

VIII.5 Purificación de DNA

De la muestra que se dejó en hielo se purifica el DNA por medio del kit de MAXIPREPS DE QUIAGEN (Plasmid Maxi Kit).

Procedimiento:

El cultivo de bacterias de toda la noche se centrifuga a 6,000 rpm durante 20 min a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se elimina el exceso del mismo. El botón resultante de los 200 ml de cultivo se resuspende en 10 ml de amortiguador P1 al que previamente se le añadió la RNasa A. Se agregan 10 ml de amortiguador P2, se mezcla la solución invirtiendo el tubo unas 8 veces y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Pasado este tiempo se le adiciona 10 ml de amortiguador P3, se mezcla invirtiendo el tubo unas 8 veces y se deja reposar el hielo durante 20 min. Se centrifuga a 6,000 rpm a 4°C durante 30 min. Unos 10 min antes de que termine de centrifugarse la muestra, preparar una columna de la siguiente forma: Aplicar 10 ml de amortiguador QBT y dejar que salga todo el líquido. El líquido resultante se filtra a través de una gasa limpia y se deposita en otro tubo. El líquido limpio se vaciará a la columna y se deja que salga todo este líquido de la columna. Al terminar, aplicar 30 ml de amortiguador QC. Al terminar volver a aplicar 30 ml de amortiguador QC para lavar por segunda vez. Cambiar la columna a un tubo de recolección limpio (estéril). Aplicar a la columna 15 ml de amortiguador QF. A este líquido se le añaden 15 ml más de iso-propanol, se mezclan y se guarda a -30°C por 20 min. (En caso de que no se pueda continuar trabajando con la muestra se puede quedar guardada por tiempo indefinido). Centrifugar la muestra a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C. Decantar el sobrenadante. A la pastilla añadir 5 ml de etanol al 70%. Centrifugar la muestra a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. Decantar el sobrenadante. Dejar escurrir el tubo invertido durante 15 min. Disolver la pastilla en 300 µl de agua estéril. Cuantificar la muestra en el espectrofotómetro. Si considera necesario, hacer un gel. Pasar

esta solución a un tubo eppendorff y etiquetarlo (nombre de la muestra, concentración, fecha, DNA total). La muestra obtenida es DNA circular y se debe de guardar a -20°C por tiempo indefinido.

VIII.6 Cuantificación del DNA

Se toma $1\ \mu\text{l}$ de la muestra de DNA y se resuspende en $399\ \mu\text{l}$ de agua estéril. Se mezcla bien (no es recomendable hacerlo en la cubeta, sino en un tubo eppendorff). Se enciende el espectrofotómetro. Se espera 3 a 4 min a que se calibre. Poner en la celda de cuarzo $400\ \mu\text{l}$ de agua estéril y colocarla en el carril azul (que da la lectura del blanco). Elegir en la pantalla el método de ácidos nucleicos. Elegir DNA, darle "enter" a las dos opciones del programa. Medir el blanco que debe de dar cero en todas las pantallas. Medir la muestra de DNA. Se toma como referencia la lectura 260 nanómetros (nm) y ese valor se apunta.

La fórmula para obtener la concentración de DNA es:

- A) el valor que da en la lectura de 260 nm
- B) 50 (este valor no cambia)
- C) Dilución
- D) Se divide entre 1,000 para obtener $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Ejemplo:

Lectura a 260 nm es 0.106

La dilución es de 400

$$0.106 \times 50 \times 4000 = 2120/1000 = 2,12\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

VIII.7 Linearización con enzimas de restricción

Se toman 50 μg de DNA (se estima con base en la concentración del DNA extraído por el método Quiagen).

Se ponen 0.2 μl de enzima por cada μg de DNA. La regla es 2 unidades de enzima por cada μg de DNA. Se pone el amortiguador de la enzima (que siempre viene a una concentración 10X) y el volumen necesario para que al final quede una concentración 1X. Se adiciona agua la necesaria. Se mezcla todo, se centrifuga brevemente. Se incuba a 37°C durante 1.5 h. Se hace un gel con 0.5 μg del DNA linearizado, para asegurarse de que la muestra de haya linearizado, de no haberse linearizado se le agrega la enzima y se incuba una hora más. Se hace un gel, para observar que la muestra ya se encuentre linearizada.

Ejemplo para linearizar la muestra de DNA con enzimas de restricción.

β_2 TOTAL: 1.42 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Formula: $V = M/C$ (V = volumen, M = masa, C = concentración)

$$V = 50 \mu\text{g} / 1.42 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 35.21$$

DNA 35.21 μl

HIND 10 μl 0.2 X 50= 10 μl

BUFFER 6 μl 1 μl por cada 10 μl del volumen total

AGUA 8.79 μl Aforar para llevar a un volumen final de 60 μl

TOTAL: 60 μl

El orden en que se le agregan los reactivos al tubo de reacción es el siguiente:

1) DNA, 2) AGUA, 3) BUFFER, 4) LA ENZIMA

VIII.8 Purificación del DNA con fenol-cloroformo

Llevar a la mezcla de reacción de linearizado de DNA a un volumen de 100 μ l de amortiguador TE pH=8 en agua DEPC (0.1%) mezclar suavemente 20 veces. Poner 50 ml de fenol saturado (con amortiguador TE pH. 8.0 en agua DEPC (0.1%)), y 50 ml de solución SEGVA a la mezcla y agitar suavemente 20 segundos. Centrifugar 3 minutos a 10,000 rpm, a temperatura ambiente. Recuperar la fase superior en otro tubo con mucho cuidado para evitar se mezcle la muestra con el fenol. Agregar 100 μ l SEGVA y agitar suavemente 20 segundos. Centrifugar 3 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Resuspender el volumen de la fase superior en otro tubo con 1/10 acetato de sodio 3M pH 6.0 y 2.5 volumen de etanol 100% enfriado el hielo. Incubar a -70°C 15 min. Centrifugar 20 min a 4°C a 10,000 rpm. Sacar parte del sobrenadante con una pipeta, sin tocar las paredes de tubo, y luego decantar el tubo, de esta manera se evita que la muestra se salga con el sobrenadante. A la pastilla agregar etanol al 70% en DEPC. Centrifugar 15 min a 4°C a 10,000 rpm. Decantar el sobrenadante con una pipeta y luego voltearlo sobre un papel para que escurra todo el etanol. Secar la pastilla en el "speed vac" durante 4 min. Resuspender en agua estéril desionizada (DEPC 0.1%) 50 μ l para que quede una concentración final de aproximadamente

1µg/µl. Leer en el espectrofotómetro, siguiendo los pasos de la lectura del DNA total. Guardar a -20°C por tiempo indefinido.

VIII.9 Transcripción *In vitro*

Por medio de este método se obtiene el RNA, material que es inyectado a los ovocitos.

REACTIVO	CANTIDAD µl	MARCA
Buffer de transcripción 5x	10	Promega
DTT 100 mM	5	Promega
*Mezcla de nucleotidos	9	Promega
Capping 2.5 mM	12	Promega
DNA	10	
RNasin	1.5	Promega
**Polimerasa (SP6,T7,T3)	2.7	Promega
AGUA	La necesaria	
Volumen final	50	

* La mezcla de nucleótidos se hace poniendo:

2 μ l de ATP

2 μ l de CTP

2 μ l de TTP

1.5 μ l de GTP

** La polimerasa es: SP6, 2.7 μ l y no se le agrega agua ó 0.8 μ l de T3 o T7 y se le va agregar agua al tubo de reacción.

Sacar los reactivos que se congelan (buffer de transcripción, DTT, mezcla de nucleótidos, "capping" y descongelarlos, ambientarlos unos 5 min, adicionarlos como indica la lista y no poner el tubo de reacción en hielo. Es importante que las enzimas se saquen del congelador cuando ya se adicionaron en el tubo los otros reactivos (la mezcla de nucleótidos se prepara previamente, para ser utilizada en el tubo de reacción) las enzimas que se van utilizar son RNasin y la polimerasa. Una vez adicionado todo, bajarlo por centrifugación e incubar a 37°C durante 2 h. Pasado este tiempo reagregarle la misma cantidad de polimerasa inicial e incubar 2 h. Pasado este tiempo adicionar 1 unidad de DNasa por cada microgramo de ADN linearizado, e incubar 15 min más, al final hacer la purificación del transcrito por fenol-cloroformo (10 μ l por cada 10 μ g de ADN).

VIII. 10 Purificación del RNA con fenol cloroformo

A la mezcla de reacción de 50 μ l de RNA transcrito agregar 100 μ l de agua DEPC (0.1%). Poner 75 μ l fenol saturado con amortiguador TE (pH 4.5 en agua

DPC) y 75 μ l de SEVAG (cloroformo 24 parte y 1 parte de alcohol isoamílico) mezclar agitando unas 20 veces. Centrifugar 3 min a 10,000 rpm temperatura ambiente, recupere la fase superior a otro tubo, ésta es la de interés. Agregar 150 μ l cloroformo isoamílico 24:1 mezclar agitando suave 20 segundos. Centrifugar 3 min a 10,000 rpm temperatura ambiente, recupere la fase superior a otro tubo, ésta es la de interés. Por segunda vez agregar 150 μ l cloroformo isoamílico 24:1 mezclar agitando suave 20 segundos. Centrifugar 3 min a 10,000 rpm temperatura ambiente, recupere la fase superior a otro tubo, ésta es la de interés. Resuspenda el volumen final de la fase superior en otro tubo con 0.5 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volumen de etanol al 100% enfriado en hielo. Incubar a -70°C por 30 min. Centrifugar 20 min a 4°C a 12,000 rpm. Lavar con 1 ml de etanol al 70% una vez, y centrifugar 10 min a 10,000 rpm. Secar en el "speed vac" 2 min. Resuspender en 5 μ l de agua DPC 0.1% calentada a temperatura ambiente. Cuantificar el RNA transcrito de la siguiente forma.

VIII.11 Cuantificación del transcrito

Se toma 1 μ l de la muestra de transcrito y se resuspende en 399 μ l de agua estéril y se mezcla bien. Se prende el espectrofotómetro. Esperar de 3 a 4 min para que se calibre. Poner en la celda de cuarzo 400 μ l de agua estéril y colocarla en el carril azul (que da la lectura del blanco. Elegir en la pantalla el método de ácidos nucleicos. Elegir RNA, darle "enter" a las dos opciones del programa. Medir el blanco que debe de dar cero en todas las pantallas (tarda 10 min en leerlo).

Poner la muestra en el carril siguiente y darle "run" para que inicie la segunda lectura. Se toma como referencia la lectura 260 nm y ese valor se apunta, para obtener los cálculos de la concentración del RNA. Fórmula para obtener la concentración del RNA. La lectura que da en la pantalla multiplicarla por 260 por 40 y por la dilución (en este caso es 400), el resultado se divide ente 1,000 para obtener $\mu\text{g} / \mu\text{l}$.

De acuerdo a la concentración obtenida, se diluye el transcrito para dejarlo a la concentración deseada y ser inyectado a los ovocitos.

VIII.12 Disección de la rana y microinyección de ovocitos

Se toma una rana hembra *Xenopus laevis* adquiridas en Nasco (Fort Atkinson, WI. USA). Para obtener los ovocitos se anestesia la rana y se colocan sobre una cama de hielo. Se extraen los ovarios realizando un corte en la piel de aproximadamente un centímetro en diagonal a la línea media de la región abdominal, se obtienen los ovocitos se guardan en solución de Barth a temperatura de 18°C hasta que fueron seleccionados. Se separan los ovocitos del epitelio, bajo un estereomicroscopio. Se guardan a 18°C.

Al día siguiente se inyectan cada uno de los ovocitos con 50 ng de RNA que codifica a las subunidades de interés con ayuda de un microinyector (nanoliter injector, World Precision Instruments, Inc). La inyección del material genético fue realizada en el polo vegetal del ovocito.

Las micropipetas de inyección fueron preparadas en un estirador de pipetas (Sutter P-30) con capilares de vidrio (Drumond Scientific). Después de la inyección

los ovocitos se mantuvieron en frascos con solución de Barth con gentamicina (renovando la solución diariamente) a una temperatura de 18°C.

Dos días después de la microinyección, la capa folicular que envuelve a los ovocitos fue removida mediante un tratamiento enzimático de colagenasa tipo 1A, se remueve la colagenasa y se guarda dos días más en solución de Barths a 18°C.

VIII.13 Registro electrofisiológico

Los registros de las corrientes iónicas se llevan a cabo mediante la técnica de fijación de voltaje (voltaje-clamp) con dos microelectrodos. Los microelectrodos son elaborados con capilares de borosilicato con microfilamento. El ovocito se colocó en una cámara de registro con de flujo continuo de Ringer normal o aplicaciones de dos minutos de las soluciones aplicadas.

Los ovocitos se mantuvieron a un voltaje de -60 mV (a través de un amplificador comercial) posteriormente los resultados fueron analizados con los programas de computación Nicolet y Origin.

IX. RESULTADOS

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* tienen en su membrana, ocasionalmente, receptores nativos para AcCo de tipo muscarínico. En respuesta a AcCo, estos ovocitos generan una corriente entrante oscilatoria (Kusano et al., 1977). Este estudio se realizó en ovocitos cuyos controles (ovocitos no inyectados) no presentaron la respuesta antes mencionada, al aplicarle una concentración alta de AcCo (100 μ M).

En este trabajo se evaluaron los efectos del catión divalente zinc y de los antidepresivos fluoxetina, imipramina y trimipramina, en ovocitos que expresaban R-nic neuronales. Los dos tipos de sustancias fueron aplicados tanto de manera individual como simultanea.

IX.1 Corrientes control activadas con AcCo

Así, en un ovocito inyectado con RNA que codifica para las subunidades α 2 y β 4 de R-nic neuronales de rata, se aplicó AcCo a diferentes concentraciones, lo que generó una inflexión hacia abajo, que por convención representa una corriente entrante de cargas positivas o cationes. Con 2 μ M de AcCo la corriente máxima fue de 133 nA (Figura 7a). La magnitud de la corriente va disminuyendo lentamente durante el tiempo de aplicación de AcCo, a los dos minutos la corriente llegó al 74% de la corriente máxima (99 nA). Al retirar la AcCo la corriente regresó a la basal (0 nA). La aplicación de una concentración mayor de AcCo (10 μ M) generó una respuesta mayor y más rápida que la del caso anterior (Figura 7b),

cuyo valor máximo fue de 340 nA, el decaimiento fue más marcado, llegando al 53% de la corriente máxima (180 nA) después de dos minutos con AcCo. Al retirar la AcCo la corriente regresó a la basal. Cuando se aplicó una concentración de AcCo aún más alta (100 μ M), la corriente fue mayor y más rápida (Figura 7c); la respuesta se puede observar en la forma casi vertical de la corriente, llegando a un valor máximo de 646 nA. La respuesta decae todavía más rápido, alcanzando el 31% la respuesta máxima (209 nA) a los dos minutos. Al retirar la AcCo se observa que la corriente no llega a la basal.

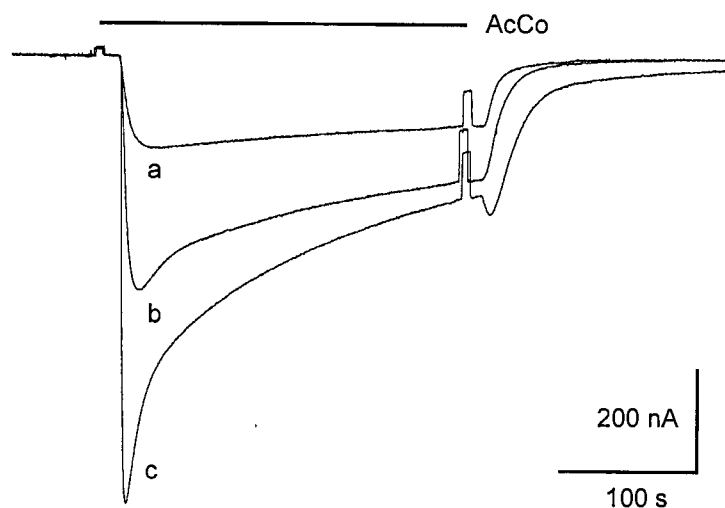


Figura 7. Corrientes control inducidas con AcCo. Registros de corrientes inducidas con 2 μ M (a), 10 μ M (b) y 1000 μ M (c) de AcCo en un ovocito que expresó R-nic neuronales α 2 β 4 de rata. El potencial de mantenimiento fue de -60 mV en todos los experimentos. En todas las figuras de los experimentos eléctricos, el tiempo de aplicación de la AcCo está representado por una línea continua. También, el inicio y término se marca con un pulso de despolarización de 20 mV con el que se detecta el cambio en la conductancia de la membrana del ovocito.

IX.2 Modo de evaluación de las sustancias de estudio

A continuación se describe cómo se evaluaron los efectos de los antidepresivos (AD) utilizados, fluoxetina, imipramina y trimipramina, sobre la corriente activada por AcCo.

Todos los resultados están representados como el porcentaje de la **corriente inducida por AcCo modificada** por las sustancias de estudio: el zinc, el AD o ambos, en comparación con la tendencia de la **corriente control** correspondiente.

Esta comparación da un número: a) menor a 100 en caso de una inhibición y b) mayor a 100 en caso de una potenciación.

Para ilustrar un ejemplo utilizó el 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tatratin (8-OH-DPAT), agonista para receptores a serotonina tipo 1A. Inicialmente, la respuesta control se obtuvo al aplicar AcCo (500 nM) durante cinco minutos, lo que generó una corriente entrante. La respuesta máxima fue de ~150 nA. La corriente disminuyó muy poco en presencia de AcCo al 96% de la respuesta máxima (Figura 8a), indicando que hay muy poca desensibilización de los receptores. Al retirar la AcCo y regresar a RN, la corriente regresó a la basal.

Después de 10 minutos de lavado con RN se realiza una segunda aplicación de AcCo por un minuto, al igual que en la primera aplicación se generó una corriente de ~150 nA (Figura 8b).

Después, en presencia de la AcCo se aplicó 10 μ M de 8-OH-DPAT por un minuto, la respuesta disminuyó rápidamente al 54% de la corriente de AcCo control (80 nA) al final de la aplicación del fármaco (Figura 8c, línea punteada). Nótese que es

un valor menor al 100%, lo que corresponde a una respuesta que fue inhibida por el fármaco.

Al retirar el 8-OH-DPAT y regresar a AcCo, la corriente sólo se recuperó al 84% (Figura 8d). Se regresó a RN y la corriente regresó a la basal.

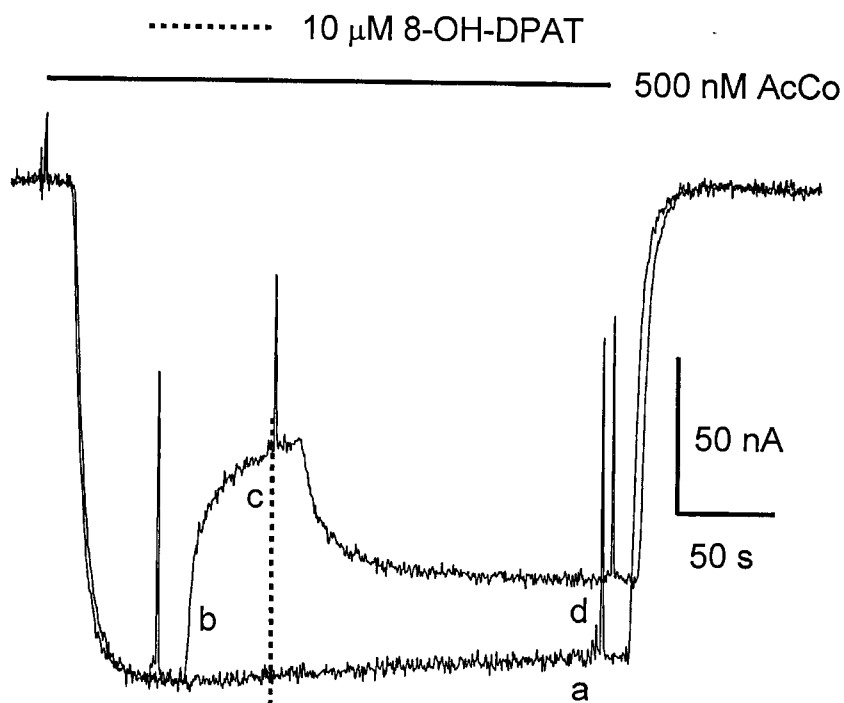


Figura 8. Inhibición de la corriente inducida con AcCo por 8-OH-DPAT. Dos registros empalmados, de la corriente control inducida con 500 nM de AcCo (a) en un ovocito que expresó R-nic $\alpha 2\beta 4$ y la corriente inhibida con 10 μ M de 8-OH-DPAT (b, c y d). El tiempo de aplicación del 8-OH-DPAT está indicado por una línea punteada.

En modelos de depresión en animales, la combinación de zinc y el antidepresivo imipramina presentan efectos sinérgicos (Krocicka et al., 2001;

Nowak et al., 2003), es decir el efecto total es mayor que la suma de los efectos individuales. Siguiendo esta idea, nosotros decidimos explorar con más detalle el efecto de zinc y antidepresivos en R-nic neuronales.

IX.3 Formas de aplicación de las sustancias

La secuencia en la que se aplicaron las sustancias de estudio fue de dos maneras.

La primera la denotaremos como **AcCo** → **Zn²⁺** → **AD**.

A los ovocitos que expresaron R-nic, inicialmente se les aplicó AcCo durante dos min, a una concentración de 1-10 μM . En presencia de AcCo se aplicó, durante 2 min 200 μM Zn²⁺. Después, en presencia de AcCo y Zn²⁺, se aplicó durante 2 min 5 μM AD (fluoxetina, imipramina o trimipramina). Para retirar las sustancias de la perfusión fue en sentido inverso, es decir, se quitó el AD, dejando AcCo y Zn²⁺, posteriormente se removió al Zn²⁺, dejando solo AcCo, y finalmente se regresó a RN.

La segunda la llamaremos como **AcCo** → **AD** → **Zn²⁺**.

La secuencia de aplicación fue, resumiendo: AcCo (1-10 μM) durante 2 min, se adiciona 5 μM AD durante 2 min y se le agrega 200 μM Zn²⁺ durante 2 min. Se retiran, primero el Zn²⁺, después el AD y por último la AcCo.

IX.4 Acciones combinadas de Zn²⁺ y fluoxetina sobre R-nic

En ovocitos que expresaron R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$, la corriente control se generó con AcCo (Figura 9A,B a). Primero, la corriente de AcCo, cuya amplitud

fue de 326 nA se incrementó 331% (1046 nA) al adicionarle zinc (Figura 9A b). En presencia del catión se añadió la fluoxetina, reduciéndose al 14% (108 nA) de la corriente potenciada por zinc, más allá de la corriente control en ausencia de zinc (Figura 9A c).

Segundo, la corriente de AcCo de amplitud 1685 nA fue inhibida al 29% por fluoxetina (Figura 9B b). En presencia de fluoxetina se añadió zinc (Figura 9B c), sin observarse efecto.

En el primer caso, las dos sustancias ejercieron los efectos esperados: potenciación por zinc e inhibición por fluoxetina (Figura 9A b, c). En contraste, y de manera interesante, en el segundo caso el zinc no tuvo su efecto potenciador cuando la fluoxetina primero inhibió la corriente de AcCo (Figura 9B b, c). Nótese que la fluoxetina continuó inhibiendo la respuesta, aún después de dos minutos de aplicación de zinc (Figura 9B c). Y entonces, después de remover al zinc, dejando la fluoxetina, la corriente de AcCo continuó disminuyendo (Figura 9B d).

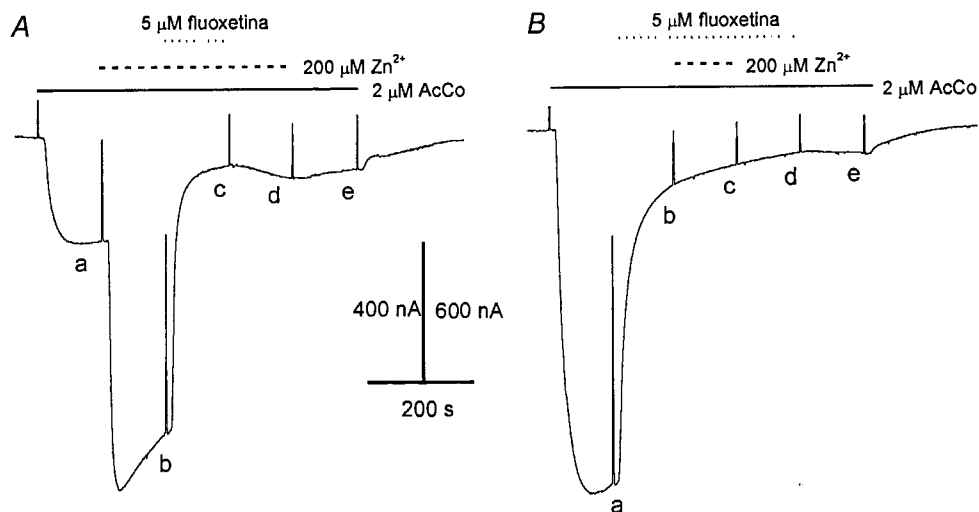


Figura 9. Aplicación simultánea de zinc y fluoxetina en R-nic neuronales. Se obtuvo la corriente control de AcCo, zinc fue aplicada y después fluoxetina (A), o fluoxetina y después zinc (B). Las letras (a-e) son para resaltar los efectos de cada sustancia. Los registros son de diferentes ovocitos. En esta y en las siguientes figuras, el tiempo de aplicación de la AcCo está indicado por una línea continua, el del antidepressivo (fluoxetina) por una línea de punteado corto el del zinc por una línea de punteado largo.

IX.5 Acciones combinadas de Zn²⁺ y otros antidepressivos sobre R-nic

Las Figuras 10 y 11 muestran los efectos de imipramina y trimipramina sobre los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$ respectivamente, los cuales fueron, en términos

generales, muy parecidos a los efectos de fluoxetina (ver Figura 9). Los resultados se resumen en la Tabla 6.

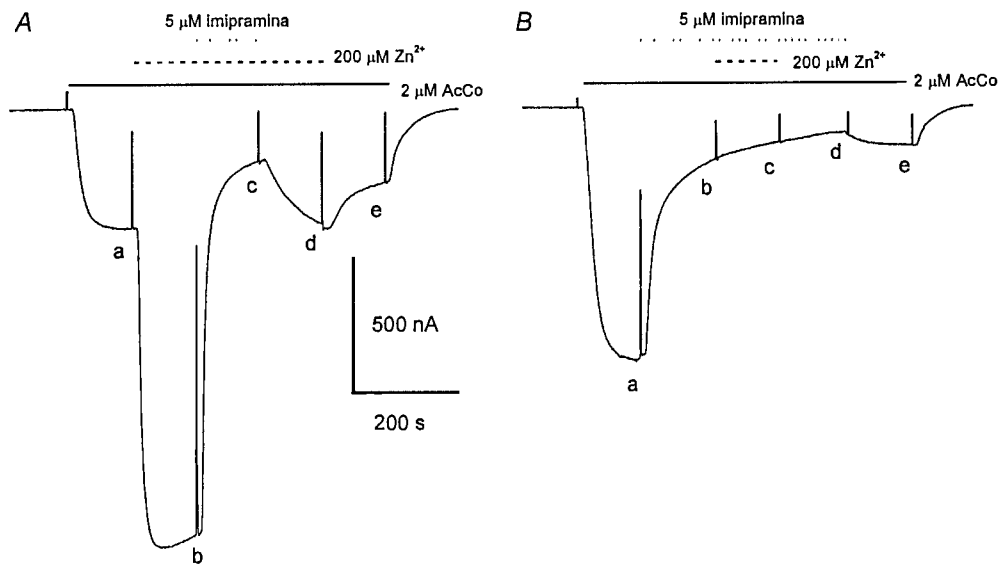


Figura 10. Aplicación simultanea de zinc e imipramina en R-nic neuronales. Se obtuvo la corriente de AcCo control, zinc fue aplicado y después imipramina (A), o imipramina y después zinc (B). Los registros son del mismo ovocito.

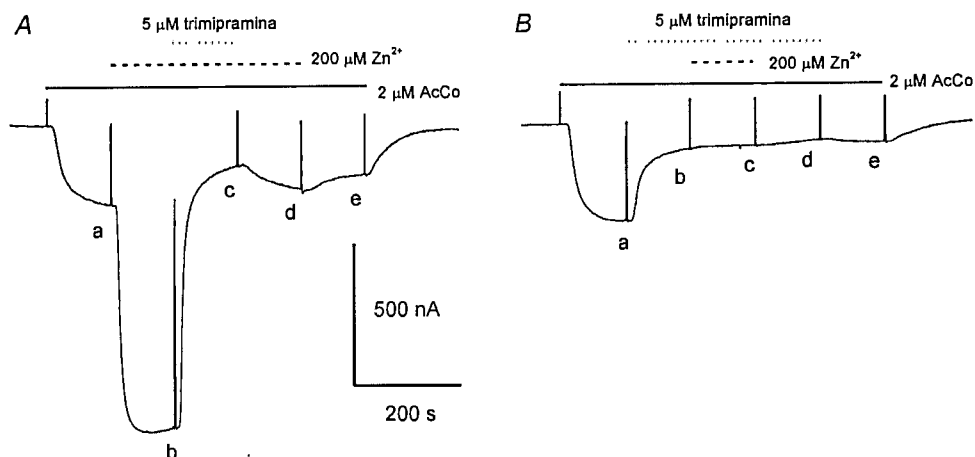


Figura 11. Aplicación simultanea de zinc y trimipramina en R-nic neuronales. Se obtuvo la corriente de AcCo control, zinc fue aplicado y después trimipramina (A), o trimipramina y después zinc (B). Los registros son del mismo ovocito.

Tabla 6. Acciones combinadas de Zn^{2+} y antidepresivos sobre R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$.

Aplicación	Fluoxetina (Figura 9)	Imipramina (Figura 10)	Trimipramina (Figura 11)
AcCo	326	439	223
AcCo → zinc	1046 (331)	1635 (384)	879 (380)
AcCo → zinc → AD	108 (14)	200 (13)	118 (16)

AcCo → zinc	146 (38)	425 (29)	180 (23)
AcCo	123	275	139
AcCo	1685	935	277
AcCo → AD	279 (29)	196 (22)	71 (26)
AcCo → AD → zinc	181 (18)	131 (18)	21 (23)
AcCo → AD	133 (13)	95 (10)	48 (17)
AcCo	126	145	54

Los números corresponden a la corriente eléctrica (en nA) en presencia de cada sustancia. Los números entre paréntesis representan el efecto inhibitorio de la sustancia (menor al 100%) y el efecto potenciador (mayor a 100%). Los datos son representativos de al menos tres experimentos en diferentes ovocitos.

Aun cuando el grado de inhibición de los tres antidepresivos (fluoxeina, imipramina y trimipramina) sobre los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$ es similar (Tabla 6), al comparar las Figuras 9, 10 y 11 (B,e), se observa que el efecto de fluoxetina y la trimipramina es más duradero que el de imipramina, ya que con esta última la recuperación de la respuesta potenciada por Zn^{2+} es mayor.

En la aplicación de AcCo → trimipramina → Zn^{2+} (Figura 11B,e) se puede observar un ligero efecto potenciador del Zn^{2+} , aunque no con la misma magnitud que al aplicar antes la trimipramina.

Cuando se aplica primero Zn^{2+} y después un AD, la corriente control se recupera casi al 100%. En contraste, si el orden de aplicación es opuesto (AcCo \rightarrow Zn^{2+} \rightarrow trimipramina), la respuesta queda muy inhibida.

IX.6 Efectos en función del voltaje de Zn^{2+} y fluoxetina en R-nic neuronales

Se exploraron los efectos de zinc y fluoxetina en función del potencial de membrana sobre la corriente de AcCo. Así, a partir de -60 mV se aplicaron rampas de voltaje (de -120 a 40 mV durante dos segundos) a distintos tiempos durante la aplicación de AcCo, zinc y fluoxetina (Figura 12).

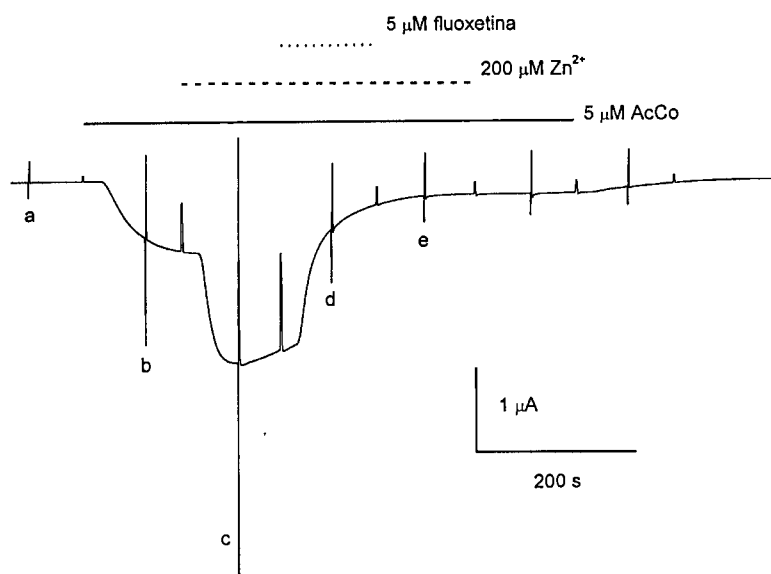


Figura 12. Respuestas de rampas de voltaje en R-nic neuronales. Registro representativo de la corriente de Aco y los efectos de la combinación de zinc y fluoxetina. Las líneas verticales (a-e) son las corrientes de membrana inducidas por las rampas de voltaje (de -120 a 40 mV, durante 2 s).

Las relaciones corriente-voltaje (I-V) para las diferentes respuestas fueron obtenidas restando la respuesta generada por la rampa de voltaje en solución de Ringer normal de la respuesta generada por la rampa de voltaje en las otras soluciones. La relación I-V en presencia de AcCo más zinc dependió ligeramente del voltaje (Figura 13A) e incrementó aproximadamente tres veces la corriente de AcCo control a todos los voltajes (Figura 13A relación). Por otro lado, el bloqueo por fluoxetina de la corriente de AcCo potenciada con zinc fue fuerte (Figura 13B) e independiente del voltaje (Figura 13B relación), indicando que tanto el zinc como la fluoxetina interactúan en un región externa del complejo receptor-canal. Todas las relaciones I-V mostraron que el potencial de inversión no cambió (~ 12 mV) y presentaron la rectificación entrante característica de la corriente de AcCo mediada por R-nic neuronales (García-Colunga et al., 1997), tal que a voltajes positivos la corriente de AcCo es muy pequeña o está cerca de cero.

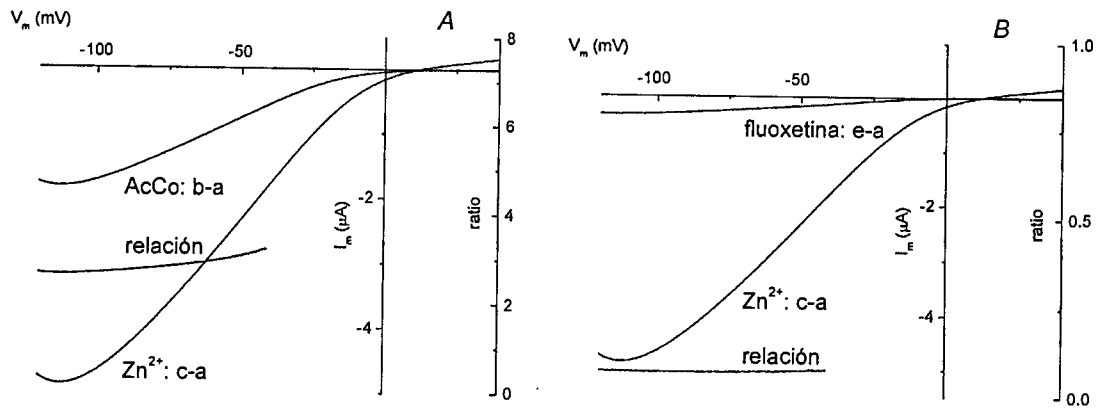


Figura 13. Efectos del voltaje en R-nic neuronales. (A) Las relaciones I-V de la corriente control (AcCo: b-a), la corriente potenciada con zinc (Zn^{2+} : c-a) y la relaci3n entre la corriente potenciada con zinc y la corriente control. (B) Las relaciones I-V de la corriente potenciada con zinc (Zn^{2+} : c-a), la corriente inhibida con fluoxetina (fluoxetina: e-a) y la relaci3n entre ambas.

X DISCUSIÓN

El estudio principal de este trabajo arroja datos importantes que podrían ser relevantes para comprender un poco más los efectos de los AD sobre los R-nic y la importancia que podría tener la modulación de los R-nic en el tratamiento de la depresión.

Se sabe que tanto el zinc como los R-nic están ampliamente distribuidos en el SNC y preferentemente con altas concentraciones en la corteza cerebral y el sistema límbico. Cabe mencionar que las estructuras límbicas mediales tales como la corteza frontal orbital y la del cíngulo (hipotálamo y tálamo), así como los ganglios basales con estados de hiperactividad en la amígdala, hipocampo y parte de los lóbulos temporales se han relacionado con estados depresivos (MacLean 2000)

Con relación al zinc y para mencionar, por qué la relevancia de este trabajo. Se han realizado estudios, principalmente por Nowak, en los que muestran, tanto en modelos de depresión en roedores y en pacientes de depresión, la eficacia al aplicar zinc en combinación con AD en dosis más bajas que las necesarias de manera individual (Nowak et al., 1999; 2003).

También sabe que los R-nic son potenciados por zinc (Hsiao et al., 2001), esto significa que el zinc está causando que los R-nic tengan más actividad, lo cual sugiere una mayor liberación de los neurotransmisores. Se sabe que, los R-nic se encuentran ampliamente localizados presinápticamente y favorecen la liberación de la neurotransmisión, Por ejemplo cuando los R-nic que se

encuentran en las terminales serotoninérgicas son activados, se abre el canal y permite que entre calcio y se libere el neurotransmisor, esto es en condiciones normales. Pero los R-nic no sólo se activan con la AcCo liberada de las terminales colinérgicas; otra forma de activación es la nicotina, principalmente con las personas fumadoras. En estudios epidemiológicos se ha mostrado que en los pacientes con trastornos de ansiedad y depresión, es mayor el de fumadores (49%) con respecto al resto de la población (22-30%), y por o que se ha sugerido que la nicotina podría tener efectos benéficos para estos pacientes (Hughes et al., 1986). Además, la aplicación de parches epidérmicos de nicotina a pacientes no fumadores tiene efectos AD (Salin-Pascual 1997).

Por otro lado se conoce que los AD tricíclicos como la imipramina (Eldefrawi et al., 1981), nortriptilina, amitriptilina (Shofield et al., 1981; Park et al., 1998) y desimipramine (Izaguirre et al., 1997; Rana et al., 1993) inhiben los R-nic, así como también, AD ISRS como la fluoxetina (García-Colunga et al., 1997a; Maggi et al., 1998) sertralina, paroxetina, nefazodona (Fryer y Lukas, 1999) nixotina, citalopram, nomifensina (Hennings et al., 1999) estas evidencias sugieren que la neurotransmisión hipercolinérgica esta asociada con estados de ánimo depresivos (Shytle 2002).

Los datos de este estudio muestran la inhibición de los R-nic al aplicar las sustancias AD, el orden de inhibición sobre los R-nic que se muestra es fluoxetina > imipramina > trimipramina ver resultados en la Tabla 6.

Así de los resultados de este trabajo y apoyándonos en la hipótesis más aceptada de la etiología de la depresión, que postula una deficiencia de las monoaminas: serotonina, noradrenalina y dopamina (Delgado 2000); y la acción

de los AD es inhibir la recaptura de estas monoaminas, (Delgado 2000; Hoffman 1991; Reyes-Haro et al., 2003) que permiten el aumento de la disponibilidad de aminas por más tiempo en el espacio sináptico, sin embargo, en este trabajo observamos que los AD inhiben a los R-nic y al zinc efecto contrario al señalado con los AD, ya que al estar inhibiendo los R-nic y el zinc se pensaría que la liberación del neurotransmisor es más baja.

Tomando como ejemplo a las terminales serotoninérgicas, donde sabemos que en estados de depresión hay una disminución de serotonina, los resultados obtenidos sugieren que al activarse los R-nic el zinc potencia (incrementa) su actividad, aumentando así la liberación del neurotransmisor, que hasta el momento o en algunas terminales se encontraba disminuido. Y que el zinc ha contribuido a que no este una deficiencia tan severa en el espacio sináptico y se podría sugerir dosis menores de los AD a las comúnmente utilizadas. Aquí, aunque nosotros únicamente estamos trabajando con los R-nic, nos podemos basar en los estudios de Nowak (2000), donde muestran que cuando hay un estado depresivo los niveles de zinc están más bajos y después de un tratamiento eficaz alcanza los niveles normales.

Apoyando la hipótesis de las monoaminas, en la que se propone una disminución de éstas en el espacio sináptico, aquí la función que el zinc sería la de permitir una liberación de estas monoaminas y quizás dosis más pequeñas de AD sean suficientes para llevar a cabo el proceso antidepresivo requerido.

También, los estudios de Nowak realizados en humanos podrían, apoyar esta hipótesis en las que se administran dosis de zinc seguida de AD en cantidades pequeñas (Nowak 2003).

La potenciación por zinc de los R-nic se da siempre y cuando se aplique antes que el AD. cuando la aplicación es en el orden AcCO – AD – zinc no va de acuerdo a la hipótesis de la disminución de las monoaminas, ya que el AD no permite la potenciación de los R-nic por zinc. Así, el AD inhibe los R-nic y como consecuencia hay una menor entrada de calcio a la terminal nerviosa y una liberación menor de neurotransmisores. Especulando se podría pensar que aunque el AD llega en unas cuantas horas al cerebro y su efecto terapéutico inicia semanas después, es porque su primer acción es inhibir diferentes mecanismos en el cerebro (como las respuestas colinérgicas), y posiblemente con las aplicaciones subsecuentes comience a haber una regulación de los diferentes sistemas del cerebro y es cuando el AD comienza a tener su efecto.

Por lo tanto, regresando a las aplicaciones de zinc antes del AD, esto podría plantear que los AD tarden menos tiempo en hacer efecto, y que además requieren menos cantidad ya que al llegar el AD al cerebro por la potenciación que hubo antes por zinc, ya no habría una disminución extracelular tan severa de las monoaminas y el aplicar menos AD ayudaría a que la posible dependencia que se genera por éstos sea menos drástica.

Se sabe que hay personas con depresión mayor que no tienen resultados satisfactorios con terapia AD. Para ellas una buena opción podría ser el tratamiento psicológico, aunque cabe señalar que lo conveniente podría ser un tratamiento que combine ambas terapias la psicológica y farmacológica. Esta combinación podría ayudar a que el uso de los AD fuera menor. Sin embargo también hay trastornos en los que el uso de AD podría ser la mejor opción, como

la depresión bipolar donde se presentan alucinaciones y la terapia psicológica, en primera instancia, no sería de mucha utilidad.

Este estudio podría contribuir a entender cómo funcionan los R-nic neuronales también cómo son modulados por sustancias que están asociadas con la depresión y con un tratamiento clínico. Y nos brinda un panorama en el que los mecanismos de acción de los AD es muy complejo, por lo que no está bien entendida la forma en que estas sustancias curan la depresión, así como los efectos secundarios adversos que generan.

Sería ideal que los trastornos emocionales (negativos) fuesen abordados también con cambios emocionales (positivos) del individuo, sin tener que recurrir a fármacos que a la fecha no se sabe bien a bien que están haciendo en el cerebro.

XI. CONCLUSIONES

Los R-nic son modulados tanto por zinc como por AD. El zinc aumenta la corriente generada con AcCo, mientras que los AD la reducen. El orden de aplicación del zinc y los AD (fluoxetina, imipramina y trimipramina) modula de manera diferente a los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$. La imipramina y la fluoxetina anulan todo el efecto potenciador del zinc, mientras que en presencia de trimipramina se observa una pequeña potenciación de la corriente activada con AcCo. Sugiriendo que el zinc y los AD están compitiendo por el mismo sitio pero los AD lo hacen con mayor afinidad.

Por otro lado, se ha sugerido que la actividad colinérgica tiene un papel importante en los procesos de la depresión. También, se ha reportado al zinc como un elemento que se encuentra bajo en los estados de depresión, y después de una terapia exitosa éstos se recuperan. Estudios realizados por el grupo de Nowak en modelos de depresión en ratas y ratones utilizando la prueba de nado forzado se observó que el zinc hace más eficiente los efectos de los AD. Datos parecidos se obtuvieron en humanos con la combinación de zinc y AD. Todo lo anterior podría contribuir a la elaboración de fármacos más selectivos y quizá utilizando suplementos con zinc se podría ayudar a disminuir las dosis necesarias de AD, con lo cual disminuirían los efectos secundarios causados por los AD. En este trabajo se determinó que la combinación de estas dos sustancias modulan a los R-nic. Así, cuando se aplica el AD después de aplicar zinc se observa un efecto inhibitorio más marcado sobre la corriente activada por ACCo en comparación a cuando se aplica el AD solo. Estos resultados van en la misma

dirección a los reportados por Nowak, aun cuando son en dos sistemas de estudio muy diferentes. Los reportados aquí son efectos directos sobre los R-nic, mientras los del grupo de Nowak son en pruebas conductuales. Trasladando esto datos a un organismo, se puede especular que el AD, después de la aplicación de zinc, tiene un efecto más satisfactorio, al aumentar los niveles de neurotransmisores en el espacio sináptico y esto podría conducir a menos efectos secundarios al momento de actuar el AD sobre estas terminales nerviosas.

ANEXO

Preparación de soluciones

Medio de cultivo LB líquido. Pesar 2.5 gr de medio LB. Disolver en 90 ml de agua desionizada. Llevar a pH de 7.0 con hidróxido de sodio 1M. Aforar a 100 ml. Esterilizar 20 min a temperatura de 121°C. El antibiótico se le aplica en el momento que va ser utilizado.

Medio de cultivo LB sólido. Disolver 2.5 g de LB en 70 ml de agua desionizada. Ajustar con hidróxido de sodio a un pH de 7.0. Agregar 1.5 g de agar. Aforar a 100 ml. Esterilizar 20 min. a 120°C. Esperar a que se enfríe para agregarle el antibiótico. Vaciar la solución en las cajas Petri, cerca del mechero encendido y dejarlas semiabiertas para evitar que forme gotas la parte de arriba de la caja Petri. Guardar en el refrigerador a 4°C, la caja se guarda con el gel hacia arriba y la tapa hacia abajo.

Antibiótico (ampicilina) para el medio de cultivo líquido o sólido. Las alícuotas están preparadas en el refrigerador a -20°C a una concentración de 25 mg/ml. La concentración para el medio de cultivo es de 80 µg /ml.

Agua DEPC 0.1 %. En frascos horneados poner agua a esterilizar por 30 min. Dejar enfriar y agregar 1 ml de DEPC (Diethylpyrocarbonate). Agitar fuertemente por 5 min. Poner una barra magnética y dejar agitar toda la noche. Esterilizar por una hora a 120°C.

Amortiguador (buffer) TE:

10 Mm Tris-Cl pH 8.0 ,1 mM EDTA pHh 8.0.

Para preparar TE 50 ml:

10 mM Tris-Cl pH 8.0 0.5 ml, 1 Mm EDTA pH 8.0 0.1 ml, Agua DEPC
49.4 ml.

Fenol (saturado en agua estéril). Descongelar el fenol en un baño a 65°C., Poner una parte igual de agua. Agitar durante 20 min. Dejar reposar hasta que se separen las fases. Eliminar la fase superior. Agregar otro volumen igual de agua. Agitar durante 20 min. Dejar reposar hasta que se separen las fases. Eliminar la fase superior y dejar solo un poco de la misma. Se usa la fase inferior. Guardar en el refrigerador de 4°C, envuelto en papel aluminio, si el frasco donde se preparo no es de color ámbar.

Fenol (saturado con buffer TE pH 8.0 y pH 4.5).

NOTA: El fenol para saturarlo con buffer TE, tiene que haber sido saturado primero con agua. En las dos recetas lo único que cambia es el pH. Descongelar el fenol e un baño a 65°C. Poner una parte igual de TE. Agitar durante 20 min. Dejar reposar hasta que se separen las fases. Eliminar la fase superior. Agregar otro volumen igual de TE. Agitar durante 20 min. Dejar reposar hasta que se separen las fases. Eliminar la fase superior y dejar solo un poco de la misma. Se usa la fase inferior. Guardar en el refrigerador de 4°C, envuelto en papel aluminio, si el frasco donde se prepara no es de color ámbar.

SEVAG (Cloroformo isoamilico 24:1). Poner 49 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamilico. Guardar en frasco ámbar. Temperatura de 4°C.

Acetato de sodio 3 M (pH 6.0). Disolver 24.61 g de acetato de sodio en 70 ml de agua estéril. Ajustar el pH con ácido acético glacial concentrado y cuando se

acerque al pH deseado diluir el ácido para evitar se baje mucho el pH. Esterilizar 1 hora a 121°C. Guardar a 4°C.

Acetato de amonio 7.5 M

Nota: Se disuelve con ácido acético glacial. Se pone un baso de precipitado con agua DEPC estéril. Se agrega el acetato de amonio. Se lleva al pH de 7.5 M con ácido acético glacial. Se afora a la cantidad deseada. Se guarda a 4°C en un frasco ámbar. Buffer TBE 10X para electroforesis Para un litro de solución mezclar: 108 gramos de tris base 55 gramos de ácido bórico 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 Aforar a un litro con agua desionizada estéril. Guardar en una botella de plástico. No es necesario proteger de la luz al buffer Para uso de buffer, diluir a 0.5X de preferencia Para 1 litro 50 ml de buffer.

Soluciones que se utilizan para el registro:

Solucion de Barth pH 7.4 (concentración en mM): 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.82 MgSO₄, 0.33 CaCl₂, 0.41 Ca(NO₃)₂, 5 Hepes. Procedimiento: En un vaso de precipitado poner agua estéril. Agregarle las sales. Agitar en una placa de agitación Dejar que se disuelva totalmente. Medir y llevar a un pH 7.4 con hidróxido de sodio a 2M. Aforar Esterilizar por filtración. Guardar a 18°C.

Solución Ringer pH 7.0 (concentración en mM): 115 NaCl, 1.8 CaCl₂, 2 KCl, 5 Hepes. Procedimiento: En un vaso de precipitado poner agua estéril. Agregarle las sales. Agitar en una placa de agitación con una barra magnetica. Dejar que se disuelva totalmente. Medir y llevar a un pH 7.4 con hidróxido de sodio a 2M. Aforar Esterilizar por filtración. Guardar a 18°C.

Colagenasa 0.5mg/ml. Para 50 ml pesar 0.025 g de colagenaza. Preparar en 50 ml de ringer pH 7.0 Hacer alícuotas de 10 ml y guardar a 0°C.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- AIDLEY D. J. (1998). Fast synaptic transmission, pp 108–128. En: The physiology of excitable cells, 4ª Ed. Cambridge University Press.
- ARIAS H. R. (1998). Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys. Acta* **1376**: 173-220.
- ASSAF S.Y. and Chung SH. (1984) Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature*. **308**:19-25.
- BARRANTES J. F. (1996). Canales activados por ligandos, pp 337–351. En: Biofísica y fisiología celular. Latorre, R., López Barneo, J., Bezanilla, F. y Llinás, R. (Eds). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- BERCHERIE P. (1980) **Los fundamentos de la clínica**, Ed. Manantial, Psychiatry, **10**: 561-571.
- CABALEIRO A. P., FERNÁNDEZ M. G., SAENZ M. P. (2000) Depresión y subjetividad en la antigüedad. Universidad Nacional del Mar de Plata. Facultad de Psicología.
- CASANOVA A. C., Reblet C., Pérez-Clausell J., Bueno L.J., (1998) Zinc-rich afferents to the rat neocortex: projections to the visual cortex traced with intracerebral selenite injections. *J. Chem. Neuroanatomy* **15**: 97-109.
- CLARKE P. S. S. (1999). Functional anatomy of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian brain, pp 127-139. En: Neuronal nicotinic receptors. Arneric, S. P. y Brionni, J. D. (Eds). Wiles-Liss, New York, USA.
- CLEGHORN M. J., Lee L. B. (1991) Depresión. Pp 47-63 En: Enfermedades mentales. Ed. Manual moderno México.

- CLEMENTI F., Fornasari, D. y Gotti, C. (2000). Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur. J. Pharmacol.* **393**: 3–10.
- CORRINGER P. J., Le Novère, N. y Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**: 431–458.
- CHANGEUX, J. P. y Edelstein, S. J. (2001). Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Op. Neurobiol.* **11**: 369–377.
- DELGADO M. J., Ferrús A., Mora F., Ribio J. F. (1998) Características generales de los sistemas de transmisión por monoaminas. pag 2020-225 En: Manual de neurociencias. Ed. Síntesis S.S. Madrid España.
- DELGADO P.L. (2000) Depresión: The case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry* **61**:suppl 6, 7-11, 2000.
- DOS SANTOS L., Valencia, M.E. Ninamango, R. N., Salas, R., Malgor L.A.(2000) Reacciones adversas producidas por antidepresivos. Catedra de Farmacología Instituto de Investigaciones Biofarmacológicas, Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes-Argentina.
- DUMAN R. S., Heninger, G. R. y Nestler, E. J. (1997). A molecular and celular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **54**: 597–606.
- ELDEFRAWI M. E., Warnick J. E., Schofield G. G., Albuquerque E. X., Eldefrawi A. T. (1981) Interaction of imipramine with the ionic channel of the acetylcholine receptor of motor endplate and electric organ. *Biochem pharmacol* **30**: 1391–1394.
- FELDMAN S. R., Meyer S. M, Quenzer F. L. (1999) Acetylcholine Neurochemistry: Synthesis, storage, release, and inactivation. pp 235-248. En: Principles of

neuropsychopharmacology, 1a. Ed. Feldman S. R., Meyer S. M, Quenzer F. L. Sinauer Associates, Inc., publishers. Sunderland, Massachusetts.

FERNÁNDEZ, F. A. (2003): alonso-fernandez@biopsicologia.net

FREDERICKSON, C. J., Suh S. W., Silva D., Fredericson C. j., Thompson R. B. (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nurt* **130**:1471S-1483S.

FRYER, J. D. y Lukas, R. J. (1999a). Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J. Neurochem.* **72**: 1117–1124.

FRYER J. D. y Lukas, R. J. (1999b). Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**: 88–92.

FUENTE J. R. de la (1998). Psicofarmacología, pp 475–487. En: Biología de la mente. Fuente, J. R. de la y Álvarez-Leefmans, F. J. (Eds) El Colegio Nacional y el Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.

GARCÍA-COLUNGA J. y Miledi, R. (1994). Serotonergic agents block neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in oocytes. *FASEB J.* **8**: 622 (abstract).

GARCÍA-COLUNGA J. y Miledi, R. (1995). Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 2919–2923.

GARCÍA-COLUNGA J. y Miledi, R. (1996). Serotonergic modulation of muscle acetylcholine receptors of different subunit composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 3990–3994.

- GARCÍA-COLUNGA J. y Miledi, R. (1999). Blockage of mouse muscle nicotinic receptors by serotonergic compounds. *Exp. Physiol.* **84**: 847–864.
- GARCÍA-COLUNGA J., Awad, J. N. y Miledi, R. (1997a). Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 2041–2044.
- GARCÍA-COLUNGA J., Awad, J. N. y Miledi, R. (1997b). Blockage of muscle acetylcholine receptors by the serotonin 1A receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Biomed. Resch.* **18**: 307–311.
- GARCÍA-COLUNGA J., González-Herrera. y Miledi, R (2001) modulation of $\alpha 2\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors by zinc. *NeuroReport.* **12**.
- GRASSI F., Polenzani A., Mileo A. M., Caratsch C. G., Eusebi F. Y Miledi R. (1993) Blockage of nicotinic acetylcholine receptors by 5- Hidroxytriptamine. *J Neurosci. Res.* **34**: 562-570.
- GUMNICK J. F. y Nemeroff C. B.(2000) Problems with currently y aviable antidepressant. *J. Clinic Psychiatry* 10:15 review.
- HENNINGS E. C. Kiss J. P., De Oliveira K., Toth P. T., Vizi E. S. (1999) Nicotinic acetylcholine receptors antagonistic activity of monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J Neurochem* **73**: 1043-1050.
- HOFFMAN BJ, Mezey E, Brownstein MJ. (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* **25**:579-80.
- HOWELL G. A., Pérez-Clausell J., Federickson C. J. (1991) Zinc containing projections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Research* **562**:181-189.

- HSIAO B., Dweck D. y Luetje W. C. (2001) Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *The journal neuroscience* **21**:1848-1856.
- HUGHES J.R., Hatsukami D. K., Mitchell J.E., Dahlgre L. A. (1986) Prevalence of smoking among psychiatric outpatients. *AM J. Psychiatry* **143**: 993-997.
- IVERSEN S., Kupfermann, I. y Kandel, E. R. (2000). The autonomic nervous system and the hypothalamus, pp 961–981. En: Principles of neural science, 4^a Ed. Kandel, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. McGraw-Hill, New York, USA.
- IZAGUIRRE V., Fernandez-Fernandez J. M., Cena V., Gonzalez-García C. (1997) Tricyclic antidepressant block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cell. *FEBS Lett* **418**: 39-42.
- KANDEL E. R. (2000a). Trastornos del estado de ánimo: depresión, manía y trastornos de ansiedad. Pp1209-1225. En: Principios de neurociencia 4^a Ed. Kandel. McGraw-Hill, New York, USA.
- KANDEL E. R. y Siegelbaum, A. (2000a). Signaling at the nerve-muscle synapsis: directly gated transmission, pp187–206. En: Principles of neural science, 4^a Ed. Kandel, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. McGraw-Hill, New York, USA.
- KANDEL E. R. y Siegelbaum, A. (2000b). Synaptic integration, pp 207–228. En: Principles of neural science, 4^a Ed. Kandel, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. McGraw-Hill, New York, USA.
- KARLIN A. y Akabas, M. H. (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptor and their cousins. *Neuron* **15**: 1231–1244.

- KELLAR, k. J., Cassio, C. S., Butler, J. A., Kurtzke, N. (1981) Differential effects of electroconvulsive shock and antidepressant drugs on serotonin-2- receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 69: 515-518.
- KROCZKA, B., Branski, P., Palucha, A., Pilc, A., Nowak G. (2001) Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swimming test. *Brain Res.* **55**, 297-300
- KROCZKA, B., Zieba, A., Dudek, D., Pilc, A., Nowak G. (2000) Zinc Exhibits an antidepressant-like effect in the forced swimming test in mice. *Polish Journal Pharmacology.* **52**:403-406.
- KUSANO K., Miledi, R. & Stinnakre, J. (1977). Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature* **270**, 739-741.
- LE NOVÈRE N. y Changeux, J. P. (2001). The ligand gated ion channel database. *Nucleic Acids Res.* **29**: 294-295.
- LEONARD B., Healy D. y Martin D. (2000) efectos diferenciales de los antidepressivos. *Psychopharmacology.*
- LINDSTROM J (1999). Purification and cloning of nicotinic acetylcholine receptor, pp 3–23. En: Neuronal nicotinic receptors. Arneric, S. P. y Brianni, J. D. (Eds). Wiles-Liss, New York, USA.
- LINDSTROM, J. (2000). The structure of neuronal nicotinic receptors, pp 101–146. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D. y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- LÓPEZ-VALDÉS H. y García Colunga J. (2001) Antagonism of nicotinic acetylcholine receptors by inhibitors of monoamine uptake. *Mol Psychiatry* **6**:511-519, 2001.

- LUKAS R. J. (1998) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors, pp 145–173. En: The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. Barrantes, F. J., (Ed). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- MAES, M., Vandoolaeghe, E., Neels H., Demedts, P., Wauters, A., Meltzer, H., Altamura, C., Desnyder R. (1997) Lower serum zinc in major depression is sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in the illness. *Biol. Psychiatric.* **42**: 349-358.
- MACLEAN P.D (2000) Sistema limbico. *Alturista* **16**:10.
- MAGGI I., Palma, E., Miledi, R. y Eusebi, F. (1998). Effects of fluoxetine on wild and mutant neuronal α_7 nicotinic receptors. *Mol. Psychiatry* **3**: 350–355
- NEMEROFF C. B., Shchateberg A. B., Goldstein D. S., Detke M. S., Mallinckrod F. C., Lu Y., Tran P. V. (2002) Duloxetine for the treatment of major disorders. *Psychopharmacol Bull* **36**:106-132.
- NI Y. G. y Miledi R. (1997) Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:2036-2041.
- MORENO R. A., Moreno, D. J. y Brito de Macedo Soares, M. (1999). Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **21**: S1 24–S1 40
- NOWAK G., (2001) Does interaction between zinc and glutamate system play a significant role in the mechanism of antidepressant action? *Acta Pol. Pharmacoligy.-drugs Res.* **58**: 73-75.
- NOWAK G., Kubera, M., Maes, M., (2000) Neuroimmunological aspects of the alterations in zinc homeostasis in the pathophysiology and treatment of depression. *Acta Neuropsychiat.* **12**: 43-53.

- NOWAK G., Schlegel-Zawadzka M. (1999) Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment. Part 1. *Zinc. Biol. Tr. Elem. Res.* **67**: 85-92.
- NOWAK G, Siwek M, Dudek D, Zieba A, Pilc A.(2003) Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. *Pol J Pharmacol.* **55**(6):1143-1147.
- NOWAK, G., Skolnick, P., P., Paul I. A. (1991) Down-regulation of dopamine 1 (D1) receptors by chronic imipramine is species specific. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**: 769-771.
- NOWAK G, Szewczyk B, Wieronska JM, Branski P, Palucha A, Pilc A, Sadlik K, Piekoszewski W. (2003) Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. *Brain Res Bull.*; **61**:159-164.
- NOWAK, G., Trullas, R., Layer, R. T., Skolnick, P., Paul I. A. (1993) Adaptive changes in the N-methyl-D-Aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**:1380-1386.
- NOWAK, G., Zieba, A., Dudek D., Krosniak, M., Szymaczek, M., Schlegel-Zawadzka M. (1999) Serum trace elements in animal models and human depression. Part 1. *Zinc. Human. Psychopharmacol. Clin. Exp.* **14**:83-86.
- NUTTER T.J., Adams D. J. (1995) Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *J Gen Physiol* **105**:701-723.

- NUTT, D. J. (2002) The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int. Clin. Psychopharmacol* **17**: 1-12.
- OWENS M. J., Morgan W. N., Plott S. J. Y Nemeroff C. B. (1997) Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**: 1305-1322.
- PALMA E., Maggi L., Miledi R., Eusebi F. (1998) Effects of Zn²⁺ on wild and mutant neuronal alpha7 nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci.* **95**:10246-50.
- PARK T. J., Shin S. Y. Suh B. C., Suh E. K., Lee I. S., Kim Y. S., Kim K. T., (1998) differential inhibition of catecholamine secretion by amitriptyline through blockage of nicotinic receptors, sodium channels, and calcium channels in bovine adrenal chromaffin cell. *Synapse* **29**:248-256.
- PATERSON D. y Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* **61**: 75-111.
- PEREZ-CLAUSELL J., Frederickson CJ, Danscher G (1989) Amygdaloid efferents through the stria terminalis in the rat give origin to zinc-containing boutons. *The Journal of Comparative Neurology* **290**:201-212.
- PICCIOTO M. R., Calderone, B. J., King, S. L. y Zachariou, V. (2000). Nicotinic receptors in brain: links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacol.* **22**: 451-465.
- PRINCE R. J. y Sine, S. M. (1998). The ligand binding domains of the nicotinic acetylcholine receptor, pp 31-53. En: The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. Barrantes, J. F. (Ed). Springer-Verlag, Heidelberg /Berlin.

- PURVES D., Augustine J.G., Fitzpatrick D., Katz C. L., LA mantia S. A., McNamara (1997) Neurotransmisores pag.109-130 En: Invitación a la neurociencias. Ed Panamericana Argentina.
- RANA B., McMorn S. O., Reeve H. L., Wyatt C. N., Vaughan P. F., Peers C. (1993) Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by imipramine and desipramine. *Eur J Pharmacol* **250**:247-251.
- REYES-HARO D, Garcia-Alcocer G, Miledi R, Garcia-Colunga J. (2003) Uptake of serotonin by adult rat corpus callosum is partially reduced by common antidepressants. *J Neurosci Res* **74**:97-102.
- SALÍN PASCUAL R. J. (1997). Neurobioquímica de la depresión, pp 95–114. En: Bases bioquímicas y farmacológicas de la neuropsiquiatría. McGraw-Hill/Interamericana. Distrito Federal, México.
- SARGENT P. B. (2000). The distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors, pp 163–184. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D. y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- SCHLEGEL-ZAWADZKA M., Zieba, A., Dudek D., Krosniak, M., Szymaczek, M., Nowak, G. (2000) Effect of depression and of antidepressant therapy on serum zinc levels- a preliminary clinical study: In: trace elements in man and animals. *Eds. Roussel A: M., Favier A. E., Kluwer Academic/Plenum Publishers*: **10**: 607-610.
- SCHOFIELD G. G., Witkop B, Warnick J. E., Albuquerque E. X. (1981) Differentiation of the open and closed states of the ionic channels of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **78**: 5240-5244.

- SHAKESPEARE W, (1999). Hamlet Príncipe de Dinamarca. Edivisión Compañía Editorial S. A., México.
- SHYTLER R. D., Silver A.A., Luckas R. J., Newman M. B., Sheehan D. V. y Sanberg P. R. (2002) Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressant. *Molecular Psychiatry* 7:525-535.
- STAHL S. M. (2000). Essential psychopharmacology, 2ª Ed. pp 199-295, Cambridge University Press, New York, USA.
- TAMAYO M. J. (1997) Mecanismo de acción de los antidepresivos: una mirada histórica. *Rev. Col. Psiquiatra*. XXVI:127-141.
- TORTORA J. G., Anagnostakos P. N. (1998) El tejido nervioso. Pp 503-515. En: Principios de anatomía y fisiología. Ed. Hrcourt Brace Madrid España.
- UNWIN N. (1995). Acetylcholine receptor channel in the open state. *Nature* 373: 37-43.
- UNWIN N. (2000). The croonian lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 355: 1813-1829.
- VAIDYA, V. A., Siuciak J. A., Du, F., Dumand, R. S. (1999) Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience*. 89: 157-166.
- VALLEJO J. y Rojo J. E. (1994) Terapia electroconvulsiva. Ed. Masson Barcelona España.
- VETULANI J. y Nalepa, I. (2000). Antidepressants: past, present and future. *Eur. J. Pharmacol.* 405: 351-363.

ZOLÍ M. (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in development and aging, pp. 213–237. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D. y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.