



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Químicas
Maestría del área de Bioquímica y Biología
Molecular
Laboratorio de Neuroquímica

Tesis de Maestría en Ciencias Químicas

Estudio comparativo de la eficacia de fármacos
inhibidores de la recaptura de serotonina sobre la
depresión inducida con rotenona

Presenta

QFB Julio Castrillón Escobar

Licenciado Químico Fármaco Biólogo, para optar al Grado de Maestro en
Ciencias Químicas área Bioquímica y Biología Molecular de la Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla

Directoras de tesis

Dra. Liliana Martínez Mendieta

Dra. María Isabel Martínez García

1, octubre, 2019

INDICE

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	ii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	vi
I Introducción	1
1.1 La depresión, antecedentes.....	1
1.2 Neuroquímica de la depresión.....	2
1.3 BDNF y su función como neuromodulador sináptico.....	6
1.4 Moléculas con potencial efecto antidepresivo	8
1.5 El fragmento carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica.....	10
1.6 Uso de la rotenona como neurotóxico para inducir depresión en ratón	12
1.7 Modelos en animales de laboratorio para evaluar depresión	14
II Justificación	17
III Hipótesis.....	18
IV Objetivo general.....	18
4.1 Objetivos específicos.....	18
V Diagrama de trabajo	19
VI Metodología	23
6.1 Animales.....	23
6.2 Tratamiento	23
6.3 Grupos experimentales.....	24
6.4 Pruebas conductuales	25
6.5 Análisis de datos.....	26
VII Resultados.....	27
VIII Discusión	38
IX Conclusión	42
X Referencias	43

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Circuitos neuronales relacionados con la depresión en el ratón	3
Figura 2. Receptores serotoninérgicos asociados a la modulación del estado de ánimo.....	5
Figura 3. Mecanismo de acción de las vías neurotróficas ERK-1/2, PI-3K/Akt y PLC γ	7
Figura 4. Estructura molecular de la paroxetina y su análogo 3-hidroxi-paroxetina	10
Figura 5. Cristalografía de la toxina tetánica	11
Figura 6. Mecanismo de transporte retrogrado axonal del fragmento Hc-TeTx.....	12
Figura 7. Mecanismo de acción de la rotenona.....	13
Figura 8. Ejemplo del recorrido realizado en la prueba de campo abierto.....	26

Resultados

Figura 9. Prueba PS, rotenona 0.5mg/kg por 21 días.....	27
Figura 10. Prueba CA, rotenona 0.5mg/kg por 21 días.....	28
Figura 11. Prueba NF, rotenona 0.5mg/kg por 21 días	28
Figura 12. Prueba SC, rotenona 0.5mg/kg por 21 días	29
Figura 13. Prueba PS, rotenona 0.5mg/kg por 21 días + fármacos	30
Figura 14. Prueba CA, rotenona 0.5mg/kg por 21 días + fármacos.....	31
Figura 15. Prueba NF, rotenona 0.5mg/kg por 21 días + fármacos	32
Figura 16. Prueba NF, rotenona 1mg/kg por 7 días	33
Figura 17. Prueba PS, rotenona 1mg/kg por 7 días.....	34
Figura 18. Prueba PS, rotenona 1mg/kg por 7 días + fármacos.....	35
Figura 19. Prueba CA, rotenona 1mg/kg por 7 días + fármacos.....	36
Figura 20. Prueba NF, rotenona 1mg/kg por 7 días + fármacos	37

Tablas

Tabla 1. Aleatorización de los cuatro grupos de ratonas.....	24
--	----

LISTADO DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
4E-BP1	eIF4E-proteína de unión 1
5-HT	Serotonina
AA	Acido araquidónico
AC	Adenilato ciclase
ACTH	Adrenocorticotropina
AMY	Amígdala
ATC	Antidepresivo tri cíclico
AVT	Area ventral tegmental
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro, (por sus siglas en ingles)
CA	Campo abierto
CaM	Calmodulina
CaMK	Ca ²⁺ /proteína quinasa dependiente de calmodulina
CIE-10	Clasificación Internacional de Enfermedades 10. ^a revisión
CPF	Cortex prefrontal
CREB	Elemento de respuesta a AMPc
CRF	Factor de liberación de corticotropina
CYP 450	Citocromo P450
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DSM-V	Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales, 5a edición
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK-1/2	Quinasa regulada por señal extracelular 1/2
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FKHR	Forkhead transcription factor
GD	Giro dentado
Grb-SOS	Son of sevenless
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSH	Glutación
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical

HYP	Hipocampo
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IMAO	Inhibidor de la monoamino oxidasa
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
JAK/STATs	Quinasa Janus/transductores de señal y activadores de transcripción
LC	Locus coeruleus
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
MDA	Malondialdehído
MEKK	MAP quinasa quinasa
mTOR	Complejo sensible a rapamicina
NAC	Núcleo accumbens
NE	Noradrenalina
NF	Nado forzado
NFκB	Factor nuclear Kb
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS1 α	Óxido nítrico sintasa 1
NR	Núcleos de rafé
NT-3	Neurotrofina 3
PI-3K	Fosfatidilinositol- 3-quinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PS	Preferencia a la sacarosa
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rsk	Quinasa s6 ribosomal
SAPK	proteína quinasa activada por estrés

SC	Suspensión de la cola
SERT	Transportador de serotonina
STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TrkB	Quinasa del receptor de tropomiosina B
TrkC	Quinasa del receptor de tropomiosina C

Resumen

Los tratamientos antidepresivos con inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) han mostrado alta eficacia para reducir la depresión, entre ellos la paroxetina (Px), un antidepresivo altamente selectivo y ampliamente usado en todo el mundo. Su análogo, un estereoisómero hidroxilado en el carbono 3 de su anillo piridínico, que ha sido sintetizado en la FCQ-BUAP, es un compuesto que se ha propuesto podría tener una mayor biodisponibilidad y una mayor eficacia farmacológica. Por otra parte, el fragmento C-terminal de la toxina tetánica (Hc-TeTx) por sus propiedades de inhibir al transportador de serotonina (SERT) se perfila como un agente antidepresivo, además de proteger del estrés celular. El presente proyecto tuvo como propósito evaluar el probable efecto antidepresivo del análogo hidroxilado (3S,4S)-3-OHPx y del fragmento Hc-TeTx sobre la depresión inducida por rotenona. Ratonas de la cepa CD1 (20-25 g) se usaron para inducir depresión con rotenona. En primer lugar, se estableció el modelo experimental de depresión con rotenona y se comprobó con las pruebas de nado forzado, suspensión de la cola y en la actividad motora. Los resultados indicaron que la administración de 0.5 y 1 mg/kg de rotenona por vía intraperitoneal provoca la conducta de desesperanza o inmovilidad en el nado forzado, sin cambios en la preferencia a sacarosa y la conducta motora o la inmovilidad en la suspensión de la cola. Posteriormente, se evaluó el efecto antidepresivo de la Px, del 3-OHPx (0.5 mg/kg i.p. diariamente) y el fragmento Hc-TeTx (60 µg/kg i.m. al día 1 y 7) en animales que recibieron diariamente 0.5 mg/kg de rotenona durante 21 días. Los resultados fueron que la Px, el 3-OHPx y el fragmento Hc-TeTx no causaron modificaciones en la conducta depresiva a los 21 días. Además, el efecto de la Px, el 3-OHPx (1 mg/kg i.p. diariamente) y del fragmento Hc-TeTx (60 µg/Kg i.m) en el modelo de rotenona (1 mg/kg i.p.) por 7 días. Únicamente la Px reduce la conducta depresiva inducida por rotenona, sin embargo, no se encontraron efectos con el 3-OHPx y el Hc-TeTx. En conclusión, éste trabajo establece el modelo de conducta depresiva con rotenona y prueba el efecto de Px, sin encontrar modificaciones en la respuesta con 3-OHPx o el fragmento Hc-TeTx, por lo que debemos realizar experimentos a otras dosis e intervalos de evaluación del efecto.

I Introducción

1.1 La depresión, antecedentes

La depresión es un trastorno mental debilitante de relevancia clínica que afecta el desempeño general del individuo, aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, principalmente coronarias, (Musselman et al., 1998), la Asociación Americana de Psiquiatría en la 5ª edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Enfermedades Mentales (DSM-5) establece nueve síntomas para su diagnóstico: estado de ánimo deprimido, pérdida de interés o placer, alteración significativa del peso o apetito, insomnio o hipersomnias, agitación o retraso psicomotor, fatiga o pérdida de energía, sentimientos de inutilidad, capacidad disminuida para pensar o concentrarse y pensamientos recurrentes de muerte o suicidio.

Las causas que desencadenan el desarrollo de la enfermedad abarcan factores ambientales, sociales, psicológicos y biológicos (Bagot et al., 2014), como por ejemplo el estrés, trauma emocional e infecciones virales (Fava y Kendler, 2000). En el siglo pasado fue planteada la hipótesis catecolaminérgica de los trastornos afectivos, la cual propone que los trastornos depresivos están asociados con una disminución de las catecolaminas, en particular la NE (noradrenalina) y la DA (dopamina), en áreas específicas del cerebro, esto se descubrió a partir de observaciones clínicas y experimentales que mostraron que el fármaco antihipertensivo reserpina causaba un agotamiento de las reservas presinápticas de NE, 5-HT (serotonina) y DA e inducía un síndrome parecido a la depresión (Schildkraut, 1965). La primera generación de antidepresivos la conforman los antidepresivos tricíclicos (ATC) y los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), los cuales aumentan las concentraciones de 5-HT y/o NE y son eficaces para aliviar los síntomas de la depresión, aunque presentan efectos secundarios que limitan su aplicación, actuando sobre receptores histamínicos, colinérgicos y α 1-adrenérgicos (Feighner, 1999). Por una parte, los ATC frecuentemente producen sedación, hipotensión, visión borrosa, boca seca e incluso efectos en el sistema cardiovascular, mientras que los IMAO pueden interactuar con la tiramina y con varios medicamentos de venta libre causando hipertensión (Glassman y Shapiro, 1998). Resultado de los inconvenientes que representaban los antidepresivos tradicionales, se dio el desarrollo de nuevos antidepresivos con el objetivo de mejorar la tolerabilidad y disminuir los efectos adversos, lo cual se consiguió con el descubrimiento de los ISRS, fármacos diseñados racionalmente, que presentan un margen de toxicidad muy alejado de la dosis eficaz y con una gran selectividad por los transportadores de recaptura de serotonina (SERT) (Feighner, 1999).

1.2 Neuroquímica de la depresión

Uno de los factores más importantes causantes de la depresión es el estrés agudo o crónico, que favorece la liberación de NE y activa el eje HPA, en donde las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan CRF que estimula la síntesis de ACTH de la pituitaria anterior, lo cual estimula la síntesis y la liberación de glucocorticoides del córtex adrenal. En situaciones normales los glucocorticoides aumentan las funciones hipocampales y promueven ciertas funciones cognitivas, bloquean la síntesis, la liberación y la acción de mediadores intercelulares implicados en la inflamación (prostaglandinas, leucotrienos, histamina), las respuestas inmunes (linfoquinas), la reabsorción de agua (vasopresina), modula respuestas del sistema nervioso central al estrés y regula la expresión del receptor de serotonina 5HT1A en regiones corticales (De Kloet et al., 1988). Sin embargo, cuando el estímulo estresante se prolonga lo suficiente, se observa hipercortisolemia y alteraciones neuroquímicas en el eje HPA (Lucassen et al., 2001) que ha sido asociado con atrofia, pérdida neuronal y gliosis (Uno et al., 1989) en el circuito fronto-límbico, principalmente en el HYP y la CPF (Savitz y Drevets, 2009), implicados en el aprendizaje, memoria, atención y control de impulsos; lo que sugiere que estas regiones cerebrales pueden mediar aspectos cognitivos de la depresión como trastornos de memoria, desesperanza, culpa, fatalidad y suicidio (Figura 1 *azul*) (Nestler et al., 2002). Así mismo, el CPF presenta densas conexiones recíprocas con el NAC y la AMY las cuales están involucrados en la memoria emocional y condicionamiento al miedo, dando como resultado la mediación de la anhedonia y la reducción de la motivación (Figura 1 *rojo*) (Price et al., 1996; Davidson et al., 1999). El estrés agudo o crónico también es capaz de reducir significativamente la expresión génica de factores de crecimiento conocidos como neurotrofinas, los cuales están involucrados en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y periférico, atrofiando dendritas y espinas en el CPF, además de disminuir la neurogénesis y producir gliosis en las áreas del GD, el CA1 y el CA3 del HYP (Banar et al., 2007). Estos hallazgos apoyan la noción de que la depresión se puede ver como un trastorno neurodegenerativo leve, pero con la posibilidad de que los decrementos neuronales y gliales se puedan revertir mediante el tratamiento farmacológico o el alivio del estrés (Duman y Voleti, 2012).

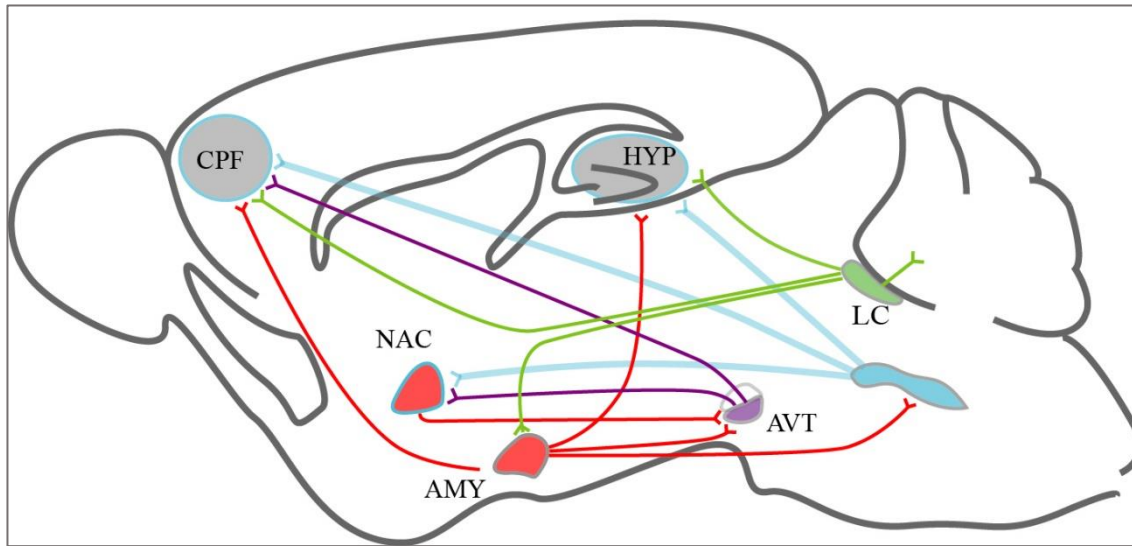


Figura 1. Esquema simplificado de una serie los circuitos neuronales en el cerebro de ratón que se cree contribuyen a la regulación del estado de ánimo: serotoninérgico (azul), noradrenérgico (verde), dopaminérgico (rojo) y glutaminérgico (morado). Si bien la mayoría de las investigaciones en el campo de la depresión se han centrado en el hipocampo y CPF, otras estructuras subcorticales implicadas en la recompensa, el miedo y la motivación también están involucradas como el NAC, AVT, AMY, LC y los NR.

Las aferencias dopaminérgicas originadas desde el AVT hacia el NAC han sido identificadas como los núcleos anatómicos más importantes de recompensa, en la comida, el sexo y las interacciones sociales (Wise, 1998), se ha reportado que el estrés activa neuronas dopaminérgicas del AVT estimulando la transcripción de CREB, alterando así la respuesta emocional (Conti et al., 2002). Del mismo modo la AMY que es fundamental para las asociaciones aprendidas entre emociones negativas, también cumple la función de recompensar estímulos (Davis y Whalen, 2001).

La vía glutamatérgica se asocia con la depresión de forma indirecta, dado el papel que juega el glutamato en la inflamación (Parsons et al., 1998) (Lewerenz et al., 2013). En este sistema los receptores NMDA tienen efectos opuestos en la función CREB cuando son sobreactivados, lo que lleva a una disminución de la expresión de factores neurotróficos incluido el BDNF (Hardingham et al., 2002). Los axones glutamatérgicos largos inervan varias áreas subcorticales del cerebro que están potencialmente involucradas en la sintomatología depresiva, el NAC es relacionado con la anhedonia, el complejo amigdaloides es involucrado con el miedo y la ansiedad, el HYP con el estado de ánimo y el deterioro de la memoria, el CPF involucrado en los trastornos cognitivos y el eje HPA regulador del apetito, el sueño, y el deseo sexual (Groenewegen y Uylings, 2000), donde se

ha especulado que el exceso de la neurotransmisión glutamatergica a través de la exposición al estrés produce retracción dendrítica y pérdida de espinas (Gorman y Docherty, 2010).

El receptor 5-HT1A es uno de los receptores de serotonina más abundantes en el cerebro y está involucrado en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos. Se encuentra acoplado a la proteína G y es el principal efector en la activación de los canales de K⁺, hiperpolarizando la membrana neuronal y reduciendo la velocidad de activación de las neuronas serotoninérgicas y piramidales en la corteza y el hipocampo (Sprouse y Aghajanian, 1987). Las neuronas serotoninérgicas se originan en los NR, el puente troncoencefálico de Varolio y la médula cervical superior, donde proyectan aferencias ascendentes y descendentes. Las proyecciones ascendentes se dirigen al cerebro anterior, al hipocampo, al sistema límbico, a los ganglios basales y al hipotálamo (Bang et al., 2012), son moduladas principalmente por neuronas glutamatergicas del CPF, adrenérgicas de los núcleos pontinos e interneuronas inhibitorias GABAérgicas locales (Adell et al., 2002). Los receptores serotoninérgicos más vinculados con los efectos antidepresivos son los receptores 5-HT1A y 5-HT2A.

El receptor 5-HT1A se encuentra altamente expresado en la corteza infralímbica, el hipocampo (específicamente en la región CA1), la corteza cingulada y los núcleos de rafe; está involucrado en múltiples cascadas moleculares, que incluyen: regulación de la actividad de la fosfolipasa-C, inhibición de la acumulación de AMPc y reducción de las corrientes de calcio (Claustre et al., 1991; Raymond et al., 2001).

El efecto de la estimulación del receptor 5-HT1A por el neurotransmisor 5HT (Figura 2) difiere entre los subtipos de receptores presinápticos (autorreceptores) y postsinápticos (heterorreceptores), estudios han demostrado que los autorreceptores de 5-HT1A en el rafe no afectan los niveles de AMPc, mientras que los receptores 5-HT1A postsinápticos inducen una mayor actividad de la AC (Billard et al., 2014). Esencialmente, los autorreceptores 5-HT1A actúan como un mecanismo de regulación negativo en el cual los aumentos rápidos de serotonina se pueden reducir y volver a equilibrar, atenuando el aumento de 5-HT extracelular producido por el bloqueo de recaptación (Artigas et al., 1996). Finalmente, el tratamiento con ISRS a largo plazo induce la desensibilización del autorreceptor 5-HT1A en el núcleo de rafe del mesencéfalo pero no de los hetero-receptores postsinápticos encontrados en el hipocampo lo que resulta en una recuperación de la activación de las células 5-HT y en un aumento de 5-HT extracelular mayor después de la administración única del fármaco ISRS (de Montigny y Blier, 1984; Bel y Artigas, 1993; Piñeyro y Blier, 1999).

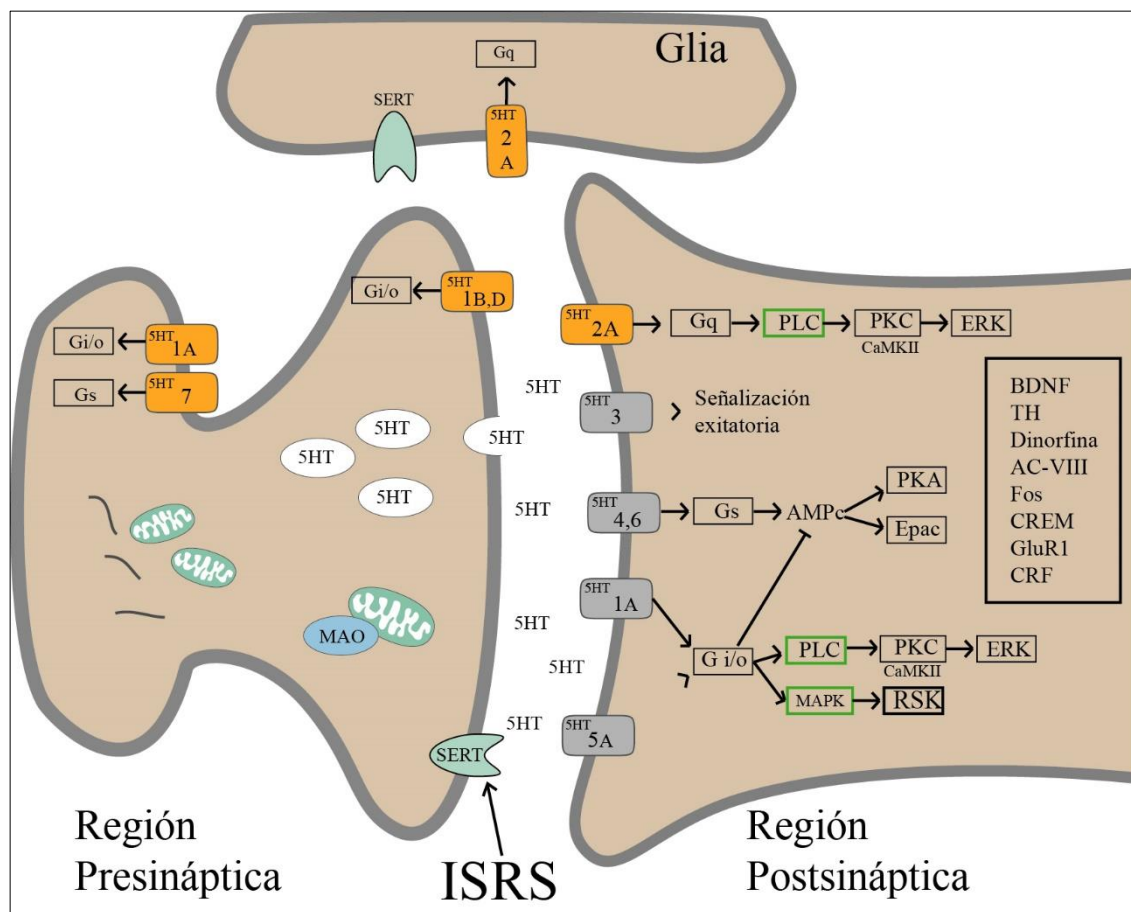


Figura 2. Representación esquematizada de los receptores serotoninérgicos asociados a la modulación del estado de ánimo. Mientras que la activación de los receptores 5-HT_{1A} inhiben la actividad piramidal, los receptores 5-HT_{2A} la aumentan, activando a la PLC (Amargós-Bosch et al., 2004). Además, otros receptores también se han relacionado con la regulación del estado de ánimo y la depresión, incluidos receptores 5-HT_{2C} (Millan, 2005), 5-HT₃ (Barnes et al., 1990; Gupta et al., 2014), 5-HT₄ (Mendez-David et al., 2014; Vidal et al., 2014), 5-HT₆ (Wesołowska, 2010; Scheggi et al., 2011), dopaminérgicos (D₁, D₂) y adrenoceptores (Richardson-Jones et al., 2010).

El receptor 5-HT_{2A} se localiza principalmente en las neuronas piramidales y en las interneuronas GABAérgicas que controlan la actividad de las neuronas piramidales (Willins et al., 1997). La estimulación del receptor 5-HT_{2A} conduce a la producción de al menos tres señales bioquímicas distintas, IP₃/DAG, AA, 2-AG, donde la activación de estas vías varía dependiendo del ligando utilizado (Kurrasch-Orbaugh et al., 2003). La activación del receptor 5-HT_{2A} por la 5-HT activa a la PLC a través de la proteína Gq y conduce a una acumulación de IP₃, DAG y la activación de

PKC, el aumento en el IP3 citoplásmico provoca la liberación de calcio de las reservas de retículos endoplásmicos intracelulares (Hoyer et al., 1994), además de modular otras vías, incluyendo PLA2, PLD, ERK1/2, óxido nítrico, CaM, CREB, Akt, Fos, TGF- β , EGFR y JAK/STATs (Turner y Raymond, 2005; Gööz et al., 2006)

1.3 BDNF y su función como neuromodulador sináptico

Los factores neurotróficos son una familia de proteínas que favorecen el crecimiento, desarrollo de las neuronas inmaduras e inducen la supervivencia y las funciones de las neuronas adultas (Lindsay et al., 1994). Las neurotrofinas tienen funciones autocrinas y paracrinas, entran en el sistema de transporte retroaxonal rápido hasta llegar al núcleo, donde promueven fenómenos de expresión génica.

La disfuncionalidad en la expresión neurotrófica de BDNF, NT-3 y sus receptores, TrkB y TrkC se han relacionado con trastornos del estado de ánimo, siendo las principales regiones afectadas la CPF, el HYP, el NAC y la AMY. Se ha demostrado que el BDNF promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas serotoninérgicas 5-HT y que la administración de fármacos ISRS mejora la expresión del gen BDNF, existiendo sinergismo entre los dos sistemas en los comportamientos afectivos, la epítasis genética entre BDNF y los genes transportadores de serotonina (Nibuya et al., 1995; Martinowich y Lu, 2008) .

La acción neurotrófica involucra tres vías principales (Figura 3): (azul) MAP quinasas ERK-1/2, (verde) PI-3K/Akt y (rojo) PLC γ (Reichardt, 2006; Hertz et al., 2015). Las cuales son importantes mediadores de la liberación de glutamato y la afluencia de Ca²⁺ (Lindvall et al., 1994; Davidson et al., 1999; Nestler et al., 2002).

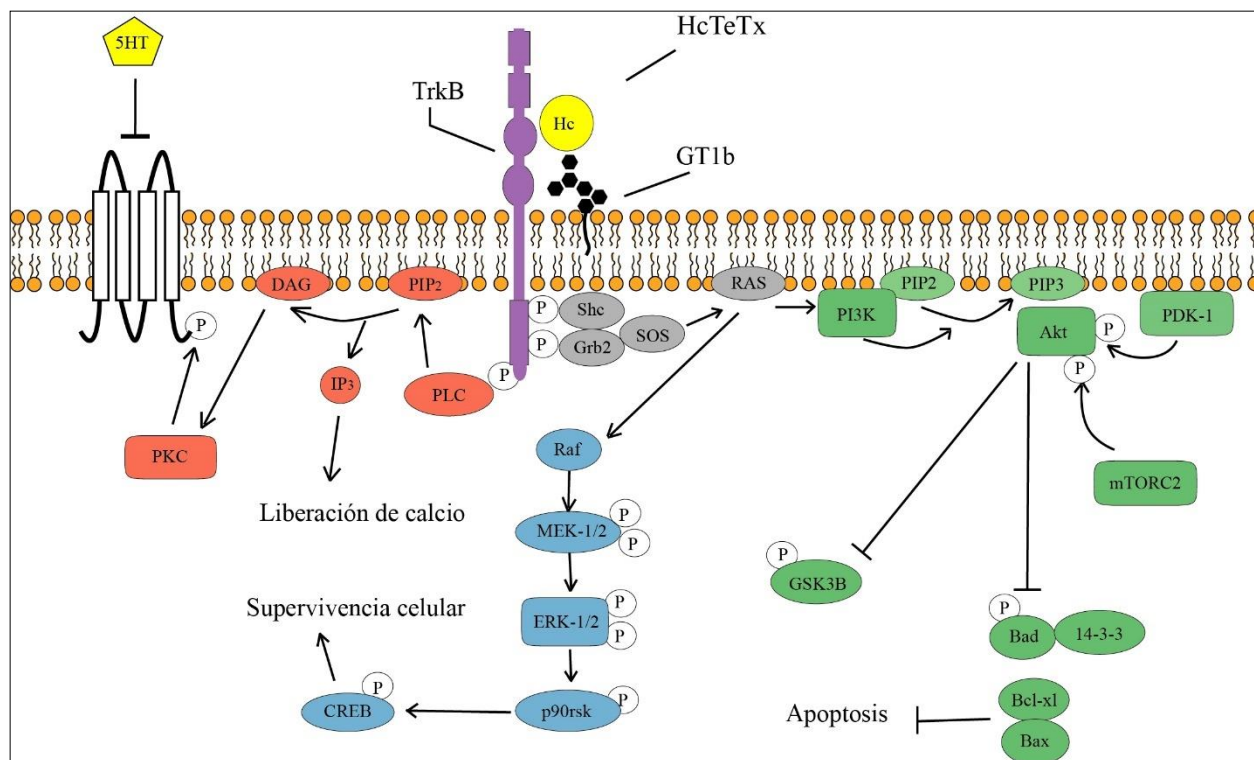


Figura 3. Las vías involucradas en la mediación del estado de ánimo dependientes de la fosforilación de TrkB, (se incluye el sitio de actividad del fragmento Hc-TeTx (amarillo) unido al receptor TrkB supliendo a su ligando natural BDNF); (azul) ERK-1/2, (verde) PI-3K/Akt y (rojo) PLC γ .

La activación de Ras/MAPK se lleva a cabo mediante la unión de la proteína adaptadora Shc al complejo Grb-SOS para la activación de Ras, la cual estimula la activación de ERK1/2, MEKK2 y MEKK3. A su vez Rsk y MEKK2 fosforilan factores de transcripción como CREB, el cual da como resultado un aumento de la neurogénesis de células granulares del giro dentado y un aumento de las ramificaciones y la longitud dendrítica (Huang y Reichardt, 2003; Fujioka et al., 2004).

Akt activa a mTOR C1 que produce un aumento de la síntesis proteica y la supervivencia celular mediante la fosforilación de Rsk y 4E-BP1 (Patapoutian y Reichardt, 2001), además controla la actividad de varias proteínas relacionadas con la vía de las caspasas como Bad, ésta al ser fosforilada se une a la proteína 14-3-3, impidiendo así la señal pro-apoptótica, Akt también regula la actividad de FKHR el cual también se une a la proteína 14-3-3 que la secuestra del citoplasma, Akt también es capaz de fosforilar e inactivar a SK3B impidiendo sus efectos pro-apoptóticos (Hetman y Xia, 2000; Brunet et al., 2001).

La cascada PLC γ modula la transmisión sináptica y la potenciación a largo plazo, mediante la hidrólisis de PIP₂ para generar IP₃, el cual promueve la liberación de calcio y DAG que estimula algunas formas de PKC activando con ello a la enzima CaMK (Skaper, 2008).

Sin embargo, aunque BDNF ejerce efectos similares a los antidepresivos en el hipocampo, sus acciones pueden ser diferentes o incluso opuestas en diferentes regiones del cerebro involucrados en la mediación del procesamiento emocional como es el caso del AVT y NAC (Ongür y Price, 2000).

1.4 Moléculas con potencial efecto antidepresivo

El estudio de los efectos terapéuticos y adversos de los metabolitos activos de muchos antidepresivos es una parte importante para comprender sus mecanismos de acción, los cuales, a excepción del litio, sufren un metabolismo hepático extenso. Si bien, la mayoría de los ISRS, exceptuando fluvoxamina, paroxetina y viloxazina que parecen no formar metabolitos activos, la mayoría de los metabolitos de los ISRS comparten las mismas acciones bioquímicas primarias que sus compuestos originales y pueden contribuir a su eficacia terapéutica, mientras que otros pueden aumentar la carga de efectos adversos o inhibir la actividad del fármaco primario. Las propiedades cinéticas de los metabolitos secundarios comúnmente presentan una vida media más prolongada (Caccia y Garattini, 1990; Rudorfer y Potter, 1997), además que se ha documentado la disminución en la biotransformación hepática al aumentar el tamaño de la dosis única o repetida (cinética no lineal) para fármacos como la imipramina, desipramina, fluoxetina, doxepina y paroxetina, debido a la actividad de éstos y de sus metabolitos sobre el complejo enzimático CYP 450 (citocromo P450).

La paroxetina (PX) es una fenilpiperidina transisomérica que en comparación con otros ISRS es de 2 a 23 veces más potente, sufre un metabolismo de primer paso parcialmente saturado que reduce la biodisponibilidad de un 30-60%, inhibe específicamente la actividad del CYP 2D6 y del CYP 3A4 alterando con esto las concentraciones del fármaco y los metabolitos en sangre de manera desproporcionada en respuesta al aumento de la dosis (Nemeroff et al., 1996). Sin embargo, una de las grandes ventajas que presenta la PX sobre otros fármacos es su alta selectividad y su vida media de 24 horas que permite una administración diaria (DeVane, 1992).

La modificación de los grupos funcionales de un fármaco mediante la sustitución de un hidrógeno por un sustituyente alquilo, halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, alcoxi, aino o carboxilo es una técnica

utilizada en el diseño racional de fármacos y es capaz de modificar de forma importante la potencia, vida media y el efecto del fármaco. El análisis de un fármaco diseñado racionalmente se lleva a cabo mediante una técnica computarizada de docking en que se compara la estructura del ligando con la del receptor, en ausencia de estructuras 3D de alta resolución para SERT (Orús et al., 2002), es posible construir un modelo 3D para un receptor utilizando datos cristalográficos o de RMN de proteínas relacionadas genética y funcionalmente. El desarrollo de un farmacóforo basado en ligando o QSAR ha sido una alternativa viable para obtener información estructural sobre el bolsillo de unión (Kharkar et al., 2008), de esta forma es posible generar patrones de interacción proteína-ligando y desarrollar un análogo del ISRS Px. Una limitación de los enfoques basados en el ligando es que la alineación flexible que usa diferentes estructuras es menos confiable; el conocimiento de la conformación de SERT mejoraría significativamente la precisión de la alineación (B-Rao et al., 2009).

El análogo hidroxilado de la paroxetina, el *(3S,4S)*-3-hidroxi-paroxetina (*3-OHPx*), (Figura 4) es un estereoisómero hidroxilado en el carbono 3 de su anillo piridínico sintetizado en la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP bajo la dirección del Dr. Fernando Sartillo Piscil, dicho compuesto se ha propuesto podría presentar un aumento en su biodisponibilidad o incluso un aumento en la eficacia farmacológica frente a la Px.

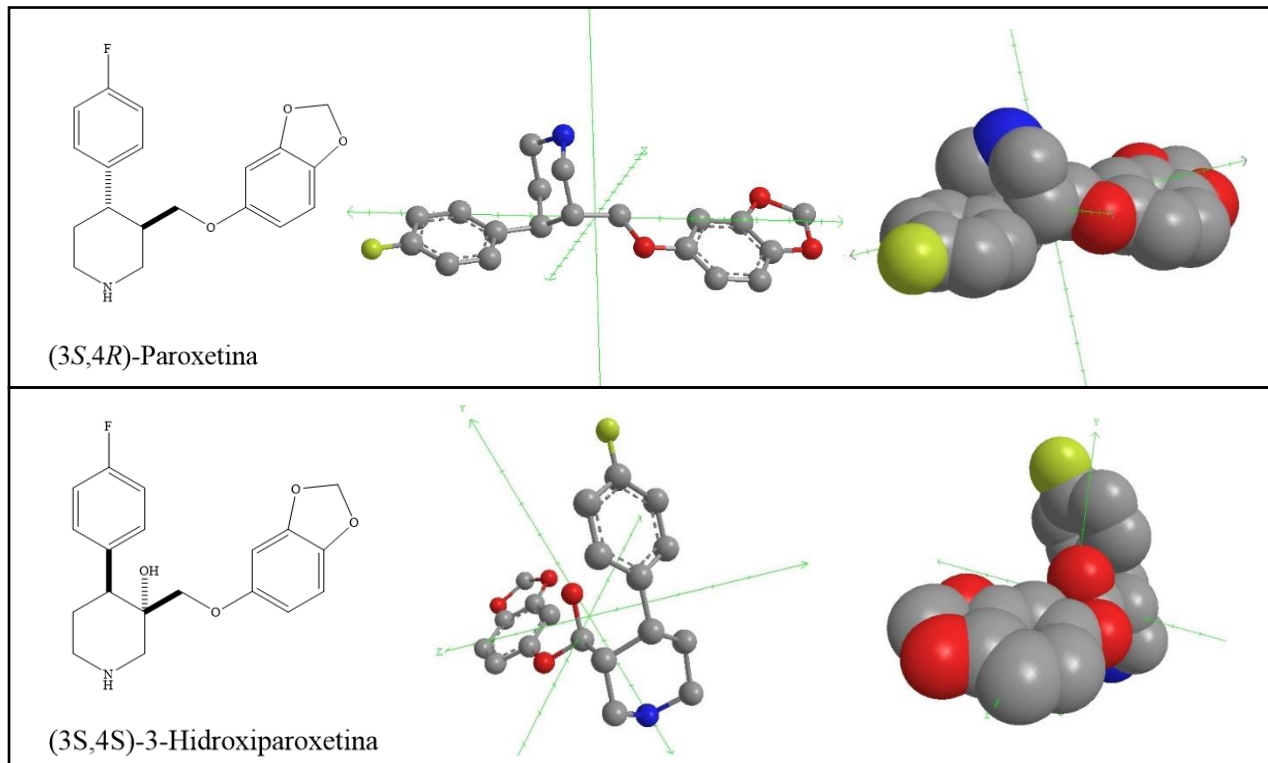


Figura 4. Modelaje de la estructura moléculas de la (3R,4R)-Paroxetina (arriba) y su análogo (3S,4S)-3-Hidroxiparoxetina (abajo) se puede observar como el anillo fluorobenceno flanquea al sustituyente hidroxilo del análogo (Rudorfer y Potter, 1997).

1.5 El fragmento carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica

La toxina tetánica es una neurotoxina producida por la bacteria *Clostridium tetani* causante de la enfermedad del tétanos, la cual causa una parálisis espástica debido a que bloquea la neurotransmisión inhibitoria en músculo, siendo capaz de actuar a dosis inferiores a 1 ng/kg en ratón (Gill, 1982). La toxina está dividida en tres dominios funcionales (Figura 5) de ~ 50 kDa cada uno y corresponden al dominio catalítico (1–437), el dominio de translocación (448–872) y el dominio de unión (873–1295). El fragmento carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (Hc-TeTx) formado por los residuos 865 al 1315 (azul) (Emsley et al., 2000) es el responsable de su especificidad, mediante su interacción con polisialoganglósidos de la membrana plasmática. El subdominio H_{CN} (residuos 865-1110) está formado por 4 hélices- α y 16 láminas- β en un motivo de jelly-roll que podría actuar como un fragmento rígido espaciador, mientras que el subdominio H_{CC} (residuos 1111-1315) presenta una estructura de β -trébol con dos sitios de unión R1226 y W1289

los cuales son responsables de la unión específica a las membranas neuronales y su internalización (Lacy y Stevens, 1999).

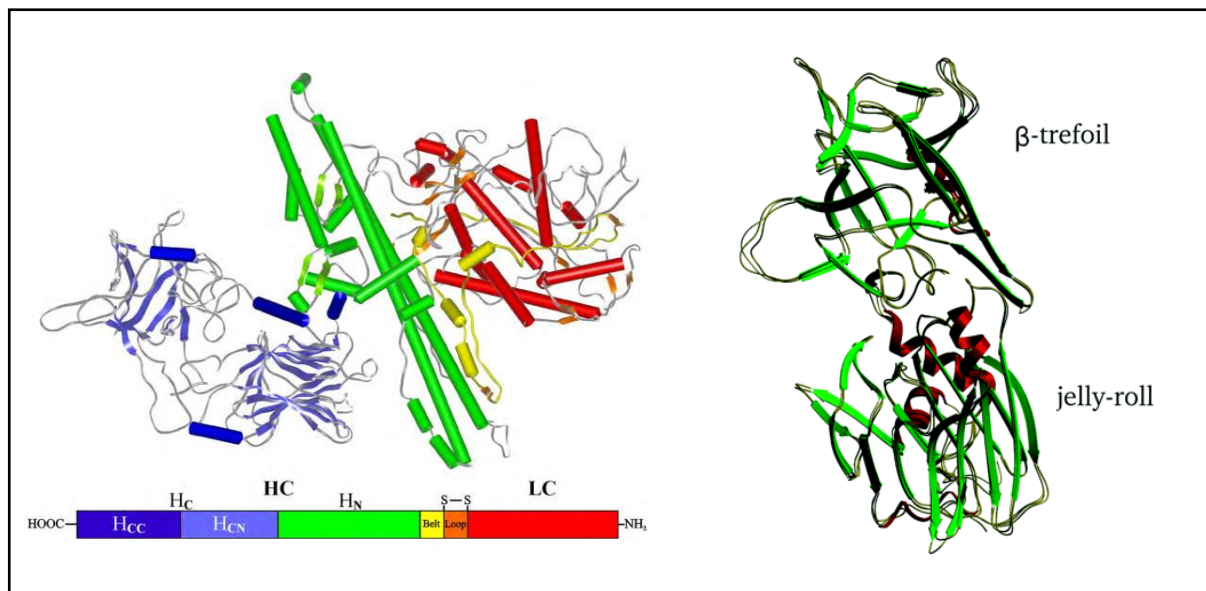


Figura 5. Cristalografía de la toxina tetánica (TeTx) (izquierda) compuesta por los dominios LC (rojo), HN (verde) y HC (azul). El fragmento HC se divide en los subdominios (derecha) H_{CN} donde se encuentra el motivo jelly-roll y H_{CC} perteneciente al motivo β-Trébol donde se encuentran sus sitios de unión, extraído y modificado de (Fotinou et al., 2001; Brunger y Rummel, 2009).

La internalización del fragmento Hc-TeTx (Figura 6) comparte la misma ruta de transporte endocítica que las neurotrofinas, se une específicamente con áreas no mielinizadas de las terminales nerviosas colinérgicas conocidas como balsas lipídicas, microdominios enriquecidos con esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Herreros et al., 2001), el fragmento Hc-TeTx interactúa con polisialoganglósidos de las series GD1b, GT1b y GQ1b, siendo la asociación con GT1b la más fuerte y específica (Calvo et al., 2012). Es a través de un mecanismo especializado dependiente de clatrina que las vesículas son escindidas por la acción de la dinamina y transportadas retroaxonalmente hasta llegar al soma de las α -motoneuronas para realizar un salto transináptico a las interneuronas inhibitorias (GABAérgicas y glicinérgicas) de la médula espinal (Saheki y De Camilli, 2012). La velocidad de transporte del fragmento Hc-TeTx está calculada entre 1-5 $\mu\text{m/s}$, correspondiente al transporte axonal rápido (Lalli y Schiavo, 2002). Al llegar al sistema nervioso, el fragmento Hc-TeTx es capaz de activar al receptor TrkB y su cascada

de señalización ERK-1/2, PI-3K/Akt y PLC de manera dependiente a la dosis (Gil et al., 2003), además de inhibir la recaptura de serotonina mediante la fosforilación del transportador SERT mediada por PKC (Aguilera et al., 1990; Gil et al., 1998).

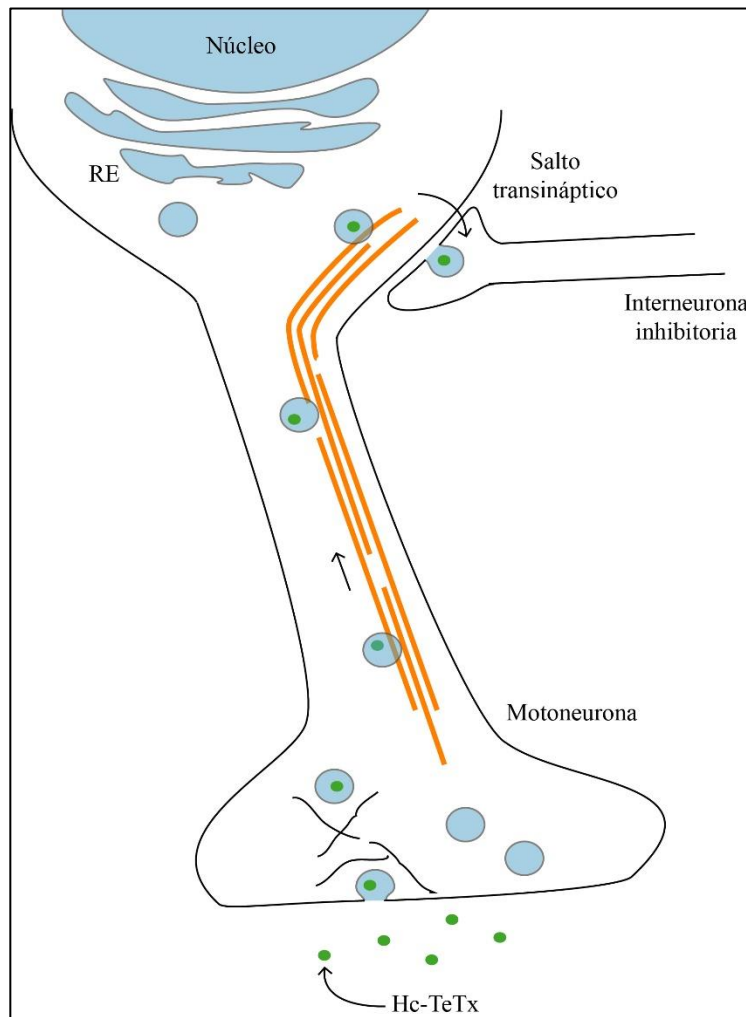


Figura 6. Mecanismo de transporte retrogrado axonal del fragmento Hc-TeTx. El fragmento Hc-TeTx se une con áreas no mielinizadas conocidas como balsas lipídicas, (Herreros et al., 2001), realiza un viaje retro axonal hasta llegar al soma de la motoneurona, donde realiza un salto transináptico hacia la interneurona inhibitoria de la medula espinal (Saheki y De Camilli, 2012).

1.6 Uso de la rotenona como neurotóxico para inducir depresión en ratón

La rotenona es un isoflavonoide neurotóxico de origen natural que se produce en las hojas, raíces y rizomas de las leguminosas tropicales de los géneros *Derris*, *Lonchocarpus* y *Tephrosia*; es un neurotóxico muy hidrófobo que atraviesa las membranas biológicas y sirve como un inhibidor no competitivo de alta afinidad del complejo I mitocondrial, produciendo estrés nitrosativo por el

aumento de los niveles de NO y MDA (Bashkatova et al., 2004), apoptosis neuronal, activación de astrocitos y células microgliales (Norazit et al., 2010), excitotoxicidad del glutamato (Johnson et al., 2008), agregación de la α -sinucleína y poliubiquitina (Cannon et al., 2009; Xiong et al., 2009).

La inhibición del complejo 1 mitocondrial inducido por rotenona (Figura 7) produce un desequilibrio entre la producción de ERO como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ion superóxido (O_2^{\cdot}) y el grupo hidroxilo (OH^{\cdot}), y la habilidad celular de defenderse frente a ellos, produciendo estrés oxidativo (LeDoux et al., 2007). El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo por su elevado consumo de oxígeno, altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, niveles relativamente altos de iones de metales de transición redox y bajos niveles de antioxidantes (Robb y Connor, 2002).

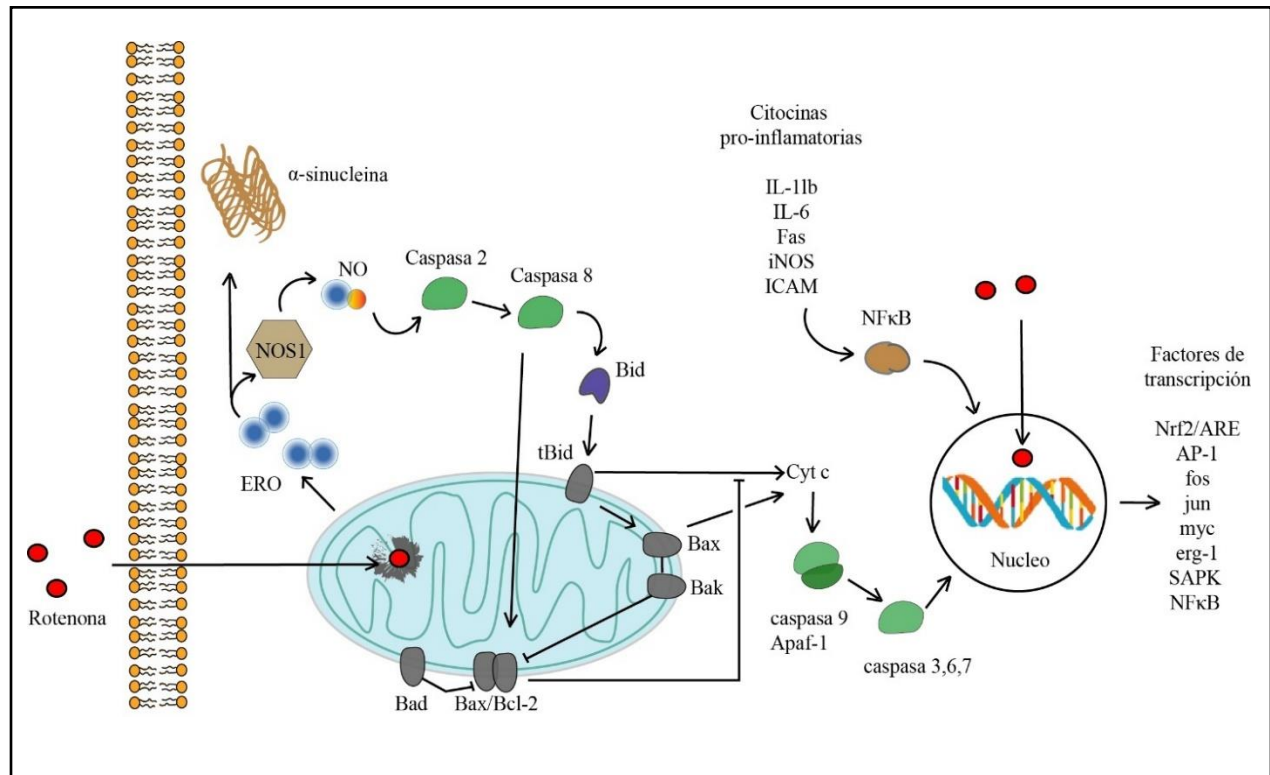


Figura 7. Mecanismo de acción de la rotenona. El estrés oxidativo es capaz de desencadenar la sobreexpresión de la NOS1 (óxido nítrico sintasa 1) neuronal, activando distintas vías de muerte celular como caspasa-2, que inducen la activación de efectores apoptóticos posteriores tales como Bid, Bax, caspasa 9 y caspasa 3 e inducir la liberación de citocromo-c mitocondrial (Tiwari et al., 2011), así como aumentar la expresión de numerosos factores de transcripción incluidos Nrf2/ARE, AP-1, fos, jun, myc, erg-1, SAPK y el factor nuclear κ B (NF κ B) (Calabrese et al., 2004; Escartin y Bonvento, 2008; Johnson et al., 2008; Pistollato et al., 2017).

La muerte neuronal dopaminérgica inducida por rotenona podría depender del proceso inflamatorio asociado con la activación microglial (Ogawa et al., 2005) ya que la estimulación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, Fas, iNOS e ICAM están implicadas en la activación de NF- κ B la que a su vez contribuye a la degeneración neuronal (Davis y Syapin, 2004) induciendo astrogliosis y alteraciones en la expresión de γ -tubulina, STAT3, conexina 43 y una desorganización del centrosoma con agregados de α -sinucleína (Diaz-Corrales et al., 2005). Finalmente, la rotenona potencia la excitotoxicidad del glutamato al unirse a los receptores NMDA e inhibiendo la capacidad de Mg²⁺ para bloquear los canales NMDA e impidiendo la repolarización de la membrana (Wu y Johnson, 2009), induciendo la pérdida del potencial de membrana, la apertura de los poros de transición de permeabilidad y la liberación de moléculas proapoptóticas (Cherian et al., 2000)

1.7 Modelos en animales de laboratorio para evaluar depresión

Un problema en el estudio de nuevos fármacos antidepresivos es la falta de modelos animales fiables, ya que el modelo debe presentar características semejantes a las observadas en humanos, además de ser sensibles al tratamiento con antidepresivos. Si bien el síndrome psiquiátrico completo de la depresión no se puede generar en modelos animales, ya que síntomas como la culpa, el suicidio y el estado patológico de tristeza son características puramente humanas, mientras otras características conductuales como el retraso psicomotor, hiperactividad, anhedonia y trastornos del sueño (Nesse, 2000; Watson y Andrews, 2002), aspectos relacionados con la ansiedad y el estrés, que tienen una función adaptativa para protegerse frente alguna posible amenaza, se han replicado en animales de laboratorio (Sloman, 2008). De este modo, algunos modelos animales de depresión pretenden analizar cuantitativamente alguna forma de derrota o desesperanza inducida experimentalmente, pero este aspecto del comportamiento en los mamíferos es adaptativo y no patológico. El comportamiento de la desesperanza es entendido como si fuera depresión inducida, debido a la reducción de la exploración, inmovilidad, hipertermia por estrés y miedo (Krishnan y Nestler, 2011). Existen varios enfoques metodológicos para la construcción de modelos animales de los trastornos neuropsiquiátricos, como son: (a) Genéticos, alterando la expresión o función específica de proteínas, vías bioquímicas o circuitos neuronales mediante mutaciones o deleciones de secuencias de ADN; (b) Farmacológicos, por la administración de agonistas o antagonistas de la

neurotransmisión; (c) Ambiental, por la exposición a eventos estresantes; (d) Por estimulación eléctrica o mediante lesiones realizadas en regiones específicas del cerebro (Nestler y Hyman, 2010).

La prueba de CA es una de las más utilizadas para medir el comportamiento en modelos animales, es una prueba rápida y fácil que proporciona una variedad de información sobre el comportamiento, desde la capacidad ambulatoria general hasta datos relacionados con las emociones (Walsh y Cummins, 1976). Los roedores, muestran aversión a entornos grandes, bien iluminados, abiertos y desconocidos. Podemos suponer que han sido condicionados filogenéticamente a través de un proceso evolutivo para ver este tipo de entornos como peligrosos (Denenberg, 1969; Choleris et al., 2001). La prueba de CA también ha sido propuesta como predictora de la susceptibilidad a pruebas que evalúan la impotencia como son NF y SC, dada la relación sintomática de la ansiedad y la inmovilidad con la depresión (Padilla et al., 2010). Estudios realizados con ISRS en ratón han mostrado una reducción de la disfunción motora y un aumento de la conducta exploratoria inducida con glucocorticoides (David et al., 2009) y por estrés ambiental (Wu et al., 2019).

La prueba de NF fue introducida originalmente por Porsolt, (Porsolt et al., 1977a) en roedores para la detección de conductas depresivas. En esta prueba, la inmovilidad es considerada una medida de desesperanza y si el tratamiento con un fármaco reduce el tiempo de inmovilidad, el fármaco podría considerarse un "antidepresivo". Sin embargo, la prueba también tiene algunos inconvenientes, como su poca confiabilidad en la detección de los efectos de los ISRS, que es un grupo importante de medicamentos antidepresivos (Can et al., 2012b). Este modelo se basa en la observación de que el ratón al ser forzado a nadar colocándolo en un tanque con agua, cesará de moverse después de un período de intensa actividad (Porsolt et al., 1977b), se ha observado que este comportamiento fácilmente identificable se debe a un estado de aprendizaje donde el ratón comprende que es imposible poder escapar. En el NF original de Porsolt para ratas, los animales eran sometidos a dos exposiciones. La primera exposición para inducir un nivel estable de inmovilidad, y la segunda exposición para cuantificar la inmovilidad después del tratamiento con fármaco o vehículo, mientras que por razones que aún no son claras, los ratones muestran un nivel de inmovilidad suficientemente estable desde la primera exposición durante los últimos 4 minutos de una prueba de natación de 6 minutos (Castagné et al., 2011). En 1985 fue diseñada la prueba de SC, un nuevo procedimiento para estudiar antidepresivos basado en el modelo de Porsolt, en que el ratón es suspendido por su cola de una saliente y es registrado el movimiento por un lapso de 6 min, los cuales serán divididos en períodos de agitación e inmovilidad, siendo que los fármacos antidepresivos disminuyen el

tiempo de inmovilidad. Las principales ventajas de este procedimiento son su sencilla ejecución, y la sensibilidad a una amplia gama de medicamentos (Steru et al., 1985).

La anhedonia es la incapacidad de experimentar placer por las actividades gratificantes o agradables y es uno de los síntomas centrales de la depresión en los seres humanos, en los animales de laboratorio es posible medir la anhedonia mediante una prueba de preferencia a sacarosa (PS). En esta prueba los roedores naturalmente consumen y beben ávidamente alimentos dulces, sin embargo, cuando se exponen a modelos de depresión provocados por estrés, en un paradigma de elección de dos botellas, los roedores no muestran preferencia por beber agua endulzada. En la prueba PS les son presentadas dos botellas, una con solución endulzada y otra con agua sin endulzar, al finalizar la prueba, es cuantificado el volumen del líquido restante y calculado en porcentaje la preferencia de la solución endulzada frente al agua sin endulzar y la ingesta total de líquidos (Zhang et al., 2017). La proporción entre la ingesta de la solución endulzada con relación a la ingesta total se considera como una medida de preferencia de sabor.

El estrés físico crónico leve, la prueba de nado forzado y el neurotóxico rotenona han sido identificados como estresores capaces de inducir anhedonia (McDowell y Chesselet, 2012; Hu et al., 2017), mientras que estudios realizados con ISRS en ratón han mostrado una recuperación parcial de la preferencia por el agua endulzada desde la primera semana de tratamiento y una recuperación total en la tercera semana (Kubera et al., 2013). Hasta la fecha, se han informado resultados inconsistentes y variables después del uso del PS por diferentes grupos, probablemente debido al uso de diferentes protocolos, equipos y cepas de roedor (Strekalova et al., 2011; Liu et al., 2018).

II Justificación

Los trastornos depresivos representan un problema de salud pública a nivel mundial, genera altos costos y hay incapacidad laboral en los afectados. Para tratar esta enfermedad se han desarrollado diversas familias de antidepresivos, con el fin de mejorar la eficacia y reducir los efectos no deseados de sus predecesores, un ejemplo son los ISRS de las primeras generaciones. Actualmente gracias al diseño de medicamentos y a técnicas de modelado por computadora ha sido posible desarrollar un análogo hidroxilado de la paroxetina denominado *DDCHA-V4INV o (3S,4S)-3OHpx*, del cual se espera obtener algunas mejoras farmacocinéticas como su biodisponibilidad, también aprovechando la posible actividad de los nuevos metabolitos secundarios. Otra molécula con probable actividad como antidepresivo es el fragmento carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (Hc-TeTx), el cual es capaz de producir un efecto neuroprotector en distintos modelos neurotóxicos y mejorar los niveles sinápticos de serotonina.

Uno de los principales obstáculos en la investigación de nuevas moléculas con potencial antidepresivo es la poca fiabilidad que presentan los modelos depresivos y conductuales frente a nuevos fármacos, por lo cual es necesario validar la información obtenida con varias pruebas y modelos. Recientemente ha sido utilizado el neurotóxico rotenona para inducir un estado conductual con características depresivas en modelos animales. Este modelo permite evaluar los efectos de nuevas sustancias con posible efecto como antidepresivo.

III Hipótesis

El análogo hidroxilado de la paroxetina, el clorhidrato (3S,4S)-3-hidroxi-paroxetina (3-OHPx) y el fragmento Hc-TeTx reducen la depresión inducida por la administración de rotenona en ratona.

3.1 Hipótesis nula

El análogo hidroxilado de la paroxetina, el clorhidrato (3S,4S)-3-hidroxi-paroxetina (3-OHPx) y el fragmento Hc-TeTx no reducen la depresión inducida por la administración de rotenona en ratona.

IV Objetivo general

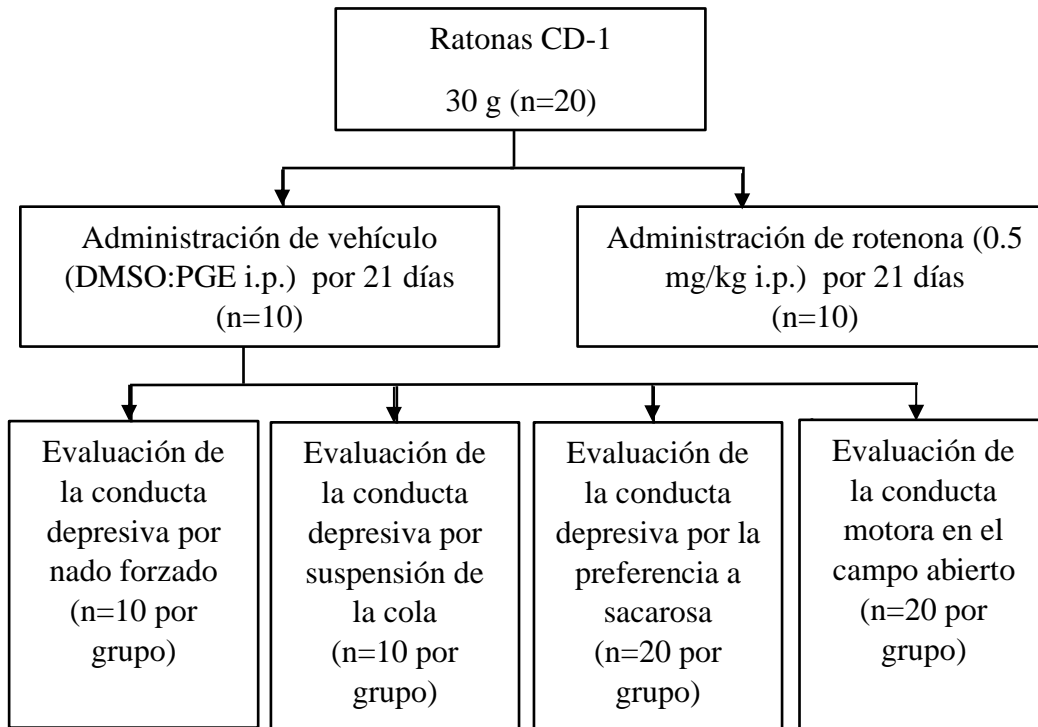
Comparar el efecto antidepresivo del análogo hidroxilado (3S,4S)-3-OHPx y del fragmento Hc-TeTx sobre la depresión inducida por rotenona.

4.1 Objetivos específicos

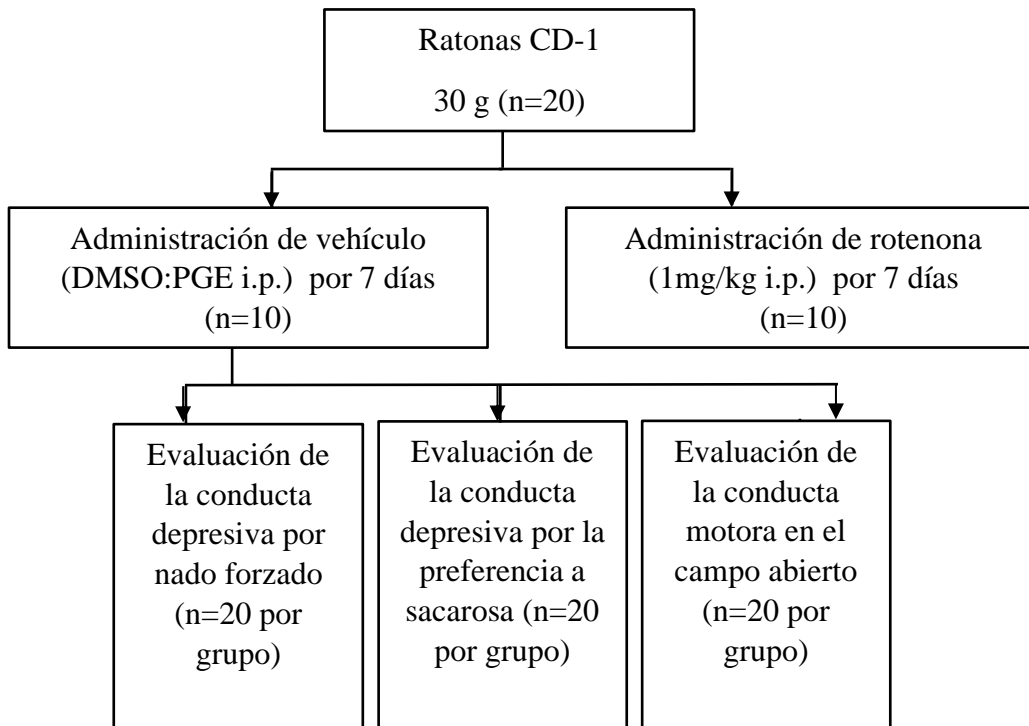
1. Establecer la conducta depresiva por rotenona en la prueba de nado forzado, suspensión de la cola y en actividad motora.
2. Determinar el efecto antidepresivo del 3-OHPx y del fragmento Hc-TeTx con la administración de 0.5 mg/kg de rotenona durante 21 días.
3. Determinar el efecto antidepresivo del 3-OHPx y del fragmento Hc-TeTx con la administración de 1 mg/kg de rotenona durante 7 días.

V Diagrama de Trabajo

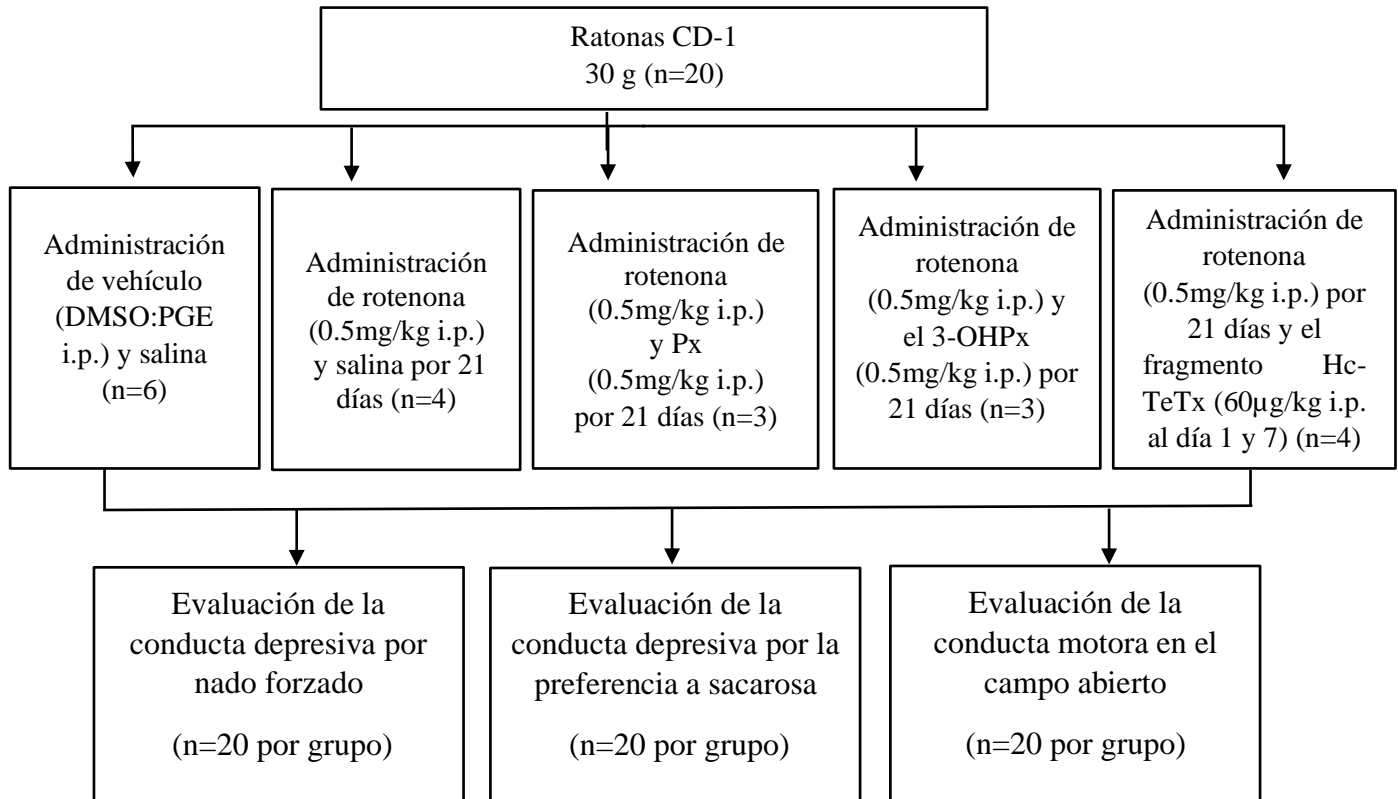
5.1 Establecer el modelo depresivo de rotenona a una dosis baja de 0.5mg/kg por 21 días



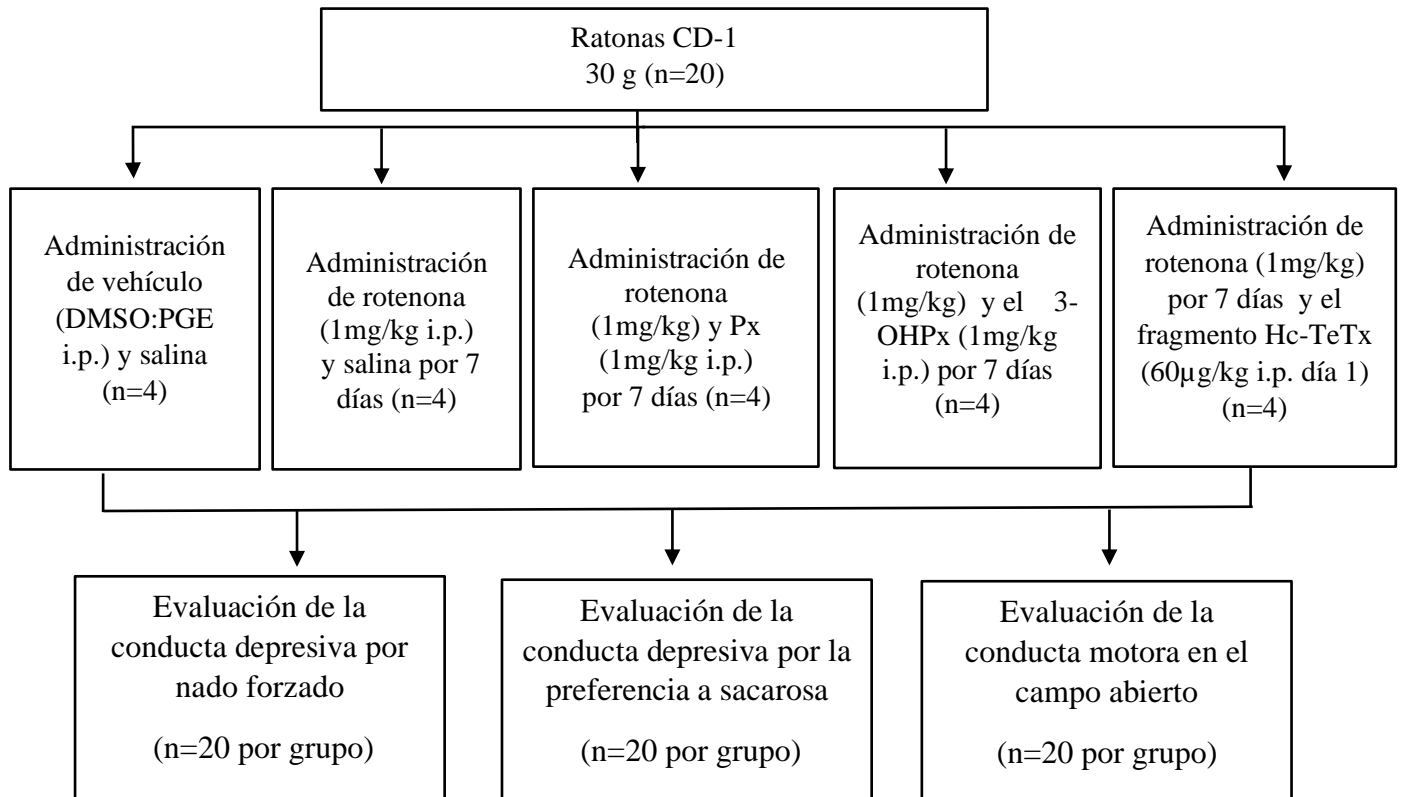
5.2 Establecer el modelo depresivo por rotenona a una dosis alta de 1mg/kg por 7 días.



5.2 Evaluar el efecto antidepresivo del 3-OHPx y el fragmento Hc-TeTx en el modelo de rotenona a una dosis baja de 0.5mg/kg por 21 días



5.3 Evaluar el efecto antidepresivo del 3-OHPx y el fragmento Hc-TeTx en el modelo de rotenona a una dosis alta de 1mg/kg por 7 días.



VI Metodología general

6.1 Animales

Usamos 80 ratonas de la cepa CD1 (30g) proporcionadas por el Bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla fueron divididas en diferentes grupos para la realización de tres experimentos. Los animales se mantuvieron en el vivario del laboratorio de Neuroquímica, FCQ-BUAP a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, una humedad relativa de $50\% \pm 5$ y con un ciclo de luz/oscuridad 12/ 12h, separados en cajas de acrílico en grupos de 5 ratonas, con libre acceso de agua y alimento. El manejo de los animales fue con base en las normas establecidas por el comité ético y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.2 Tratamientos

La rotenona (ABCAM) fue disuelta en una solución oleosa de dimetilsulfóxido (DMSO)-polietilenglicol (PEG) con una relación de 1:1 con agitación y oscuridad, se tomaron alícuotas de 1 mL y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

La paroxetina (Pax) y el análogo (*3S,4S*)-*3OHparoxetina* (*3-OHPx*) fueron donados por el Dr. Fernando Sartillo Piscil del laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP como sal purificada y deshidratada hasta su utilización, posteriormente fueron disueltos en SSI y conservados en refrigeración.

El liofilizado del fragmento Hc-TeTx, el cual fue donado por el Dr. José Aguilera de la Universidad Autónoma de Barcelona, fue disuelto en solución salina isotónica (SSI), hasta obtener una concentración de 0.1 mg/ml y almacenado a -20°C hasta su utilización.

6.3 Grupos experimentales

Cada grupo de ratonas fue aleatorizado y dividido en subgrupos: vehículo (DMSO:PEG), rotenona+vehículo, rotenona+Px, rotenona+3-OHPx, rotenona+Hc-TeTx.

Una vez alcanzado un peso promedio de 30g, las ratonas fueron administradas con SSI como vehículo acuoso, DMSO:PEG como vehículo oleoso, rotenona, Pax, 3-OHPx, o el fragmento HcTeTx (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis administrada de rotenona y fármacos a los diferentes grupos

	Rotenona	Fármacos
Grupo 1	Rotenona 0.5 mg/kg i.p. por 21 días	
Grupo 2	Rotenona 0.5 mg/kg i.p. por 21 días	Pax 0.5mg/kg, 3-OHPx 0.5mg/kg, i.p. por 21 días y Hc-TeTx 60µg/kg i.m. al día 1 y 7
Grupo 3	Rotenona 1 mg/kg i.p. por 7 días	
Grupo 4	Rotenona 1 mg/kg i.p. por 7 días	Pax 1 mg/kg, 3-OHPx 1mg/kg i.p. por 7 días y Hc-TeTx 60µg/kg en una dosis única

6.4 Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales se realizaron 2 horas después de la última administración de los fármacos de forma secuencial: campo abierto y nado forzado o suspensión de la cola.

La prueba de anhedonia o preferencia a sacarosa (PS) tiene una duración de 24 horas, transcurrido este tiempo se procedió a mover a las ratonas al área donde se realizaron las pruebas conductuales 30 minutos después de su periodo de habituación, se realizaron las pruebas.

En la prueba de PS fueron presentados por 24 horas 2 botellas, conteniendo 50/ml de agua o 50/ml de una solución de sacarosa al 2%, las botellas fueron intercambiadas a las 12 horas y retiradas a las 24 horas, el líquido restante fue recolectado y cuantificado para determinar la preferencia por la solución endulzada (Zhang et al., 2017).

$$\text{Preferencia a sacarosa} = \frac{\text{ingesta de sacarosa} + \text{ingesta de agua}}{\text{ingesta de sacarosa}}$$

Para la prueba conductual de campo abierto (CA) se utilizó una caja de plástico acrílico negro. La prueba de CA consiste en un área cerrada por sus lados de 55x60cm y una altura de 30cm, suficiente para evitar que el ratón escape, cada ratona debe ser introducida al cuarto de conducta 30 minutos antes de comenzar la prueba para su habituación, la ratona es tomada suavemente por la cola e introducida en el centro del CA y videograbada por 6 minutos, registrando el desplazamiento (línea continua) y el número de cruces a través del campo central (rojo) (Figura 8). Después de transcurridos los 6 min la ratona es retirada tomándola por la cola y es devuelta a su caja, el campo es limpiado con una solución alcohólica al 70% para iniciar la prueba con el próximo sujeto (Seibenhener y Wooten, 2015); (Khadrawy et al., 2017).

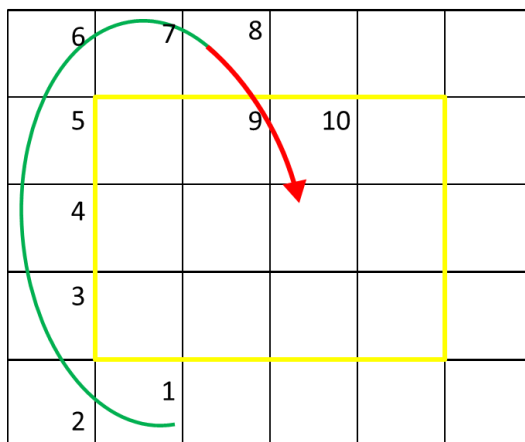


Figura 8. Recorrido realizado por una ratona en la prueba de CA, se registró 1 desplazamiento (línea continua) cada vez que el animal atravesó con las patas traseras un espacio de la cuadrícula, también fue registrado el número de cruces a través del campo central (rojo).

La prueba de nado forzado (NF) se realizó en un tanque cilíndrico de acrílico transparente de 22x30cm llenado con 3 litros de agua a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$, según la temperatura corporal del ratón. Este volumen evita que la ratona no toque la base del cilindro con la cola. Todo el procedimiento fue videograbado; se cuantificó el tiempo de inmovilidad, tomando como inmovilidad el ligero movimiento necesario para mantener el equilibrio, al terminar la evaluación de cada uno de los sujetos el tanque fue lavado y llenado nuevamente, evitando así alguna reacción hormonal (Can et al., 2012b). En la prueba de SC, cada ratona fue suspendida por su cola con cinta adhesiva a una saliente, en una posición tal que no puedan escapar ni aferrarse a las superficies cercanas, fue videograbada durante 6 min y se cuantificó el tiempo de inmovilidad, tomando como inmovilidad los pequeños movimientos exploratorios que no indicaron un intento de escape (Can et al., 2012a). La prueba de SC dejó de ser utilizada y NF al mostrar mayor sensibilidad en el modelo de rotenona fue utilizado en el resto de las pruebas.

6.5 Análisis de datos

Solo fueron cuantificados para el análisis los últimos 5 minutos videograbados de las pruebas conductuales, omitiendo el primer minuto. Para el análisis estadístico entre los grupos Vehículo, Rotenona, Paroxetina, 3-OHPx y Hc-TeTx fue utilizada la prueba ANOVA para determinar si existe diferencia entre las medias, en caso de ser rechazada la hipótesis nula H_0 se realizó la prueba post-hoc de Tukey. Al comparar los grupos Vehículo y Rotenona fue utilizada la prueba de t-student.

VII Resultados

7.1 Con el fin de evaluar si la rotenona es capaz de producir depresión en ratonas CD1, se administró una dosis baja de 0.5mg/kg por 21 días, y fueron evaluadas en las pruebas de PS, CA, NF y SC. El parámetro para evaluar en la prueba de PS es la preferencia por el agua endulzada, los resultados muestran que la rotenona no causó anhedonia (Figura 9). El parámetro para evaluar en la prueba de CA es el número de cuadros visitados, en donde se muestra una disminución (Figura 10). El parámetro para evaluar en las pruebas de NF y SC es el tiempo de inmovilidad, los resultados muestran que la administración de rotenona si es capaz de aumentar el tiempo de inmovilidad en el grupo que realizó NF (Figura 11), pero no en el que realizó SC, donde no se muestran cambios (Figura 12). Los resultados de estas pruebas permitieron determinar la sensibilidad de estas al modelo depresivo con rotenona y se decidió utilizar la prueba de NF en las futuras evaluaciones, descartando la prueba de SC.

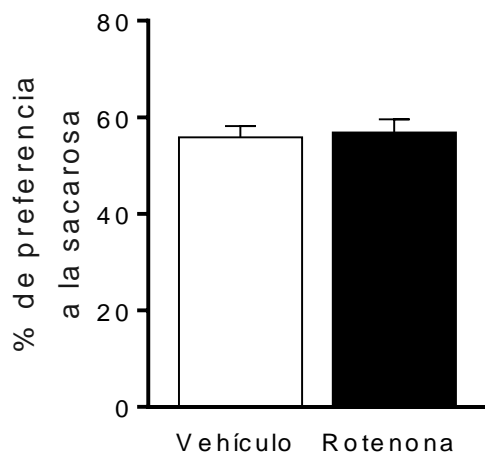


Figura 9. Anhedonia de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Finalizado el tratamiento se evaluó la preferencia a sacarosa. El gráfico representa el promedio \pm ESM del porcentaje de agua endulzada consumida durante 24 horas. No se observan diferencias estadísticas entre los grupos al realizar una prueba *t-student* no pareada $P < 0.05$.

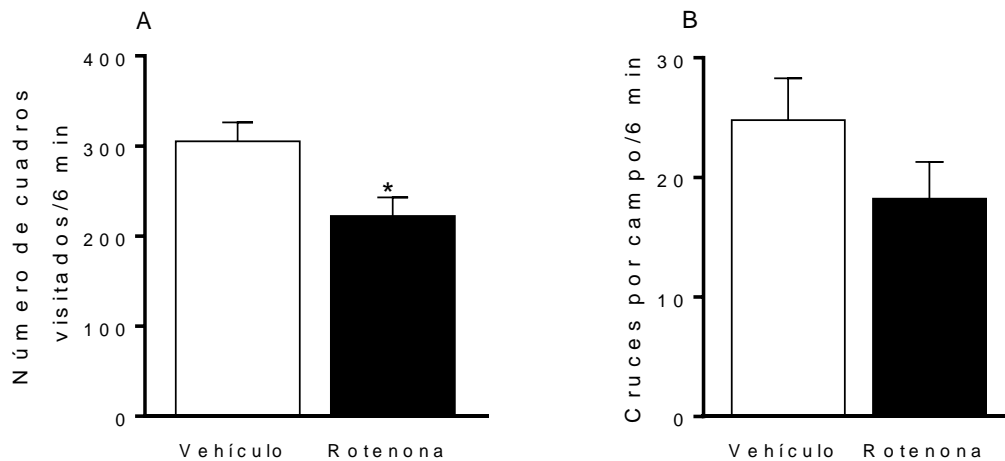


Figura 10. Conducta motora de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta motora en campo abierto. El gráfico representa el promedio \pm ESM. En A se observa una diferencia estadística entre los grupos $*P < 0.05$. En B no se observan diferencias significativas entre ambos grupos. El análisis estadístico se realizó con una prueba t-student no pareada $P < 0.05$.

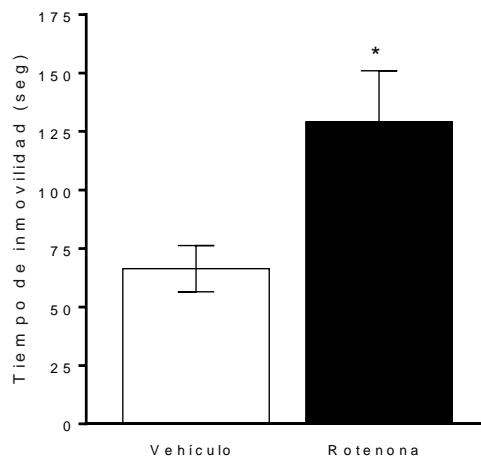


Figura 11. Inmovilidad en nado forzado de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta depresiva en la prueba de nado forzado. El gráfico representa el promedio del tiempo en segundos \pm ESM. Los resultados indican que el tratamiento con rotenona incrementó el tiempo de inmovilidad respecto al vehículo $*P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con una prueba t-student no pareada $P < 0.05$.

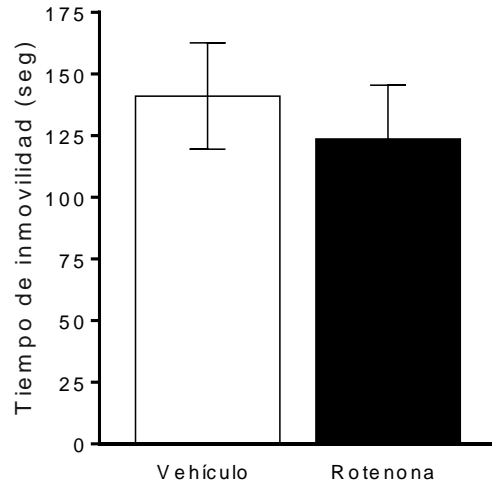


Figura 12. Inmovilidad en suspensión de la cola de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta depresiva en la prueba de suspensión de la cola. El gráfico representa el promedio del tiempo en segundos \pm ESM. Los resultados indican que el tratamiento con rotenona no modificó el tiempo de inmovilidad respecto al vehículo. El análisis estadístico se realizó con una prueba t-student no pareada $P < 0.05$.

7.2 Con el fin de determinar el efecto de las moléculas con probable efecto antidepresivo en el modelo de rotenona a baja dosis de 0.5mg/kg por 21 días en ratonas CD1, fueron evaluadas en las pruebas de PS, CA y NF. El parámetro para evaluar en la prueba de PS es la preferencia por el agua endulzada, los resultados muestran que no hay diferencia entre el grupo Vehículo vs Rotenona, pero muestran una disminución tendencial en la preferencia por la sacarosa en los grupos que recibieron alguno de los fármacos, con diferencia significativa en el grupo HcTeTx (Figura 13). El parámetro para evaluar en la prueba de CA es el número de cuadros visitados, los resultados muestran que no hay diferencia entre el grupo Vehículo vs Rotenona, pero muestran una disminución tendencial en el número de cuadros visitados en los grupos que recibieron alguno de los fármacos, con diferencia significativa en el grupo HcTeTx (Figura 14). El parámetro para evaluar en las pruebas de NF es el tiempo de inmovilidad, los resultados muestran un aumento en el tiempo de inmovilidad con una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Rotenona vs Vehículo, con una recuperación parcial observada en los grupos que recibieron los fármacos Px y 3OHPx (Figura 15).

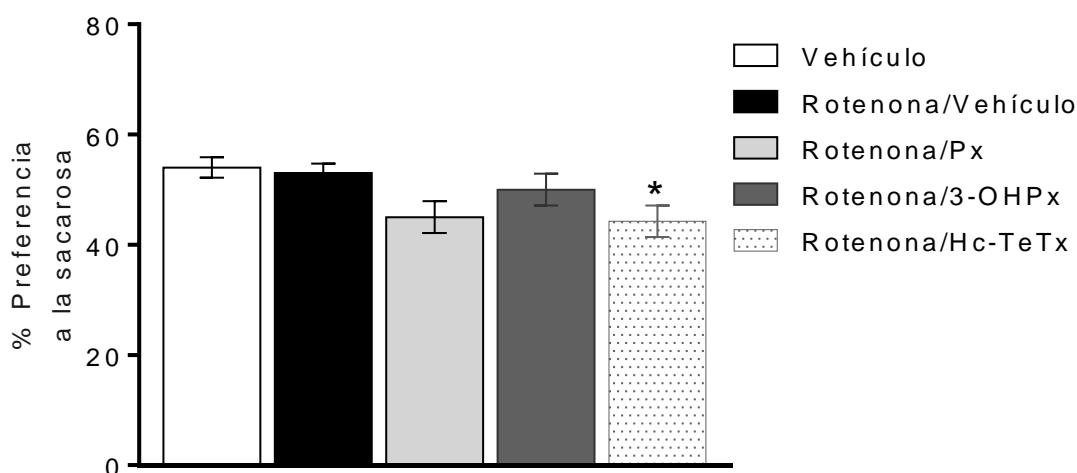


Figura 13. Preferencia a sacarosa de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Además, los animales tuvieron un tratamiento con vehículo (salina), paroxetina (Px), el análogo 3-OHPx, y el Hc-TeTx. La gráfica muestra el promedio del porcentaje de preferencia a la sacarosa \pm ESM. Los resultados indican que el tratamiento con rotenona no modificó causa anhedonia. No obstante, el grupo que recibió el tratamiento con rotenona y el fragmento Hc-TeTx presentó anhedonia respecto al grupo vehículo *P <0.05. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba de múltiples comparaciones de Tukey P < 0.05.

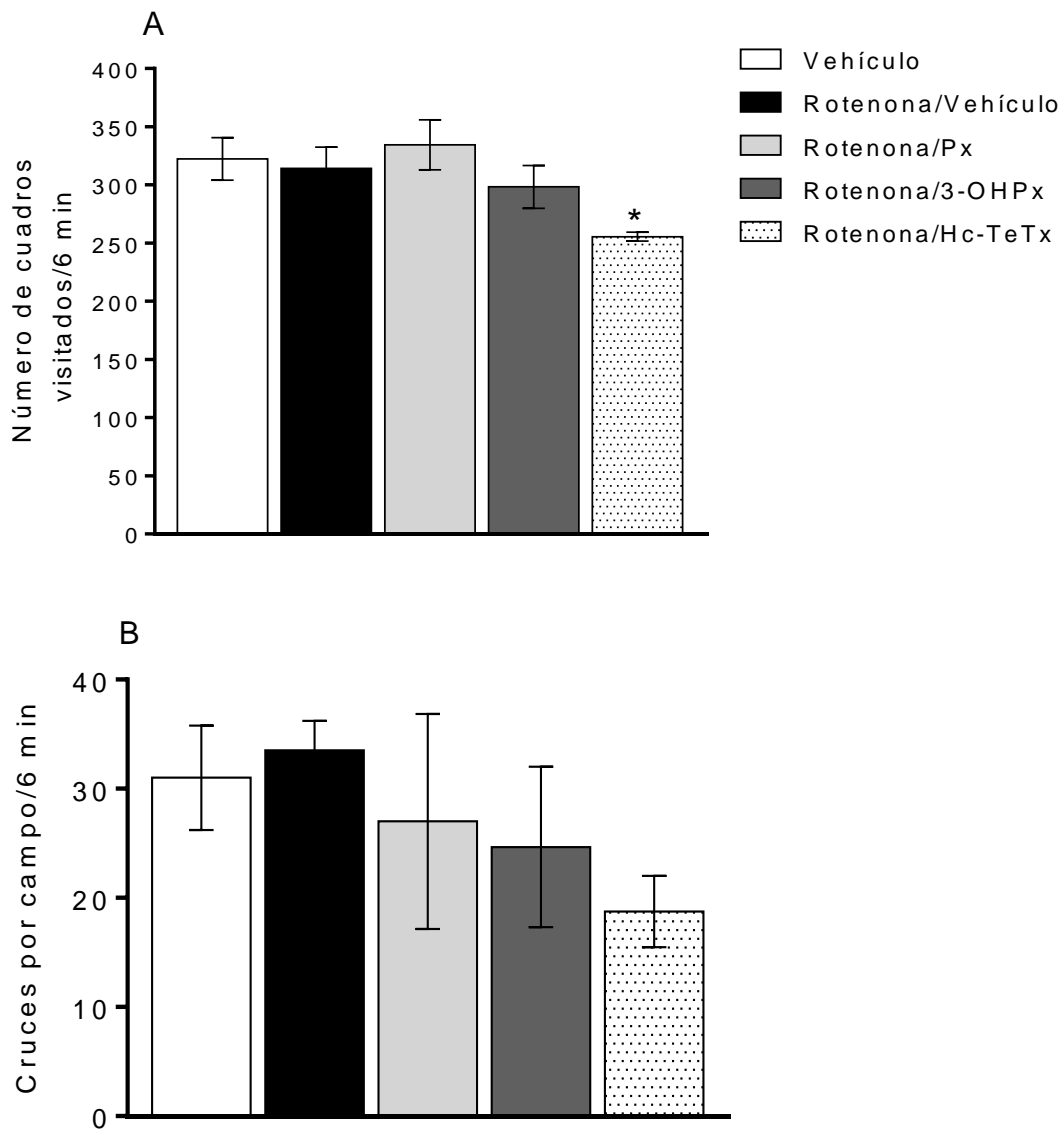


Figura 14. Conducta motora de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Además, los animales tuvieron un tratamiento con vehículo (salina), paroxetina (Px), el análogo 3-OHPx, y el Hc-TeTx. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta motora en campo abierto. El gráfico representa el promedio \pm ESM. En A Se observa una disminución significativa en el grupo que recibió el fragmento Hc-TeTx vs el grupo vehículo * $P < 0.05$. En B no se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba de múltiples comparaciones de Tukey $P < 0.05$.

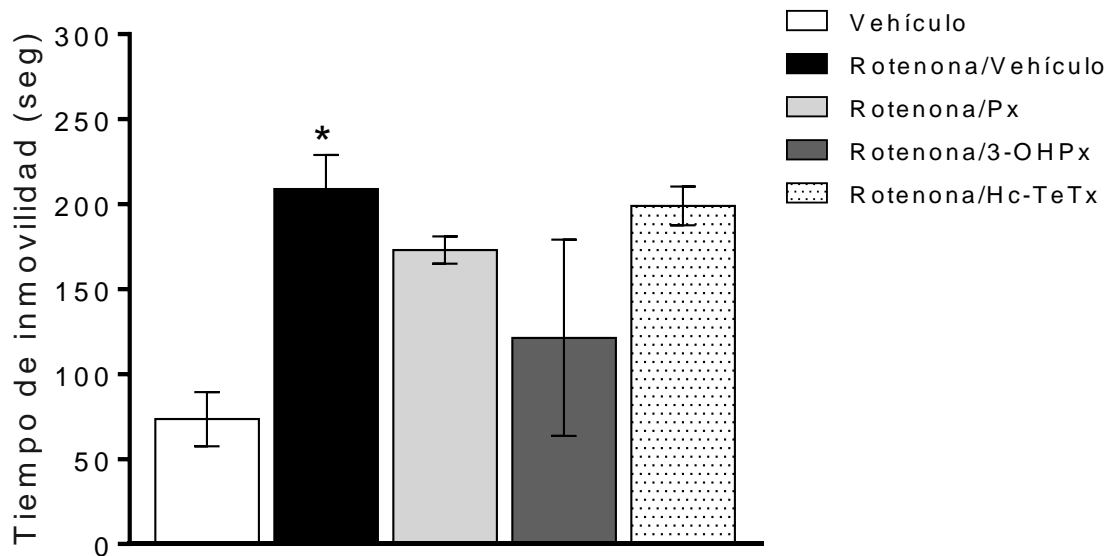


Figura 15. Inmovilidad en nado forzado de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 0.5 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 21 días. Además, los animales tuvieron un tratamiento con vehículo (salina), paroxetina (Px), el análogo 3-OHPx, y el Hc-TeTx. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta depresiva en nado forzado. El gráfico representa el promedio de tiempo de inmovilidad \pm ESM. Los resultados indican que la rotenona incrementó el tiempo de inmovilidad respecto al grupo control $*P < 0.05$. Además, se encontró que los diferentes tratamientos no presentaron acción antidepresiva a los 21 días de tratamiento. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba de múltiples comparaciones de Tukey $P < 0.05$.

7.3 Con el fin de evaluar si la rotenona es capaz de producir depresión en ratonas CD1, se administró una dosis alta de 1mg/kg por 7 días, y fueron evaluadas en las pruebas de CA y NF. El parámetro para evaluar en la prueba de CA es el número de cuadros visitados, en donde no se muestran cambios (Figura 16). El parámetro para evaluar en las pruebas de NF es el tiempo de inmovilidad, los resultados muestran que la administración de rotenona si es capaz de aumentar el tiempo de inmovilidad de forma significativa, en la prueba de NF (Figura 17).

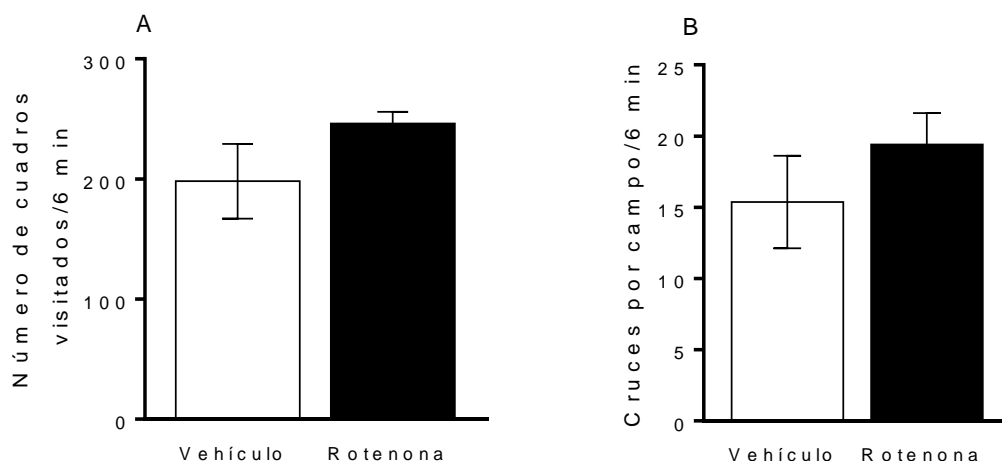


Figura 16. Conducta motora de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 1mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 7 días. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta motora en campo abierto. El gráfico representa el promedio \pm ESM. No se observa diferencia estadística en los grupos A y B $*P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con una prueba t-student no pareada $P < 0.05$.

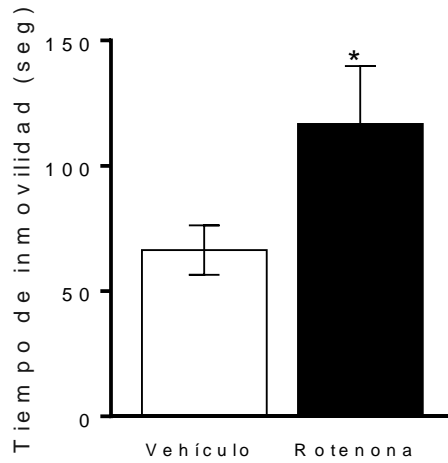


Figura 17. Inmovilidad en nado forzado de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 1mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 7 días. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta depresiva en la prueba de nado forzado. El gráfico representa el promedio del tiempo en segundos \pm ESM. Los resultados indican que el tratamiento con rotenona incrementó el tiempo de inmovilidad respecto al vehículo *P < 0.05. El análisis estadístico se realizó con una prueba t-student no pareada P < 0.05.

7.4 Con el fin de determinar el efecto de las moléculas con probable efecto antidepresivo en el modelo de rotenona a una dosis alta de 1mg/kg por 7 días en ratonas CD1, fueron evaluadas en las pruebas de PS, CA y NF. El parámetro para evaluar en la prueba de PS es la preferencia por el agua endulzada, los resultados muestran que no hay diferencia entre el grupo Vehículo vs Rotenona, pero muestran un aumento en la preferencia por la sacarosa en los grupos que recibieron alguno de los fármacos (Px, 3, OHPx, Hc-TeTx) (Figura 18). El parámetro para evaluar en la prueba de CA es el número de cuadros visitados, los resultados muestran que no hay diferencia entre el grupo Vehículo vs Rotenona, pero se muestra un aumento tendencial en el número de cruces por el campo en los grupos que recibieron los fármacos (Px, 3, OHPx, Hc-TeTx) (Figura 19).

El parámetro para evaluar en las pruebas de NF es el tiempo de inmovilidad, los resultados muestran un aumento en el tiempo de inmovilidad con una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Rotenona vs Vehículo, con una recuperación estadísticamente significativa observada en el grupo que recibió Px (Figura 20).

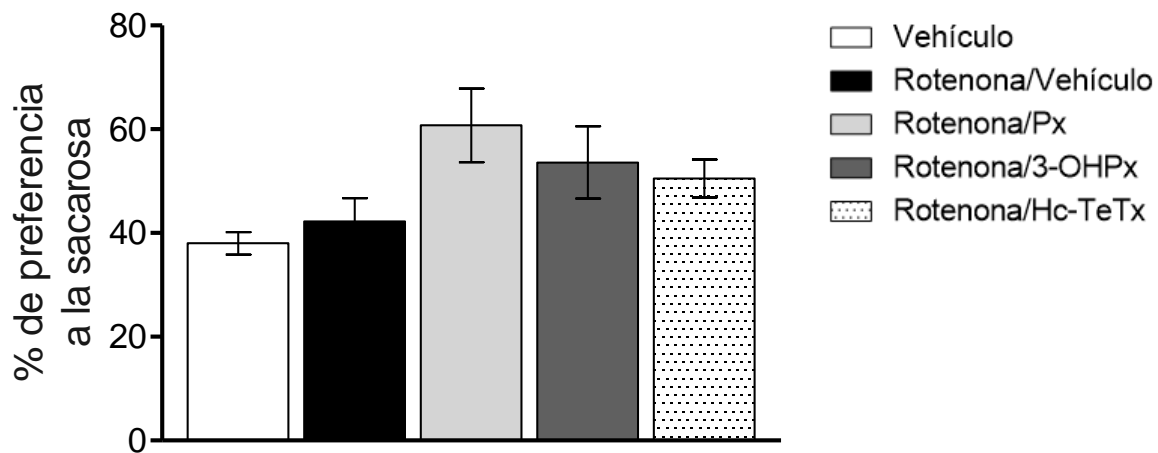


Figura 18. Preferencia a sacarosa de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 1 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 7 días. Además, los animales tuvieron un tratamiento con vehículo (salina), paroxetina (Px), el análogo 3-OHPx, y el Hc-TeTx. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta de anhedonia. El gráfico representa el promedio del porcentaje de preferencia a sacarosa \pm ESM. Los resultados indican que no existen diferencias significativas de los diferentes grupos experimentales respecto al grupo vehículo. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. $P < 0.05$.

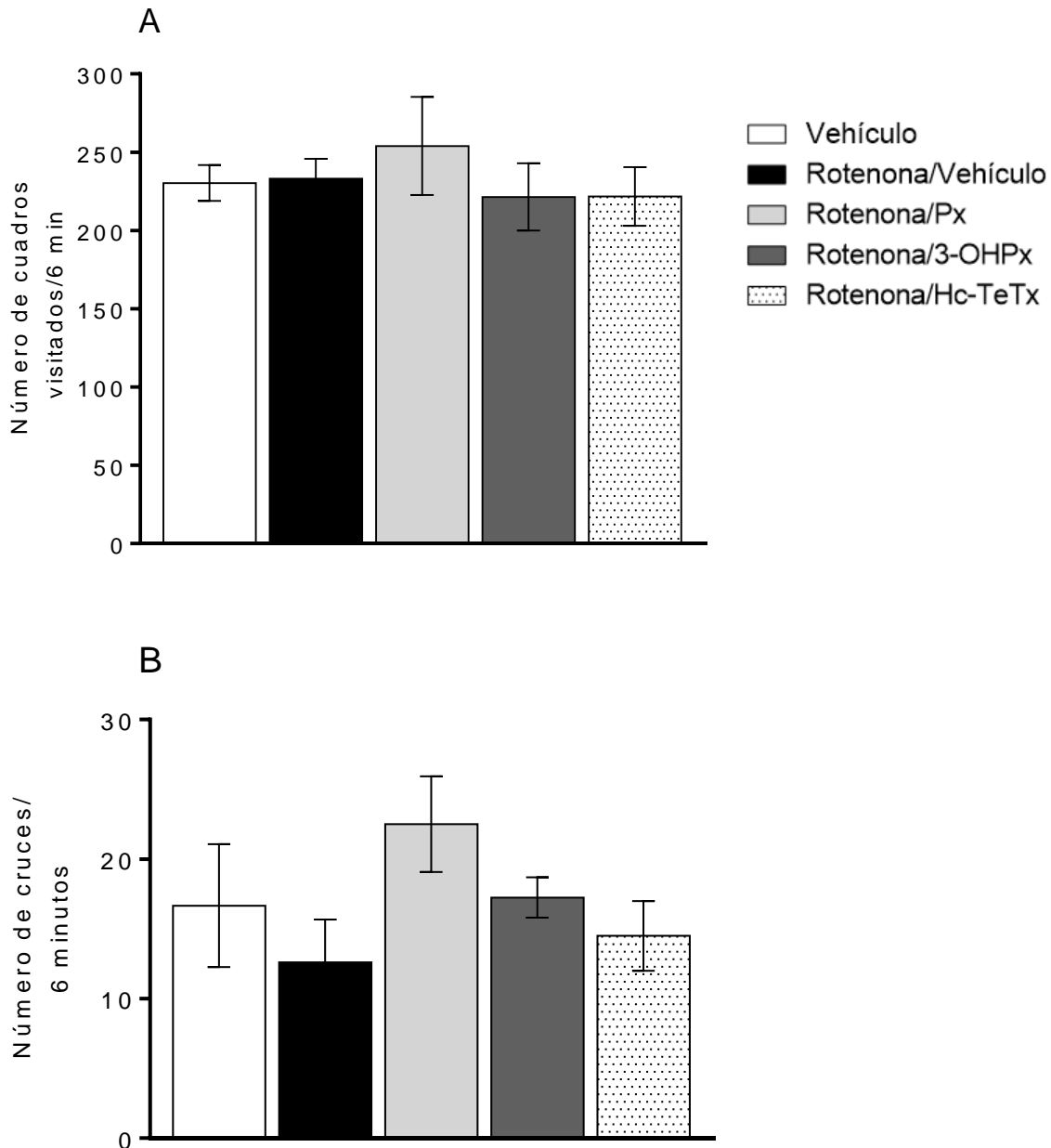


Figura 19. Conducta motora de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 1mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 7 días. Además, los animales tuvieron un tratamiento con vehículo (salina), paroxetina (Px), el análogo 3-OHPx, y el Hc-TeTx. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta motora en campo abierto. El gráfico A representa el promedio de cuadros visitados y el gráfico B el número de cruces \pm ESM. En ambas mediciones no se modificó la conducta motora de los animales tratados con rotenona respecto a los que recibieron el vehículo. Asimismo, los tratamientos no modificaron la conducta motora. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba de múltiples comparaciones de Tukey $P < 0.05$.

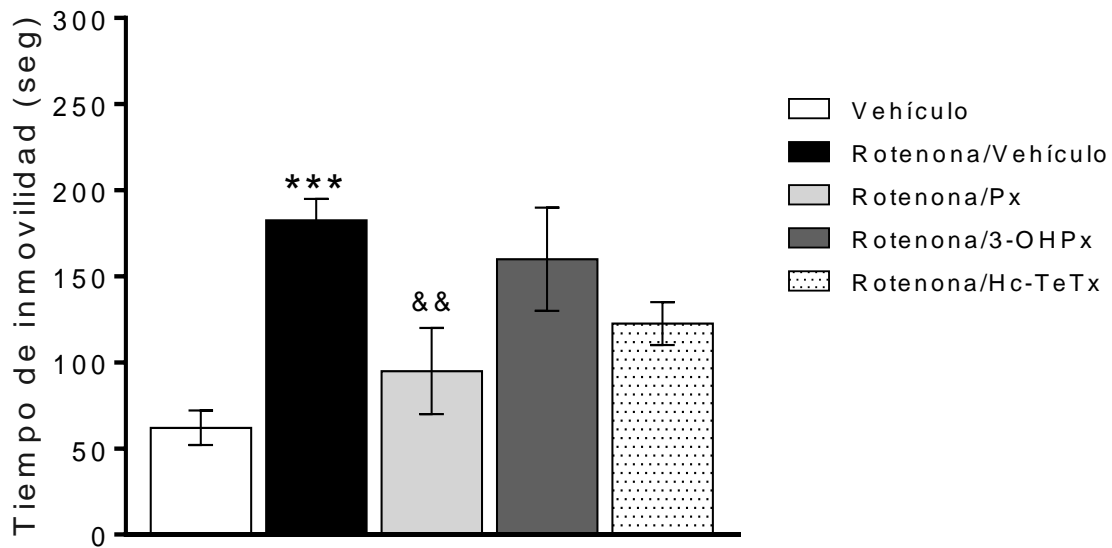


Figura 20. Inmovilidad en nado forzado de ratonas tratadas con rotenona. Los animales recibieron 1 mg/kg intraperitoneal de rotenona o el vehículo (DMSO/PEG 1:1) durante 7 días. Además, los animales tuvieron un tratamiento con vehículo (salina), paroxetina (Px), el análogo 3-OHPx, y el Hc-TeTx. Finalizado el tratamiento se evaluó la conducta depresiva en nado forzado. El gráfico representa el promedio de tiempo de inmovilidad \pm ESM. Los resultados indican que la rotenona incrementó el tiempo de inmovilidad respecto al grupo control $***P < 0.001$, en contraste el grupo con rotenona y paroxetina presentó una menor inmovilidad respecto al grupo rotenona $\&\&P < 0.01$. En el resto de los grupos tratados no se observaron cambios respecto al grupo rotenona. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba de múltiples comparaciones de Tukey $P < 0.05$.

VIII Discusión

Con la finalidad de establecer el modelo depresivo con la administración de rotenona se evaluaron diferentes conductas como la anhedonia, la conducta motora y la desesperanza por dos modelos, el nado forzado y la suspensión de la cola.

El desinterés por los estímulos placenteros se ha observado en animales que se exponen a diferentes agentes estresores de tal manera que en los modelos experimentales se asocia dicho patrón a la anhedonia. Son diferentes los núcleos y regiones cerebrales involucradas en la conducta de anhedonia, entre ellos el núcleo *accumbens*, el área ventral tegmental, la amígdala, el hipocampo, la habénula lateral, el estriado ventral y la corteza prefrontal, entre otros (Der-Avakiand y Markou, 2012). Se sabe que los animales con cuadros depresivos tienen una menor preferencia por el agua azucarada y esta conducta permite evaluar dicho cuadro. Para inducir el efecto depresivo se empleó rotenona en el ratón por 7 o 21 días, obtuvimos que con 0.5 mg/kg por 21 días no causó anhedonia, con 1 mg/kg i.p. por 7 días tampoco modificó la preferencia a sacarosa respecto a los animales que recibieron el vehículo. La rotenona produce neurotoxicidad a los ratones como se ha evaluado por diferentes marcadores bioquímicos (la tirosina hidroxilasa, incremento de la alfa-sinucleína, o incremento del estrés oxidativo), de acuerdo con lo observado no todos los estímulos estresantes pueden generar modificaciones sobre la anhedonia, incluso se encontró diferencia entre la cepa empleada. Es posible que para generar dicho cuadro se requieran administraciones a más largo plazo y/o empleando dosis mayores, lo cual representa una desventaja experimental ya que a mayor dosis se incrementa la mortalidad por rotenona durante los experimentos como diversos trabajos han reportado.

Por otro lado, algunos reportes sugieren que el tratamiento crónico de ISRS incrementan la actividad estriatal (El Yacoubi, et al. 2011) y la preferencia a sacarosa en ratones (Ossewaarde, et al. 2011). Sin embargo, los resultados indican que no existen modificaciones importantes en la preferencia a sacarosa que pudieran discriminar los efectos de los fármacos antidepresivos frente los efectos de la rotenona, ya que no había cambios significativos entre los diferentes grupos experimentales, aun así, se observa un incremento tendencial en la preferencia por la sacarosa en las ratonas administradas con los fármacos a una dosis de 1mg/kg por 7 días Figura 18.

Por otra parte, los resultados sobre la conducta motora evaluada en los animales con la administración de 0.5 mg/kg de rotenona por 21 días indican que existe una ligera reducción de la

actividad motora; sin embargo, esta conducta no siempre se replicó en los diferentes experimentos realizados empleando la misma dosis o una dosis mayor de rotenona (1 mg/kg i.p.) por 7 días. También se observó que los animales mantienen las conductas de acicalamiento, alimentación independiente, movilidad y exploración. Todo ello indica que aún a pesar de que la rotenona se administró por varios días no se generó un cuadro relacionado con alta toxicidad, con las dosis de 0.5 y 1mg/kg por 21 y 7 días, respectivamente. Es importante mencionar que la DL50 de rotenona en el ratón es de 2.8mg/kg (Gupta, 2012) y la existencia de reportes donde diferentes marcadores bioquímicos se incrementan por la rotenona como las especies reactivas de oxígeno o la menor actividad antioxidante, en el estrés oxidativo y la inhibición mitocondrial desde 0.5 mg/kg en ratón (Rao et al., 2019). En otros estudios realizados en ratones existe variabilidad en dichos resultados, ya que se ha descrito que los efectos de la rotenona son diferentes de acuerdo con la dosis y a la vía de administración (Murakami 2015). Son bastantes los estudios que asocian la toxicidad de la rotenona con el daño del sistema dopaminérgico de la vía nigroestriatal; el núcleo estriado y la sustancia *nigra pars compacta* son núcleos altamente vulnerables (Betarbet et al. 2000; Cannon y Greenamyre 2014), a pesar de ello no son los únicos núcleos afectados. Otro factor importante que permite explicar la falta de anhedonia en el grupo rotenona es que la falta de dopamina no es determinante en la respuesta hacia la preferencia a sacarosa como ha descrito en sus experimentos Cannon, y Palmiter, 2003. Así que, si existiera una disminución de la tirosina hidroxilasa posterior a la administración de rotenona y bajos niveles de dopamina, esos cambios no serían suficientes para generar anhedonia.

Por otra parte, la evaluación de los diferentes tratamientos antidepresivos mostró que solo el fragmento Hc-TeTx, un agente que se propone incrementa los niveles de 5-HT, disminuyó la conducta motora de los animales. Este agente ha sido probado en diferentes modelos de toxicidad como son el MPP⁺, la 6-OHDA, la metanfetamina, y en todos ellos muestra tener propiedades antioxidantes y/o neuroprotectoras (Moreno-Galarza, 2018; Mendieta et al., 2012; Patricio et al., 2019; Mendieta et al., 2016). Por supuesto, que también es posible que por su actividad de inhibir el transportador de 5-HT (Aguilera et al., 1990), pueda generar un efecto de menor actividad motora. En contraste ninguno de los tratamientos evaluados causó modificaciones sobre la conducta motora. En resumen, observamos que la rotenona no afecta de forma importante las funciones motoras con el régimen empleado, lo cual resultaba positivo para poder evaluar la conducta depresiva de los animales en la prueba de nado forzado.

Por otro lado, se determinó del efecto depresivo en el modelo de NF, evaluando la inmovilidad ante la desesperanza inducida por estar durante varios minutos en una situación de estrés como es el nado forzado o la suspensión de la cola. En primer lugar, se propuso determinar que prueba era la más sensible y efectiva para evaluar a los animales, por ello se realizó un primer experimento donde posterior al tratamiento con rotenona los animales se evaluaron en la prueba de nado forzado o en la prueba de suspensión de la cola (Figura 11 y 12). Los resultados encontrados sugerían que la prueba de nado forzado era la más contundente para determinar la inmovilidad de los animales; no obstante, aunque la prueba de suspensión de la cola se emplea para el mismo propósito los animales en ocasiones se quedaban inmóviles sujetándose de su propia cola y este hecho complicaba la evaluación específica, esto aunado a que no se encontró diferencia entre el grupo vehículo y el grupo con rotenona. En el otro experimento de la evaluación de la conducta depresiva en NF si se observó un mayor tiempo de inmovilidad de los animales tratados con rotenona y encontramos una diferencia significativa al compararlo con el grupo vehículo (Figura 15). Esto permitió seleccionar la prueba de nado forzado para la realización de los siguientes experimentos. Los resultados nuevamente confirmaron que el tratamiento con 0.5 mg/kg de rotenona causa depresión, y que esta podría ser modificada con los diferentes tratamientos con antidepresivos ya sea con Px o las nuevas propuestas con el análogo 3-OHPx o el fragmento Hc-TeTx, ambos con un alto potencial de mejorar los niveles de 5-HT y generar un efecto farmacológico similar a la paroxetina. En cuanto al efecto antidepresivo de los tratamientos se encontró que 0.5 mg/kg de Px o 3-OHPx (Figura 15) no disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de NF aunque si se observa una recuperación tendencial y que la administración de 60 µg/Kg del fragmento Hc-TeTx no causó modificaciones en la respuesta de los animales cuando eran comparados con el grupo rotenona. Estos resultados sugieren que es necesario realizar otras evaluaciones a dosis diferentes del agente antidepresivo Px y su análogo 3-OHPx, dado que la Px es el control positivo de la acción de un ISRS, y este tampoco causó cambios durante la prueba.

En el último experimento realizado para evaluar la conducta depresiva se llevó a cabo con la administración de 1mg/kg de Px o 3-OHPx, así como una sola aplicación del fragmento Hc-TeTx, es necesario comentar que el dicho péptido no presenta la clásica curva dosis respuesta de mayor dosis-mayor respuesta, puesto que puede presentar efectos a dosis muy bajas como previamente se ha probado (Mendieta et al., 2012; Mendieta et al., 2016) y que sus efectos antidepresivos pueden ser duraderos aún con una sola inyección intramuscular de 60 µg/kg en el roedor (Getachew et al.,

2019). Los resultados encontrados no apuntaron a una mejoría por el 3-OHPx o el fragmento Hc-TeTx frente al efecto depresivo que induce la rotenona. En contraste la Px sí disminuyó significativamente la respuesta de inmovilidad durante la prueba (Figura 20). Esto también se asocia a que, aunque sin cambios significativos, la Px a una dosis de 1 mg/kg tiende a incrementar la preferencia a sacarosa. Estos resultados permiten sugerir que es necesario realizar una evaluación a mayor detalle sobre el rango de dosis que pudieran resultar efectivas sobre la conducta depresiva, además de considerar otras evaluaciones a mayor tiempo de administración de la rotenona.

IX Conclusiones

1. La administración intraperitoneal de rotenona a 0.5 y 1 mg/kg a ratonas produce la conducta depresiva en el modelo de nado forzado, sin cambios en la preferencia a sacarosa, la conducta motora y la inmovilidad en el modelo de suspensión de la cola.
2. La administración de la Px, el 3-OHPx y el fragmento Hc-TeTx no induce efectos antidepresivos en el modelo de toxicidad con rotenona posterior a 21 días.
3. La administración de la Px reduce la conducta depresiva inducida por rotenona, sin embargo no se produce el mismo efecto con la administración de su análogo el 3-OHPx o con el fragmento Hc-TeTx posterior a 7 días.

X Referencias

- Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F (2002) Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 39:154-180.
- Aguilera J, Lopez LA, Yavin E (1990) Tetanus toxin-induced protein kinase C activation and elevated serotonin levels in the perinatal rat brain. In: *FEBS Lett*, pp 61-65.
- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14:281-299.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. *Trends Neurosci* 19:378-383.
- B-Rao C, Subramanian J, Sharma SD (2009) Managing protein flexibility in docking and its applications. *Drug Discov Today* 14:394-400.
- Bagot RC, Labonté B, Peña CJ, Nestler EJ (2014) Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 16:281-295.
- Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS (2007) Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry* 62:496-504.
- Bang SJ, Jensen P, Dymecki SM, Commons KG (2012) Projections and interconnections of genetically defined serotonin neurons in mice. *Eur J Neurosci* 35:85-96.
- Barnes JM, Costall B, Coughlan J, Domeney AM, Gerrard PA, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES, Tomkins DM, Tyers MB (1990) The effects of ondansetron, a 5-HT3 receptor antagonist, on cognition in rodents and primates. *Pharmacol Biochem Behav* 35:955-962.
- Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ (2004) Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Exp Neurol* 186:235-241.
- Bel N, Artigas F (1993) Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* 15:243-245.
- Billard T, Le Bars D, Zimmer L (2014) PET radiotracers for molecular imaging of serotonin 5-HT1A receptors. *Curr Med Chem* 21:70-81.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297-305.
- Brunger AT, Rummel A (2009) Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins. *Toxicon* 54:550-560.
- Caccia S, Garattini S (1990) Formation of active metabolites of psychotropic drugs. An updated review of their significance. *Clin Pharmacokinet* 18:434-459.
- Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA (2004) Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo* 18:245-267.
- Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R (2012) Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci* 13:6883-6901.
- Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD (2012a) The tail suspension test. *J Vis Exp*:e3769.
- Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD (2012b) The mouse forced swim test. *J Vis Exp*:e3638.
- Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 34:279-290.
- Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011) Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8.10A*.
- Cherian L, Goodman JC, Robertson CS (2000) Brain nitric oxide changes after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurophysiol* 83:2171-2178.

- Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS (2001) A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev* 25:235-260.
- Claustre Y, Benavides J, Scatton B (1991) Potential mechanisms involved in the negative coupling between serotonin 5-HT_{1A} receptors and carbachol-stimulated phosphoinositide turnover in the rat hippocampus. *J Neurochem* 56:1276-1285.
- Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA (2002) cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci* 22:3262-3268.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62:479-493.
- Davidson RJ, Abercrombie H, Nitschke JB, Putnam K (1999) Regional brain function, emotion and disorders of emotion. *Curr Opin Neurobiol* 9:228-234.
- Davis M, Whalen PJ (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6:13-34.
- Davis RL, Syapin PJ (2004) Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells. *Neurosci Lett* 371:128-132.
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S (1988) Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73:101-120.
- de Montigny C, Blier P (1984) Effects of antidepressant treatments on 5-HT neurotransmission: electrophysiological and clinical studies. *Adv Biochem Psychopharmacol* 39:223-239.
- Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 159:852-859.
- DeVane CL (1992) Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. *J Clin Psychiatry* 53 Suppl:13-20.
- Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N (2005) Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience* 133:117-135.
- Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35:47-56.
- Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem* 275:8889-8894.
- Escartin C, Bonvento G (2008) Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol* 38:231-241.
- Fava M, Kendler KS (2000) Major depressive disorder. *Neuron* 28:335-341.
- Feighner JP (1999) Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl 4:4-11; discussion 12-13.
- Fotinou C, Emsley P, Black I, Ando H, Ishida H, Kiso M, Sinha KA, Fairweather NF, Isaacs NW (2001) The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J Biol Chem* 276:32274-32281.
- Fujioka T, Fujioka A, Duman RS (2004) Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J Neurosci* 24:319-328.
- Gil C, Chaib-Oukadour I, Aguilera J (2003) C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signalling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochem J* 373:613-620.

- Gil C, Ruiz-Meana M, Alava M, Yavin E, Aguilera J (1998) Tetanus toxin enhances protein kinase C activity translocation and increases polyphosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex preparations. *J Neurochem* 70:1636-1643.
- Gill DM (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* 46:86-94.
- Glassman AH, Shapiro PA (1998) Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry* 155:4-11.
- Gorman JM, Docherty JP (2010) A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 22:256-264.
- Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3-28.
- Gupta D, Radhakrishnan M, Kurhe Y (2014) Ondansetron, a 5HT₃ receptor antagonist reverses depression and anxiety-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice: possible implication of serotonergic system. *Eur J Pharmacol* 744:59-66.
- Gööz M, Gööz P, Luttrell LM, Raymond JR (2006) 5-HT_{2A} receptor induces ERK phosphorylation and proliferation through ADAM-17 tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE) activation and heparin-bound epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) shedding in mesangial cells. *J Biol Chem* 281:21004-21012.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
- Herreros J, Ng T, Schiavo G (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* 12:2947-2960.
- Hertz L, Rothman DL, Li B, Peng L (2015) Chronic SSRI stimulation of astrocytic 5-HT_{2B} receptors change multiple gene expressions/editings and metabolism of glutamate, glucose and glycogen: a potential paradigm shift. *Front Behav Neurosci* 9:25.
- Hetman M, Xia Z (2000) Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60:531-545.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.
- Hu C, Luo Y, Wang H, Kuang S, Liang G, Yang Y, Mai S, Yang J (2017) Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLoS One* 12:e0185129.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:61-69.
- Khadrawy YA, Salem AM, El-Shamy KA, Ahmed EK, Fadl NN, Hosny EN (2017) Neuroprotective and Therapeutic Effect of Caffeine on the Rat Model of Parkinson's Disease Induced by Rotenone. *J Diet Suppl* 14:553-572.
- Kharkar PS, Reith ME, Dutta AK (2008) Three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D QSAR) and pharmacophore elucidation of tetrahydropyran derivatives as serotonin and norepinephrine transporter inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* 22:1-17.
- Krishnan V, Nestler EJ (2011) Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci* 7:121-147.
- Kubera M, Curzytek K, Duda W, Leskiewicz M, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Roman A, Zajicova A, Holan V, Szczesny E, Lason W, Maes M (2013) A new animal model of (chronic) depression induced by

- repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. *Brain Behav Immun* 31:96-104.
- Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL, Nichols DE (2003) Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A2 signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther* 304:229-237.
- Lacy DB, Stevens RC (1999) Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 291:1091-1104.
- Lalli G, Schiavo G (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol* 156:233-239.
- LeDoux SP, Druzhyna NM, Hollensworth SB, Harrison JF, Wilson GL (2007) Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults. *Neuroscience* 145:1249-1259.
- Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, Lambros M, Gout PW, Kalivas PW, Massie A, Smolders I, Methner A, Pergande M, Smith SB, Ganapathy V, Maher P (2013) The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 18:522-555.
- Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* 17:182-190.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmér E, Kokaia M (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 17:490-496.
- Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG (2018) Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc* 13:1686-1698.
- Lucassen PJ, Müller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER, Swaab DF (2001) Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *Am J Pathol* 158:453-468.
- Martinowich K, Lu B (2008) Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33:73-83.
- McDowell K, Chesselet MF (2012) Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 46:597-606.
- Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu MV, Kerdine-Römer S, Gardier AM, Hen R (2014) Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology* 39:1366-1378.
- Millan MJ (2005) Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Therapie* 60:441-460.
- Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB (1998) The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 55:580-592.
- Nemeroff CB, DeVane CL, Pollock BG (1996) Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry* 153:311-320.
- Nesse RM (2000) Is depression an adaptation? *Arch Gen Psychiatry* 57:14-20.
- Nestler EJ, Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13:1161-1169.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-7547.
- Norazit A, Meedeniya AC, Nguyen MN, Mackay-Sim A (2010) Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res* 1360:119-129.

- Ogawa N, Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K (2005) L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection. Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurol* 252 Suppl 4:IV23-IV31.
- Ongür D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10:206-219.
- Orús L, Pérez-Silanes S, Oficialdegui AM, Martínez-Esparza J, Del Castillo JC, Mourelle M, Langer T, Guccione S, Donzella G, Krovat EM, Poptodorov K, Lasheras B, Ballaz S, Hervías I, Tordera R, Del Río J, Monge A (2002) Synthesis and molecular modeling of new 1-aryl-3-[4-arylpiperazin-1-yl]-1-propane derivatives with high affinity at the serotonin transporter and at 5-HT(1A) receptors. *J Med Chem* 45:4128-4139.
- Padilla E, Shumake J, Barrett DW, Holmes G, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F (2010) Novelty-evoked activity in open field predicts susceptibility to helpless behavior. *Physiol Behav* 101:746-754.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G (1998) Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update. *Drug News Perspect* 11:523-569.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-280.
- Pistollato F, Canovas-Jorda D, Zagoura D, Bal-Price A (2017) Nrf2 pathway activation upon rotenone treatment in human iPSC-derived neural stem cells undergoing differentiation towards neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 108:457-471.
- Piñeyro G, Blier P (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51:533-591.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977a) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977b) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Price JL, Carmichael ST, Drevets WC (1996) Networks related to the orbital and medial prefrontal cortex; a substrate for emotional behavior? *Prog Brain Res* 107:523-536.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92:179-212.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2010) 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65:40-52.
- Robb SJ, Connor JR (2002) Nitric oxide protects astrocytes from oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 962:93-102.
- Rudorfer MV, Potter WZ (1997) The Role of Metabolites of Antidepressants in the Treatment of Depression. *CNS Drugs* 7:273-312.
- Saheki Y, De Camilli P (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005645.
- Savitz J, Drevets WC (2009) Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. *Neurosci Biobehav Rev* 33:699-771.
- Scheggi S, Marchese G, Borsini F, Bordi F, De Montis MG (2011) Effects of the 5-HT(6) receptor agonist ST 1936 on depression- and anhedonia-like experimental models. *Behav Brain Res* 224:35-43.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.
- Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*:e52434.

- Skaper SD (2008) The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:46-62.
- Sloman L (2008) A new comprehensive evolutionary model of depression and anxiety. *J Affect Disord* 106:219-228.
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1:3-9.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85:367-370.
- Strekalova T, Couch Y, Kholod N, Boyks M, Malin D, Leprince P, Steinbusch HM (2011) Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behav Brain Funct* 7:9.
- Tiwari M, Lopez-Cruzan M, Morgan WW, Herman B (2011) Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons. *J Biol Chem* 286:8493-8506.
- Turner JH, Raymond JR (2005) Interaction of calmodulin with the serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem* 280:30741-30750.
- Uno H, Tarara R, Else JG, Suleman MA, Sapolsky RM (1989) Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci* 9:1705-1711.
- Vidal R, Castro E, Pilar-Cuéllar F, Pascual-Brazo J, Díaz A, Rojo ML, Linge R, Martín A, Valdizán EM, Pazos A (2014) Serotonin 5-HT₄ receptors: A new strategy for developing fast acting antidepressants? *Curr Pharm Des* 20:3751-3762.
- Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83:482-504.
- Watson PJ, Andrews PW (2002) Toward a revised evolutionary adaptationist analysis of depression: the social navigation hypothesis. *J Affect Disord* 72:1-14.
- Wesołowska A (2010) Potential role of the 5-HT₆ receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. *Pharmacol Rep* 62:564-577.
- Willins DL, Deutch AY, Roth BL (1997) Serotonin 5-HT_{2A} receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27:79-82.
- Wise RA (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51:13-22.
- Wu YN, Johnson SW (2009) Rotenone reduces Mg²⁺-dependent block of NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. *Neurotoxicology* 30:320-325.
- Wu YP, Gao HY, Ouyang SH, Kurihara H, He RR, Li YF (2019) Predator stress-induced depression is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis in adult male mice. *Neural Regen Res* 14:298-305.
- Xiong N, Huang J, Zhang Z, Xiong J, Liu X, Jia M, Wang F, Chen C, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z, Wang T (2009) Stereotaxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for Parkinson's disease. *PLoS One* 4:e7878.
- Zhang Y, Wang Y, Lei H, Wang L, Xue L, Wang X, Zhu X (2017) Optimized animal model to mimic the reality of stress-induced depression in the clinic. *BMC Psychiatry* 17:171.