



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-
Instituto de Ciencias

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ÁREA:

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

EFFECTO DE AGOMELATINA SOBRE EL RECEPTOR 5-HT_{2c} DE CPF EN UN MODELO DE DEPRESIÓN MAYOR EN RATA

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE: Maestría en Ciencias
Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA AGUILAR ALONSO

PRESENTA: QFB. EVOLI NOEMI LÓPEZ MORÁN

DICIEMBRE 2016.

AGRADECIMIENTOS



El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, del área de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, con el apoyo de beca otorgada por CONACYT con No. 627640 y la VIEP No. 1185.



VIEP
Vicerrectoría de Investigación
y Estudios de Posgrado



ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
DEPRESIÓN	11
Trastorno de Depresión Mayor.....	11
Neurotransmisores involucrados en la depresión	12
Receptores involucrados en TDM	14
Receptores serotoninérgicos	14
Receptores dopaminérgicos.....	15
Áreas del cerebro involucradas en depresión	16
Corteza prefrontal.....	16
Comunicación neuronal entre las diferentes áreas del cerebro.....	18
Antidepresivos	18
Fluoxetina.....	19
Agomelatina	20
Modelo de Depresión Mayor.....	22
Bulbectomía olfatoria.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS.....	25
Objetivo general:	25
Objetivos particulares:	25
ESQUEMA DE TRABAJO	26
METODOLOGÍA DE TRABAJO	27
Cirugía bulbectomía bilateral en rata (OBX)	27
Pruebas conductuales.....	27
Discriminación olfatoria.....	27

Conducta motora	28
Luz/oscuridad	28
Desesperanza	28
Pruebas físicas	28
Administración de fármacos.....	28
Agomelatina:.....	28
Fluoxetina:.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Modelo de depresión frente a la administración de antidepresivos en los diferentes periodos.	33
Pruebas Físicas.	34
Pruebas conductuales	35
Tinción de Hematoxilina y Eosina	41
Inmunohistoquímica de Dopamina.....	43
Determinación de serotonina mediante la técnica de ELISA	46
CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	57
Materiales y Reactivos.....	57
Clasificación de Depresión de la American Psychiatric Association,.....	58
Técnica Inclusión en Parafina (CPF de rata)	60
Tinción de Hematoxilina-eosina.....	61
Inmunohistoquímicas	63
Dopamina	65
Detección de serotonina por el método de Elisa.....	66
Pruebas Conductuales.....	68
Discriminación olfatoria	68
Luz Oscuridad	68
Campo abierto.....	68
Nado Forzado	69

INTERACCIÓN DE SEROTONINA Y FÁRMACOS ANTAGONISTAS FRENTE AL RECEPTOR DE SEROTONINA (5- HIDROXITRIPTAMINA 2C) Y EL ANÁLISIS DE AGOMELATINA Y FLUOXETINA.	70
Estructura química de la serotonina y los fármacos antagonistas Agomelatina y Fluoxetina..	70
Análisis de la estructura del receptor transmembranal.....	71
Interacciones del receptor 5-HT2C con la serotonina.....	72
Interacciones del receptor 5-HT2C con fármacos antagonistas	74
Interacciones propuestas de los antagonistas Agomelatina y Fluoxetina frente al receptor 5-HT2C	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

GRÁFICA		PÁGINA
Gráfica 1.	Prueba de anosmia durante 5 min.	30
Gráfica 2.	Tiempo en segundos en que tarda la rata en pasar hacia el lado oscuro de la caja.	31
Gráfica 3.	Número de entradas de la parte iluminada al lado oscuro de la caja.	31
Gráfica 4.	Tiempo total en que la rata permanece en la parte oscura de la caja.	31
Gráfica 5.	Actividad horizontal en un periodo de 3 minutos en el modelo de campo abierto.	31
Gráfica 6.	Actividad vertical en un periodo de 3 minutos en el modelo de campo abierto.	31
Gráfica 7.	Acicalamientos en un periodo de 3 minutos en el modelo de campo abierto.	31
Gráfica 8.	Tiempo de reconocimiento del alimento 5 min.	31
Gráfica 9.	Tiempo para entrar a la zona oscura/4min, n=10/grupo.	32
Gráfica 10.	Tiempo total en zona oscura/4min, n=10 por grupo.	32
Gráfica 11.	Número de entradas de una zona a otra, n=10 por grupo.	32
Gráfica 12.	Tiempo inmovilidad inicial, n=10/grupo.	32
Gráfica 13.	Tiempo de inmovilidad, n=10/grupo.	32
Gráfica 14.	Tiempo que la rata araña la pared, n=10/grupo.	32
Gráfica 15.	Actividad horizontal.	33
Gráfica 16.	Actividad vertical n=10 por grupo.	33
Gráfica 17.	Acicalamientos: Número de veces que realiza su limpieza.	33
Gráfica 18.	Inmovilidad: Número de veces que deja de moverse.	33
Gráfica 19.	Efecto de la bulbectomía olfatoria sobre el peso.	34
Gráfica 20.	Temperatura tomada durante el tiempo de estudio.	34
Gráfica 21.	Tiempo de reconocimiento del alimento 5min.	35
Gráfica 22.	Tiempo que tarda el animal en pasar de un área iluminada a otra oscura. 4min.	36
Gráfica 23.	Tiempo total que permanece oscuridad. 4 min.	36
Gráfica 24.	Número de entradas y salidas 4min.	37
Gráfica 25.	Actividad horizontal, 5min.	38
Gráfica 26.	Actividad vertical, 5min.	38
Gráfica 27.	Limpieza en roedores, 5min.	39
Gráfica 28.	Número de estáticos > 3s, 5 min.	39
Gráfica 29.	Tiempo total en el cuadrante central, 5 min.	39

Gráfica 30.	Tiempo de la primera inmovilidad 10 min.	40
Gráfica 31.	Tiempo de nado total 10 min.	40
Gráfica 32.	Tiempo de inmovilidad total 10 min.	40
Gráfica 33.	Struggling 10 min.	40
Gráfica 34.	Número de células en CPF	43
Gráfica 35.	Concentración de serotonina (ng/ml)	46
Gráfica 36.	Concentración de serotonina (ng/ml) teoría de monoaminas	47

FIGURA		PÁGINA
Figura 1.	Clasificación del Desorden de Depresión Mayor según Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales IV.	10
Figura 2.	Estructura y mecanismo de acción de los receptores de serotonina 5-HT1A y 5-HT2C involucrados en el trastorno de depresión mayor.	13
Figura 3.	Interacción recíproca entre las neuronas serotoninérgicas, dopaminérgicas y noradrenérgicas en diferentes partes del cerebro.	17
Figura 4.	Comparación de la sinápsis neuronal en el Trastorno de depresión mayor.	19
Figura 5.	Mecanismo de acción de agomelatina como antagonista del receptor de serotonina 5-HT2c.	20
Figura 6.	Mecanismo de acción de agomelatina como agonista de los receptores melatoninérgicos.	20
Figura 7.	Cirugía exitosa	30
Figura 8.	Corte coronal de cerebro de rata.	40
Figura 9.	Tinción de Hematoxilina y Eosina.	41
Figura 10.	Inmunohistoquímica de Dopamina	43
Figura 11.	Inmunohistoquímica de DRD2	44

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CPF: Corteza prefrontal

DDM: Desorden de Depresión Mayor

DRD2: Receptor de Dopamina 2

FDA: Food and Drug Administration (Administración Estadounidense de alimentos y medicamentos)

FX: Fluoxetina

ISRS: Inhibidor Selectivo de la recaptura de Serotonina

MAO: Monoamino oxidasa

NTRK2: Receptor del factor neurotrófico de tirosin cinasa tipo 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

OBX: Bulbectomía Olfatoria

PBS: Phosphate buffered saline (Solución salina de buffer de fosfatos)

TDM: Trastorno de Depresión Mayor

5HT: 5-Hidroxitriptamina, Serotonina

5-HT2C: Receptor de Serotonina 2C

RESUMEN

El Trastorno de Depresión Mayor (TDM) es un desorden mental frecuente que se presenta en la población mundial sin importar edad, sexo, raza o clase social; datos de la OMS revelan que alrededor de 350 millones de personas padecen depresión, realmente es preocupante debido a que es un factor predisponente para cometer suicidio.

Existen agentes de riesgo que afectan la calidad de vida, entre ellas se encuentra el estrés psicológico que conduce a la depresión y al complicarse se desarrolla muy posiblemente un Desorden de Depresión Mayor (DDM), que se caracteriza por presentar uno o más episodios depresivos en el paciente [DSM-IV-TR, 2002]; la depresión mayor se presenta: tristeza, pérdida de interés o placer, anhedonia, sentimientos de culpa, poca autoestima, disturbios de sueño y apetito, poca energía, así como pobre concentración durante un período de 2 semanas según DSM-IV.

En los años 60's Copen determina la hipótesis de las monoaminas sobre el DDM en este trastorno afectivo las monoaminas presentan disminución en su concentración y por lo tanto se observan cambios negativos en diferentes áreas del cerebro sobre su actividad neuronal viéndose afectado principalmente el comportamiento afectivo, la memoria y el aprendizaje.

Existen diferentes fármacos usados como antidepresivos entre ellos destacan los ISRS (Inhibidores Selectivos de la recaptura de Serotonina) dentro de los que destaca fluoxetina el cual tiene como objetivo incrementar principalmente a la serotonina en el espacio intersináptico para mejorar su comunicación neuronal, su efecto no es inmediato ya que se necesita desde 3 semanas hasta 6-8 meses según el caso para ver su efecto positivo; sin embargo se ha descrito que personas que cursan con ésta enfermedad presentan efectos secundarios adversos además del síndrome de discontinuación, por lo que es importante buscar nuevos tratamientos.

Una de las nuevas vertientes es el uso de antidepresivos que tienen una función dual como el fármaco agomelatina que es antagonista de los receptores 5HT_{2C} que a su vez un agonista de los receptores melatonérgicos, en estudios se ha observado el aumento de dopamina y norepinefrina dentro de las primeras dos horas de administración del fármaco, pero los niveles de serotonina se mantienen [Bodiant et al., 2010]. Del fármaco existen pocos

estudios en referencia al modelo de depresión mayor, por lo que en este estudio se abordó el efecto de la administración de agomelatina en el modelo de depresión mayor realizado mediante bulbectomía olfatoria en ratas comparado con el antidepresivo utilizado con mayor frecuencia Fluoxetina (ISRS).

En éste trabajo observamos el efecto antidepresivo de los fármacos Agomelatina como antagonista del receptor 5-HT_{2c} y agonista de los receptores de melatonina y Fluoxetina sobre el modelo de depresión Mayor que se ve reflejado en la mejora del comportamiento en diferentes pruebas conductuales; además de observar un incremento parcial en la concentración de serotonina en Corteza prefrontal (CPF) después de 7 días de administración para fluoxetina y 21 días para agomelatina; en cuanto a la presencia de dopamina se observó una marcada presencia en el día 21 de administración en ambos fármacos, con esto se corrobora el efecto como antidepresivo tanto en fluoxetina como Agomelatina además de elucidar parte del mecanismo de acción de Agomelatina dónde se comprueba la hipótesis del trabajo observando un aumento de serotonina en CPF por un mecanismo indirecto debido al aumento del neurotransmisor de dopamina tras una administración prolongada del dicho fármaco ya que en estudios realizados por Bodiant en el 2010 no se observan cambios en los niveles de serotonina tras una administración inicial.

INTRODUCCIÓN

DEPRESIÓN

La depresión es un desorden mental el cuál se ve reflejado en su estado de ánimo triste o una falta de interés pronunciado en las actividades diarias o la capacidad de obtener placer de estas actividades (conocido científicamente como anhedonia). Los síntomas de la depresión se clasifican en varias categorías que se agrupan basándose en sus similitudes para su diagnóstico es necesario diferenciar el tipo de depresión en 3 diferentes tipos Desorden de Depresión Mayor (DDM), Trastorno Distímico el cual se sugiere que es de tipo genético y el Trastorno Depresivo no especificado representados en la figura 1 [DSM-IV-TR, 2002].

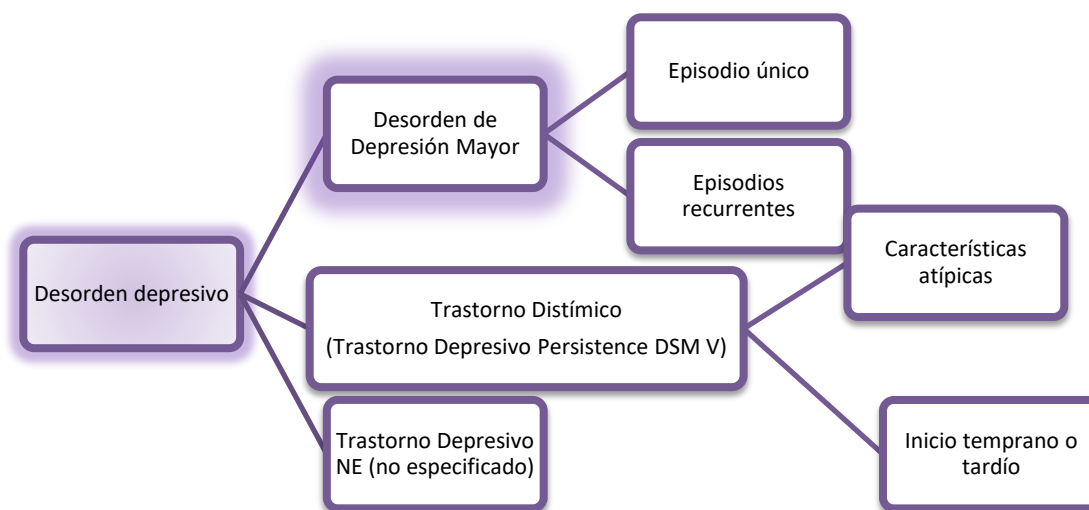


Figura 1. Clasificación del Desorden de Depresión Mayor según Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales IV.

Trastorno de Depresión Mayor

El Trastorno de Depresión Mayor (TDM) o Desorden de Depresión Mayor (DDM) es una enfermedad que afecta al organismo principalmente al cerebro, se ve reflejado en el estado de ánimo, en la manera de pensar y actuar, tanto que se ha documentado como causa común de suicidio [Hirschfeld and Robert, 2012]; además es un desorden mental frecuente ya que afecta a la población mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 350 millones de personas de todas las edades sin importar etnia ni clase social padecen depresión, la mayor incidencia se presenta en el sexo femenino [OMS, 2016].

El episodio depresivo mayor es un trastorno mental grave que conduce a un deterioro significativo del funcionamiento mental asociado a problemas de concentración, además se observa déficit en la memoria y aprendizaje [Castaneda et al., 2008]; para su diagnóstico clínico se deben presentar 5 o más síntomas que se califican en leves, moderados o severos, en un período de al menos dos semanas en las que el individuo presenta anhedonia (incapacidad para experimentar placer), disturbios de sueño y apetito, sentimientos de infravaloración, fatiga, ideas suicidas y sentimientos de culpa o inutilidad. El episodio depresivo mayor se agrava produciendo el TDM; la característica esencial de éste trastorno es un curso clínico caracterizado por uno o más episodios depresivos mayores y es necesario que curse con uno de los dos síntomas que son tristeza y pérdida de interés o placer [DSM-IV-TR, 2002].

Los desórdenes de ansiedad son alarmantes y frecuentemente se asocian con TDM o abuso de sustancias psicotrópicas [Pompili et al., 2013]. Uno de los factores de riesgo para desarrollar depresión es el estrés oxidativo el cuál al ser constante presenta daño y disfunción neuronal [Xu et al., 2016]. El trastorno de depresión mayor se acompaña con frecuencia de alteraciones conductuales, ritmos circadianos, temperatura, secreción de cortisol y liberación de otras hormonas [Germain and Kupfer, 2008]. Al haber daño neuronal se observa una conectividad deficiente debido a la baja liberación de neurotransmisores [Bremner et al., 2001].

Neurotransmisores involucrados en la depresión

La teoría de las monoaminas fué promulgada por Copen en 1965 en el cuál enfatiza en una disminución notable de la concentración de serotonina como la causa primordial del trastorno depresivo, sin embargo también se ven afectados los niveles de dopamina y noradrenalina; los cambios en el circuito serotoninérgico que regulan emociones en los individuos desencadenan en un DDM.

Existe evidencia sobre niveles anormales de neurotransmisores monoaminérgicos como serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), catecolaminas (dopamina y norepinefrina), que actúan en las neuronas del sistema nervioso central y son de gran importancia en la fisiopatología depresiva [Baldwin, 2002].

La dopamina es un neurotransmisor el cuál se sintetiza a partir del aminoácido L-Tirosina, se hidroxila para convertirse en L-Dopa mediante tirosina hidroxilasa (terabiopterina como cofactor), posteriormente se lleva a cabo una descarboxilación de L-Tirosina a partir de la enzima Dopa descarboxilasa la cuál es común en la síntesis de monoaminas [Grzanna and Molliver, 1980].

El neurotransmisor noradrenalina es una catecolamina y su síntesis se lleva a cabo a partir de dopamina mediante la enzima dopamina B-monooxigenasa teniendo como cofactores al oxígeno y ácido ascórbico [Musacchio, 2013].

La serotonina 5-HT (5-hidroxitriptamina) es una monoamina la cual se sintetiza en el Núcleo dorsal del rafé a partir del aminoácido L-Triptófano teniendo como primera reacción la hidroxilación del carbono 5 del anillo aromático por la acción de la enzima Triptófano hidroxilasa (1 presente en el sistema nervioso central SNC o 2 fuera del SNC) teniendo como cofactor a biopterina, ésta etapa es la limitante para la síntesis de serotonina, posteriormente sufre una descarboxilación mediada por la enzima Dopa Descarboxilasa teniendo a piridoxal-fosfato como cofactor [Walter, 2003].

La noradrenalina y la serotonina influyen fuertemente en patrones de conducta y función mental, mientras que la dopamina está involucrada en la parte motriz. Estas tres sustancias son fundamentales en el estudio de la depresión mayor, por lo que son objeto de análisis en las neurociencias [Millán et al., 2000].

La dopamina es conocida por estar involucrada en el sistema de recompensa del cerebro y una disminución en la actividad de liberación mesocortical y mesolímbica contribuye a un estado de ánimo deprimido [Willner et al., 2005].

La serotonina ejerce acción sobre el talante, conducta, movimiento, dolor, actividad sexual, apetito, secreciones endócrinas, funciones cardiacas y ciclo de sueño-vigilia. La serotonina cerebral en su mayoría se genera en los núcleos del rafé encordado entre la línea media del puente y el bulbo raquídeo [Blows, 2000; Robbins and Roberts, 2007].

En la hipótesis de las monoaminas la depresión se caracteriza por presentar niveles bajos de neurotransmisores principalmente la serotonina, en la hipótesis de las monoaminas se hace

hincapié sobre la restauración de la transmisión monoaminérgica que ocurre inmediatamente después de la administración de los antidepresivos [Castren, 2005]; esta administración puede variar de 3 semanas hasta 8 meses, bajando la dosis terapéutica hasta presentar mejora sin tratamiento.

Las proyecciones catecolaminérgicas pueden tener fácil daño axonal debido a la longitud de sus proyecciones, el alto costo de energía para llevar a cabo su comunicación ya que aumenta su estrés metabólico [Pissadaki and Bolam, 2013] y la pobre mielinización [Staal and Vickers, 2011] hacen más susceptible el mecanismo de daño.

Receptores involucrados en TDM

Receptores serotoninérgicos

Son receptores metabotrópicos (excepto el 5-HT₃) que poseen 7 dominios transmembranales, además se clasifican en 7 familias con un total de 16 subtipos agrupados de acuerdo a su mecanismo de señalización inicial [Bockaert y col., 2006]. Dentro de los que comprenden los receptores 5-HT₁ (A, B, D, E y F) acoplado a proteínas G inhibidoras (Gi/o) teniendo efecto negativo sobre adenilato ciclasa /proteína cinasa A (PKA). 5-HT₂ (A, B y C) están acoplados a la proteína Gq que estimula a fosfolipasa C (PKC) la cual aumenta Ca²⁺ intracelular vinculado con la liberación de neurotransmisores. 5-HT₃ (A, B y C) son receptores ligados a canales iónicos. 5-HT₄, 6 y 7 se acoplan a proteínas G estimulante (Gs) actúan sobre adenilato ciclasa /proteína cinasa A (PKA). La familia de 5-HT₅ (A y B) está menos esclarecida pero podría estar ligada a proteínas Gi [Raymond et al., 2001].

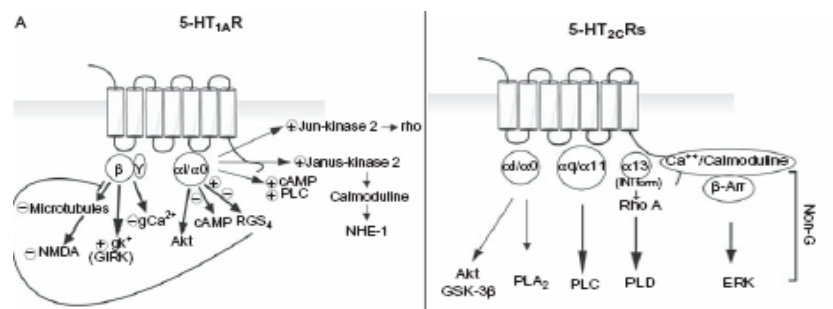


Figura 2. Estructura y mecanismo de acción de los receptores de serotonina 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} involucrados en el trastorno de depresión mayor. Tomado de Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin.

La familia de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} han sido ampliamente involucrados en el trastorno de depresión mayor, así como el episodio de depresión mayor y está ligada con trastornos de ansiedad y desórdenes depresivos [Albert, 2012]. La familia de los receptores 5-HT₂ ha sido ampliamente estudiada en corteza prefrontal ya que está ligada a trastornos depresivos y de ansiedad [Benekareddy et al., 2010].

Los receptores 5HT_{2C} se han encontrado en: hipocampo, amígdala, bulbo olfatorio anterior, núcleo endopiriforme, corteza piriforme, núcleo talámico y sustancia nigra. Aunque preferentemente se encuentra localizado en interneuronas GABAérgicas, los receptores 5HT_{2C} también pueden encontrarse en neuronas dopaminérgicas en la parte mesolímbica del cerebro. Interesantemente los agonistas y antagonistas del receptor 5HT_{2C} han demostrado efectos antidepresivos [Carr, 2011]. Esta información aparentemente contradictoria proporciona un efecto dual por el hecho de bloquear las acciones del receptor 5HT_{2C} en células GABAérgicas dando como resultado final el incremento de dopamina y norepinefrina en las regiones terminales Corteza Prefrontal [Millan, 2003; Morrissette and Stahl, 2014].

Receptores dopaminérgicos

Se ha observado que la dopamina participa en desordenes emocionales e involucra a los sistemas mesolímbico y mesocortical, originados en el área ventral tegmental, se proyectan hacia la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el septum y el núcleo acumbens éstas estructuras participan en funciones cognitivas, de motivación y adicción. Para llevar a cabo la comunicación neuronal, la dopamina interactúa con 5 subtipos de receptores presentes en las neuronas como heteroreceptor o autoreceptor comprendiendo dos familias de receptores metabotrópicos D1 y D2 los cuales poseen 7 dominios transmembranales acoplados a proteína G desencadenando la cascada de señalización D1 y D5 que activan a la proteína G_s para llevar a cabo la transducción de señales activando Adenilato ciclasa; por otro lado D2, D3 y D4 son receptores acoplados a la proteína G_i la cual inactiva a la adenilato ciclasa, disminuyendo indirectamente la cantidad de AMPc intracelular. Estudios han reportado que las neuronas que presentan autoreceptores D2/3 inhiben la liberación de dopamina debido a un exceso en la cantidad presente en el espacio intersináptico [Mansarini et al., 2010].

Se han observado dos isoformas distintas debido al splicing alternativo que sufre el gen de dopamina D2S y D2L (corto/autoreceptor y largo/heteroreceptor) [Uziel et al., 2000].

En particular el receptor D2 está íntimamente ligado a los comportamientos de recompensa y motivación [Simpson et al., 2012] se ha reportado un incremento del RNAm de éste receptor en sus dos isoformas sobre el análisis post mortem en CPF de pacientes con esquizofrenia; sin embargo en pacientes con el trastorno de depresión mayor se encontró la disminución en la expresión del receptor DRD2S [Kaalud et al., 2014].

En las neuronas gabaérgicas se encuentra el autoreceptor D2 que participa en funciones motoras de CPF, en algunos aspectos de la emoción, integración y expresión de las conductas de motivación, además regula la síntesis y la liberación de dopamina [Ungles, 2004].

Áreas del cerebro involucradas en depresión

Estudios de neuroimagen han demostrado disminución en áreas del cerebro como corteza prefrontal e hipocampo [Bremner et al., 2002; MacQueen et al., 2003]; los cambios morfológicos en hipocampo están relacionados con la deficiencia funcional y daño en la memoria en pacientes que sufren el TDM [MacQueen et al., 2003].

Corteza prefrontal.

Diferentes estudios realizados han encontrado alteraciones en la función y metabolismo de las neuronas en CPF de pacientes que presentan desórdenes psiquiátricos severos como esquizofrenia y TDM, otros más han encontrado una disminución en el volumen de la CPF e hipocampo en pacientes con depresión [Bremner et al., 2002].

Se sabe que la CPF juega un papel importante en el trastorno de depresión y el comportamiento suicida a través de la regulación en la memoria, conocimiento, reconocimiento de emociones y estados de ánimo como ansiedad. Está área recibe una densa inervación serotoninérgica del núcleo dorsal del rafe las cuales tienen su efecto sobre receptores 5HT_{1A}, 5HT_{2A} y 5HT_{2C}, presentes principalmente en neuronas GABAérgicas. Regiones corticales como CPF llevan conexiones dopaminérgicas al *Locus coeruleus* [El Mansari et al., 2010].

La parte más rostral del lóbulo frontal con fronteras anatómicas imprecisas en las diversas especies de mamíferos es la CPF, sin embargo todas se conectan con el núcleo medio dorsal del tálamo [Puig et al., 2004]. Estudios neuroanatómicos distinguen en la CPF de la rata tres regiones principales: lateral, orbital y medial (CPFm); esta última se subdivide, a su vez, en tres zonas (de dorsal a ventral): cingulada anterior (Cg1), prelímbica (PL) e infralímbica (IL). Aunque no está clara la función de estas subdivisiones en la rata, estudios recientes infieren del patrón de proyecciones de la zona PL e IL que la primera participaría más en las funciones limbicocognitivas –homólogas a la CPF dorsolateral de primates–, y la segunda controlaría actividades viscerales-autónomas –homólogas a la CPF orbitomedial de primates [Vertes, 2004].

La CPF es un área del cerebro de interés particular ya que aquí se llevan a cabo la toma de decisiones, atención, impulsividad, agresión y la función ejecutiva, además se ha documentado que la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica modulando críticas funciones en corteza prefrontal [Robbins and Roberts, 2007].

Estudios realizados mediante resonancia magnética nuclear en pacientes TDM encuentran disminución en actividad del lado derecho del globo pálido y la parte anterior tálamo y un incremento en la actividad en la parte derecha ventrolateral CPF y el lado izquierdo dorsomedial CPF frente expresiones de miedo, sin embargo frente a los estímulos de alegría la amígdala, el área ventromedial CPF y el lado derecho del hipocampo permanecen inactivos comparados con el control; por otro lado los pacientes deprimidos muestran un incremento de respuesta neuronal en la parte izquierda del hipocampo frente al estímulo de tristeza [Lawrence et al., 2004].

Existe una especificidad laminar en el tipo de proyecciones de la CPF: las neuronas piramidales de las capas II/III tienden a proyectar a otras áreas de la corteza, las de la capa VI al tálamo y algunas zonas corticales y son principalmente las neuronas piramidales de las capas V y VIa las que envían la señal de salida hacia gran número de estructuras subcorticales como conexiones serotoninérgicas [Lambe et al., 2000].

Comunicación neuronal entre las diferentes áreas del cerebro

En la depresión se ha encontrado una alteración notoria en la actividad de diferentes áreas del cerebro entre ellas el sistema corticolímbico, que incluye al hipocampo, amígdala, CPF; además se ha encontrado la desregulación en la expresión de BDNF que es un factor de crecimiento involucrado en la neuroplasticidad y del receptor de tirosina NTRK2 envuelto en maduración y proliferación neuronal en CPF de sujetos deprimidos [Kim and Webster 2010; Bernard et al., 2010].

La complejidad del cerebro es muy marcada debido a que todas las áreas se conectan entre sí ya sea directa o indirectamente, mediante comunicación neuronal (sinápsis química y sinápsis eléctrica) en donde se lleva a cabo la transducción de señales dentro de la célula que provoca cambios en la misma. En el siguiente esquema se puede observar perfectamente la sinapsis química entre los núcleos y la corteza cerebral en las que se presentan estímulos positivos o negativos según la interacción de ligando receptor.

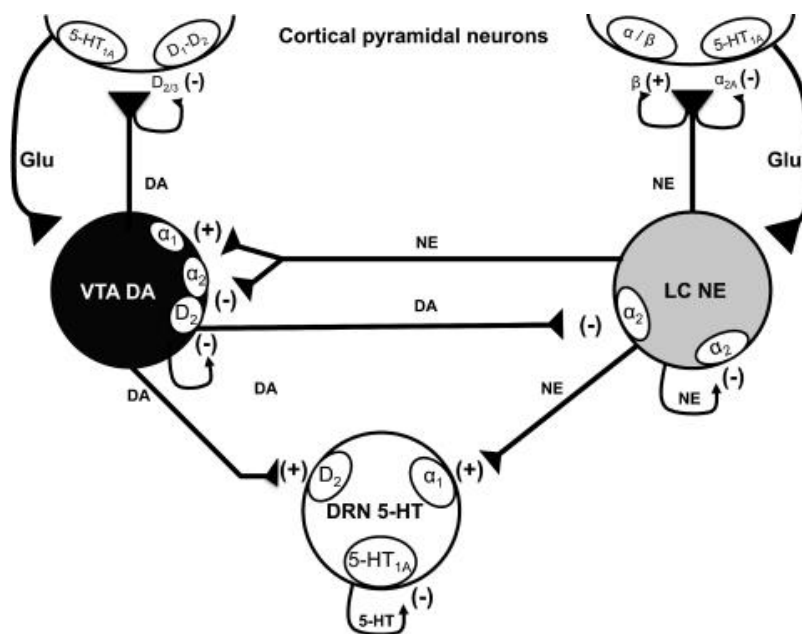


Figura 3. El esquema representa la interacción recíproca entre las neuronas serotoninérgicas(5-HT) en el núcleo Dorsal del ráf (DRN), neuronas noradrenérgicas (NE) secretadas en el Locus coeruleus (LC), y neuronas dopaminérgicas en el área ventral Tegmental (VTA) teniendo diferentes efectos positivos o negativos según el tipo de receptor presente en la neurona. Tomada de Mansarini y col., 2010.

Antidepresivos

El tratamiento de DDM requiere de la administración prolongada de fármacos y se toman como primera opción a los antidepresivos tricíclicos con mecanismos serotoninérgicos que ejercen una marcada influencia sobre la actividad de las vías dopaminérgicas y

norepinérfica que se proyectan en la CPF [Chenu et al., 2013], clasificados en la siguiente tabla.

	Drogas	Mecanismo de acción propuesto
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina, desipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina	Inhibidores no selectivos de la recaptura de monoaminas, incluyendo serotonina, dopamina y norepinefrina
Inhibidores de la recaptura de Dopamina-Norepinefrina	Bupropion	Inhibidores de la recaptura de norepinefrina y dopamina
Modulador de serotonina	Nefazodona, trazodona	Antagoniza principalmente a receptores 5-HT ₂
Inhibidores de la recaptura de Serotonina-Norepinefrina INRS	Desvenlafaxina, duloxetina, venlafaxina	Inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina
Modulador noradrenérgicos y serotoninérgico específico	Mirtazapina	Antagonistas primarios α -2 y receptores 5-HT _{2C}
Inhibidores Selectivos de la recaptura de Serotonina ISRS y agonistas del receptor 5-HT_{1A}	Vilazodona	Inhibidores de la recaptura de serotonina potente y selectivamente y actúa como agonista parcial del receptor 5-HT _{1A}
Inhibidores de la monoaminoxidasa IMAO	Isocarboxazida, fenelzina, tranilcipromina, selegilina	Inhibe a las enzimas (MAO-A y MAO-B) implicadas en la ruptura de monoaminas, incluyendo serotonina, dopamina y norepinefrina MAO-B= inhibidor selectivo
FDA= Administración Estadounidense de alimentos y medicamentos. MAO= Monoamino oxidasa. 5-HT=Serotonina		
Tabla: Antidepresivos aprobados por la FDA Tomada de Kuppfer et al. 2012		

La importancia que tiene el TDM para la comunidad científica y el sector salud, radica en conocer sus causas para generar posibles tratamientos sin efectos secundarios adversos.

Fluoxetina

Los antidepresivos más utilizados son los Inibidores Selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) de los que destaca Fluoxetina. El cuál ha sido ampliamente estudiado, su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de los transportadores de serotonina en las neuronas serotoninérgicas encontradas principalmente en el núcleo Dorsal del Ráfe también está asociado en alteraciones corticales de los neurofilamentos y el remodelamiento sináptico [Guest et al., 2004] en la siguiente figura se explica cómo se encuentra la comunicación neuronal comparando una sinapsis química normal en la cual hay una correcta liberación de neurotransmisores en el espacio intersináptico teniendo excelente

interacción del ligando-receptor; en el TDM la liberación de los neurotransmisores especialmente serotonina se ve disminuida viéndose un efecto marcado en trastornos afectivos; cuando se lleva a cabo la terapia a partir de los ISRS como es fluoxetina se observa un aumento en la concentración de serotonina en el espacio intersináptico teniendo así una mejor comunicación neuronal [Castren, 2005].

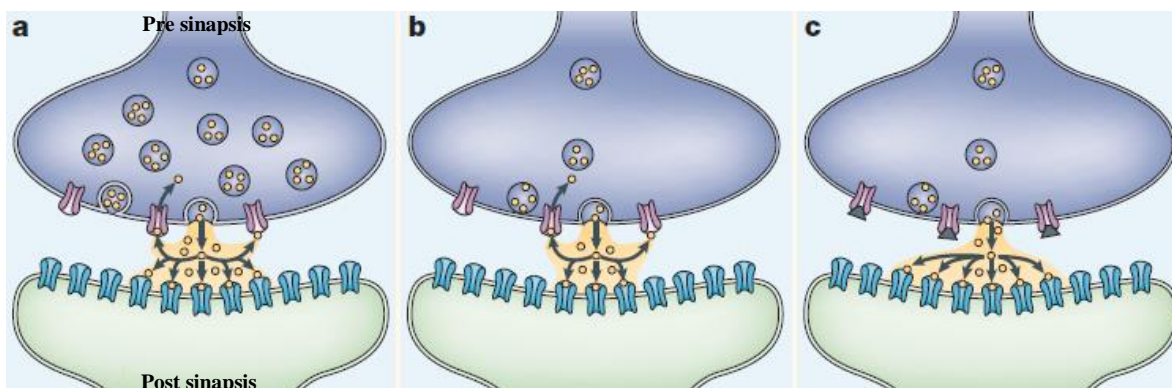


Figura 4. Comparación de la sinápsis neuronal en el Trastorno de depresión mayor. A) Se observa la función normal de la neurona presináptica al liberar una cantidad considerable de serotonina al espacio intersináptico, b) disminuye la liberación de neurotransmisor provocando menor interacción de ligando receptor, c) Bloqueo de los transportadores de serotonina mediante ISRS para mantenerla por más tiempo en el espacio intersináptico. Tomada de [Castren, 2005].

La participación del sistema serotoninérgico en el proceso de depresión es el foco de las terapias clásicas que destacando el uso de los ISRS utilizados en TDM, sin embargo, presentan efectos secundarios adversos como hipertensión, disfunción eréctil, cefalea, y el síndrome de discontinuación por lo que es importante buscar diferentes tratamientos.

Estudios recientes muestran al fármaco agomelatina como un tratamiento eficiente en el TDM ya que no presenta los efectos negativos antes citados [Hale et al., 2010].

Agomelatina

Agomelatina es un antidepresivo análogo de la melatonina que actúa sobre los receptores MT1/MT2 y a su vez es antagonista del receptor 5HT_{2C} [Aloyo et al., 2009]; al bloquear a éste receptor se libera dopamina y norepinefrina [Srinivasan, 2012], diversos estudios proponen que la activación de los receptores D2 tienen como respuesta la posible generación de serotonina en el medio [Chenu et al., 2013] aunque éstos resultados son controversiales [Bodiant et al., 2010]. Existen evidencias de que en la administración aguda (2hrs) de agomelatina los niveles de Dopamina y noradrenalina se ven aumentados y

serotonina se mantiene constante [Bodiant et al., 2010; Chenu et al., 2013], Vincenzo en el 2001 establece que los antagonistas de los receptores 5-HT_{2C} se encuentran localizados en las interneuronas GABAérgicas bloquean el estímulo de la liberación de GABA cuya función es inhibir la secreción de dopamina.

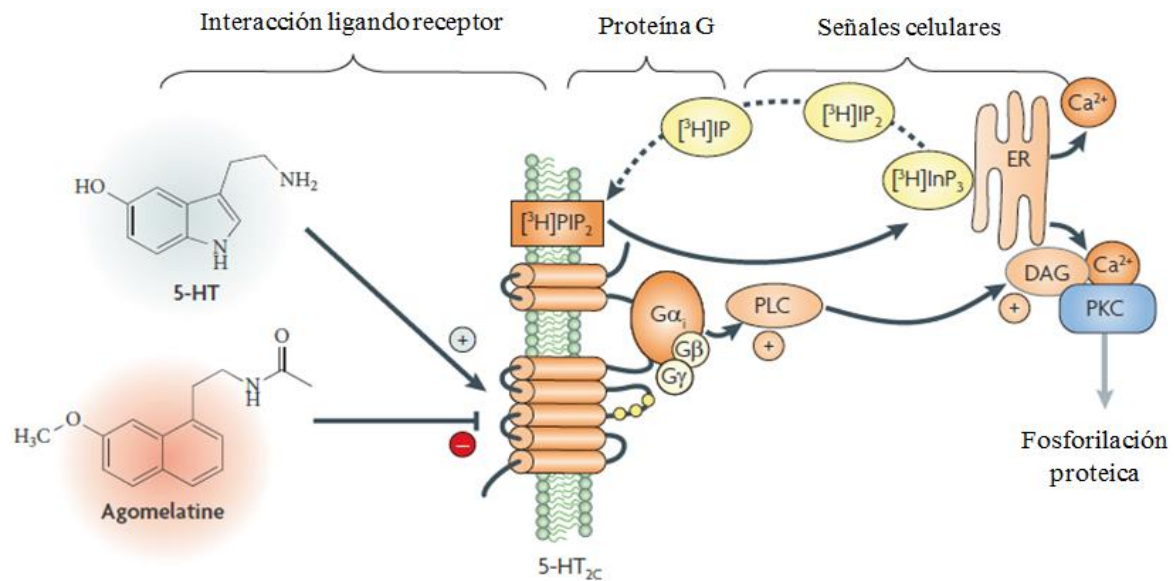


Figura 5. Mecanismo de acción de agomelatina como antagonista del receptor de serotonina 5-HT_{2c} [Bodiant y col. 2010].

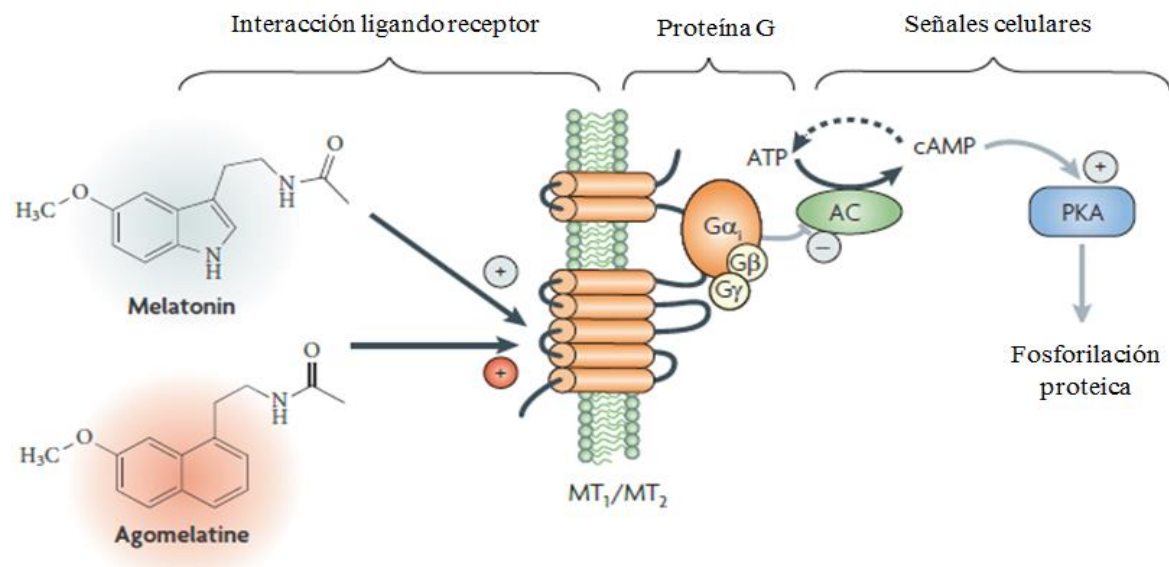


Figura 6. Mecanismo de acción de agomelatina como agonista de los receptores melatoninérgicos [Bodiant y col. 2010].

Modelo de Depresión Mayor

Existen diferentes modelos de depresión en roedores donde los animales se someten a pruebas que constan de periodos de estrés crónico para producir un comportamiento anormal reflejado en su alimentación, peso, temperatura, interacción sexual, social y materna según el caso, además de presentar cambios en el comportamiento de desesperanza y locomotor.

Bulbectomía olfatoria

En el año de 1971 Marks y colaboradores investigó la lesión bilateral de bulbos olfatorios para evaluar el efecto de anosmia sobre el aprendizaje, poco más tarde se evaluó el daño sobre la memoria del animal en la prueba de evitación pasiva mediante la bulbectomía olfatoria (OBX) [Thomas, 1973]. Múltiples estudios muestran que animales con cirugía modifican su comportamiento sexual [Sato y col., 1974; Larsson 1975; Pollak y Sachs, 1975]; alimencitio [Leung et al., 1972; Larue 1975] y cuidado materno [Schwartz y Rowe, 1976]. Personas que cursan con TDM presentan una deficiencia conectiva olfatoria debido a que se encuentra ligado al sistema límbico [Negoias et al., 2010].

La bulbectomía en rata consiste en la eliminación de los bulbos olfatorios que conducen a cambios conductuales (por ejemplo, irritabilidad, problemas de aprendizaje, hiperactividad en campo abierto), que simulan el cuadro clínico de la depresión, el estudio de éste estudio es relevante en el análisis farmacológico de antidepresivos [Van Riezen et al., 1976; Cairncross et al., 1978; Marazziti et al., 2010]. La bulbectomía olfatoria provoca alteraciones en la concentración de neurotransmisores; el sistema serotoninérgico es el más estudiado donde reportan una disminución de serotonina en Corteza frontal, Núcleo accumbens, amígdala e hipocampo [Jancsar and Leonard, 1984; Redmond et al., 1997; Connor et al., 1999; van der Stelt et al., 2005] y el aumento del receptor 5-HT₂ ha sido reportado [Gurevich et al., 1993], en cuanto a los niveles de dopamina no se observan alterados, los niveles de GABA se han encontrado aumentados en CPF así como una disminución de su receptor B [Dennis et al. 1993]; Se ha reportado una desregulación de interleucinas presentes en procesos inflamatorios [Song and Leonard, 2005]; en cuanto a la desregulación hormonal se ha documentado el aumento de corticosterona en suero [Machado et al., 2012].

Ensayos clínicos quirúrgicos rara vez han utilizado una cirugía Sham, "falsa" o procedimiento quirúrgico placebo como control, debido a las preocupaciones éticas. Sin embargo es importante realizarlas para no atribuirle el efecto buscado al procedimiento quirúrgico *per se* en estudios científicos [Wolf and Buckwalter, 2006].

En el modelo de depresión mayor mediante bulbectomía olfatoria produce cambios neurodegenerativos en regiones del cerebro las cuales están inervadas directa o indirectamente con los bulbos olfatorios como son amígdala, hipocampo y Corteza prefrontal las cuales comprenden al sistema límbico; [Wrynn et al., 2000; Song and Leonard, 2005].

Carpuso et al. en 1977 confirma lo establecido por Heimer y Kalil en los años 70's donde la remoción de los bulbos olfatorios tiene como consecuencia la muerte neuronal de 55000 células en la corteza piriforme en rata.

El modelo de bulbectomía olfatoria es ampliamente utilizado para estudiar el efecto de diferentes fármacos como antidepresivos además de los cambios en la conducta, memoria y neurodegeneración [Van Riezen et al., 1976, Morales et al. 2017].

JUSTIFICACIÓN

El Desorden de Depresión Mayor (DDM) es una de las epidemias modernas que compromete cada vez más la calidad de vida humana; el tratamiento clínico para ésta enfermedad es mediante antidepresivos los cuales tienen diferentes mecanismos de acción entre los que destacan ISRS, IMAO, INRS, glucocorticoides; los cuales tienen marcados efectos secundarios adversos, además se ha documentado que existen pacientes que presentan el síndrome de discontinuación ya que no ven mejoras en su salud en periodos relativamente inmediatos, por lo que es importante buscar mejores alternativas frente a éste padecimiento, sin embargo existen nuevos fármacos con efecto terapéutico corto y mecanismos de acción diferentes como agomelatina; hay pocos estudios sobre el modelo de depresión mayor relacionados con el efecto del antidepresivo agomelatina, además no se ha reportado específicamente cuál es el efecto sinérgico del fármaco como agonista de los receptores melatoninérgicos y antagonista del receptor $5HT_{2C}$ en CPF después de un tratamiento crónico y sub-crónico en el modelo de depresión mayor .

Por lo que nos lleva a plantear la pregunta: ¿Cómo se encuentra la concentración de neurotransmisores serotonina y dopamina en una administración prolongada de agomelatina por la inhibición del receptor $5HT_{2C}$ en CPF?

En este proyecto se reta a fluoxetina (ISRS) frente al fármaco agomelatina, además se analiza la conducta y los niveles en los neurotransmisores de serotonina y dopamina después de una administración crónica y sub-crónica en ratas bulbectomizadas, compara la expresión del receptor D2 para modular el incremento de dopamina; el alcance que se obtiene sobre el proyecto de tesis fue dar a conocer parte del efecto de agomelatina sobre los niveles de serotonina en diferentes días de administración de los antidepresivos ya que los resultados mostraron el incremento de serotonina desde el día 7 para fluoxetina y hasta el día 21 para agomelatina estos últimos resultados obtenidos sobre agomelatina no han sido reportados aún.

HIPÓTESIS

El fármaco agomelatina actúa sobre el receptor 5-HT_{2C} de la corteza prefrontal aumentando los niveles de serotonina y dopamina en administración crónica teniendo mejor efecto que el fármaco fluoxetina en el modelo de depresión mayor en rata involucrando al receptor D2.

OBJETIVOS

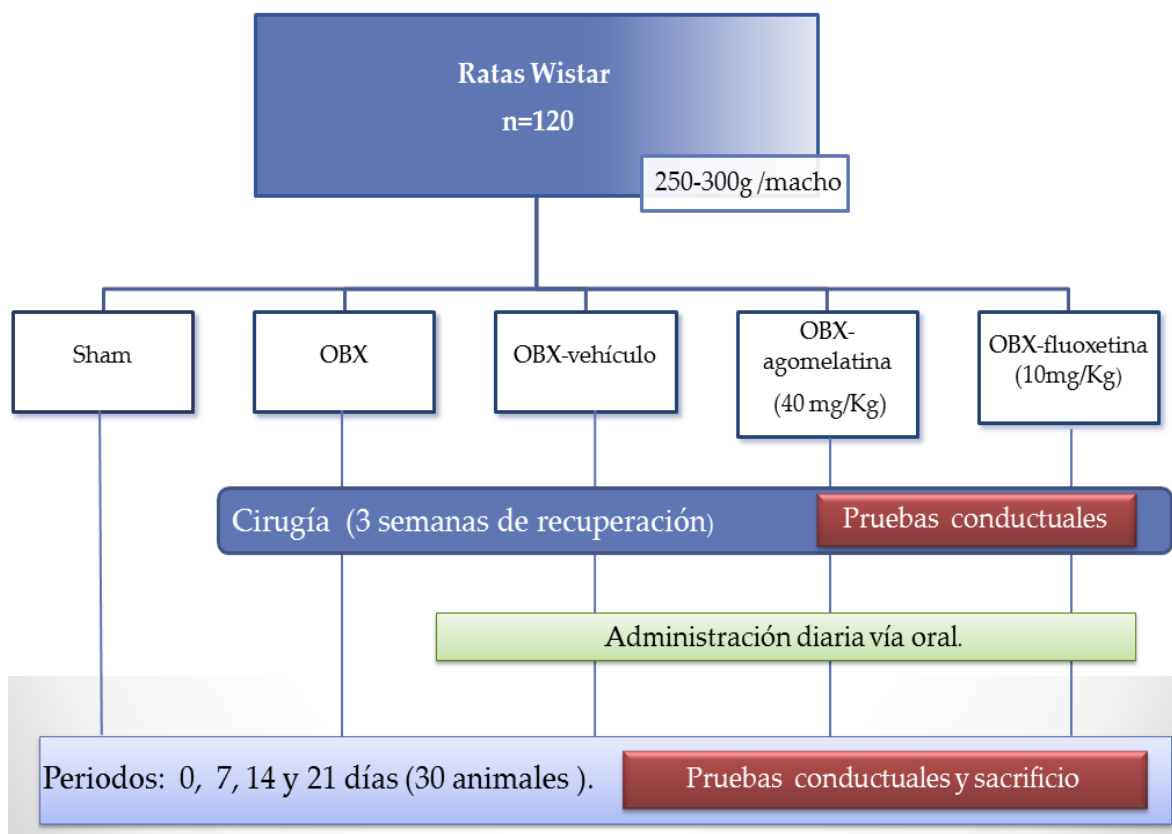
Objetivo general:

Evaluar el efecto de agomelatina sobre el receptor 5-HT_{2C} de CPF en un modelo de depresión mayor en ratas.

Objetivos particulares:

- Aplicar el modelo de depresión mayor mediante la bulbectomía olfatoria en ratas.
- Evaluar las conductas depresivas y el efecto de los antidepresivos Agomelatina o Fluoxetina en los diferentes periodos de administración mediante el modelo de presión mayor.
- Determinar el efecto que tienen los antidepresivos Agomelatina o Fluoxetina sobre los neurotransmisores de serotonina y dopamina.
- Evaluar la inmunoreactividad del receptor DRD2 en CPF de ratas OBX tratadas con Agomelatina o Fluoxetina.

ESQUEMA DE TRABAJO



METODOLOGÍA DE TRABAJO

Se utilizaron un total de 120 ratas macho de la cepa Wistar de entre 250g-300g de peso provenientes del Bioterio "Claude Bernard" de BUAP bajo la dirección del Dr. Carlos Escamilla Weinmann; con número de autorización de proyecto de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado VIEP 1185.

De manera aleatoria se asignaron 6 animales a cada uno de los 5 grupos ordenados de la siguiente manera: Sham (cirugía falsa), OBX (bulbectomía), OBX-V (bulbectomía y vehículo), OBX-F (bulbectomía y fluoxetina) y OBX-A (bulbectomía y agomelatina).

Cirugía bulbectomía bilateral en rata (OBX)

Se colocaron las ratas anestesiadas con ketamina/xilazina 0.2ml/100g de peso en el estereotáxico, se realizó una incisión, se retiró el periósteo localizando el punto Bregma y se midió 6.4 mm hacia la parte anterior del Bregma, haciendo 2 perforaciones de 2.0 mm de diámetro profundidad de 1.9 mm. Los bulbos olfatorios se extrajeron removiendo el tejido con una pinza de microcirugía y por succión con una cánula adaptada. El proceso se realizó como se describe en la Tesis de Maestría [Aparicio, 2014; Thomas, 1973; Cairncross, 1978]. Los animales con cirugía Sham fueron sometidos al proceso de exposición de los bulbos olfatorios sin su extracción.

Pruebas conductuales

Se llevaron a cabo tres semanas posteriores al día de cirugía (tiempo de recuperación) y el día final al tratamiento con antidepresivos los días 0, 7, 14 y 21.

Discriminación olfatoria

Se llevó a cabo como prueba de anosmia dónde el animal fué expuesto a un estímulo oloroso (galletas de chispas de chocolate) el cual debe ser reconocido por la presencia de los bulbos olfatorios con ayuno previo de 12 horas. (Los animales a los que se les realizó la bulbectomía no reconocen el alimento) Se analizó durante 5min. midiendo el tiempo reconocimiento del alimento.

Conducta motora

Se realizó la prueba de mediante Campo Abierto [Denenberg, 1969], durante 5 minutos evaluando acicalamiento, conducta erguida, actividad horizontal (número de cuadros visitados), número de estáticos >3s y tiempo en el centro.

Luz/oscuridad

La prueba de luz/oscuridad [Crawley JN, Goodwin FK, 1980] se evaluó el tiempo de latencia, se cuenta el número de entradas y salidas durante 4 minutos y el tiempo total en oscuridad.

Desesperanza

Mediante la prueba de Nado Forzado teniendo como variante de la prueba descrita por Porsolt con tiempo único de 10 min. Dónde se determina el tiempo total de nado, tiempo total de inmovilidad y tiempo de struggling [Porsolt, 1977; Morales, 2013].

Pruebas físicas

Todos los grupos fueron pesados y se les determinó la T° cada tercer día [Oba et al., 2013] durante los diferentes periodos de análisis del proyecto.

Administración de fármacos

La administración de antidepresivos se realizó a partir del día 21 una vez evaluado el modelo y se llevó a cabo por diferentes periodos con administraciones diarias del antidepresivo de 0, 7, 14 y 21 días.

Agomelatina:

El antidepresivo se administró agomelatina IUPAC N-[2-(7-methoxinaftalen-1-il)etil]acetamida se administra 40mg/Kg [Bodiant et al., 2010].

Fluoxetina:

El antidepresivo se administró Fluoxetina IUPAC (RS)-N-Metil-3-fenil-3-(4-trifluorometilfenoxi)propilamina la familia IRSS se administró 10mg/Kg [Roche et al., 2007].

Ambos fármacos tuvieron como vehículo a carboximetilcelulosa 1% durante los diferentes periodos (0, 7, 14 y 21 días) vía oral teniendo los grupos: OBX-F, OBX-A y OBX-V.

Los días de sacrificio se llevaron a cabo: 0, 7, 14 y 21 días una vez comenzado el tratamiento; 24 horas después de la última administración del fármaco, se anestesió y el método de eutanasia se llevó a cabo por perfusión. Las muestras se repartieron a la mitad para ser incluidas en parafina y la otra mitad se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento [Ladurelle et al., 2012].

Los Cuidados de los animales de laboratorio se llevaron a cabo según el CICUAL a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Una vez obtenidas las cortezas prefrontales de rata se cuantificó serotonina en sobrenadante mediante Serotonin ELISA kit ADI-900-175.

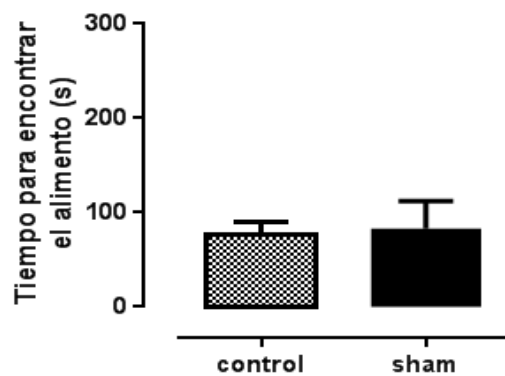
El análisis de la presencia de dopamina y de su receptor DRD2 se llevó a cabo por el ensayo de inmunohistoquímica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de disminuir el número de animales de estudio según lo establecido por el CICUAL se llevó a cabo el análisis entre el grupo Control y Sham comparado con OBX.

➤ Estandarización de la técnica del modelo de trastorno depresivo mayor mediante la bulbectomía olfatoria en ratas. (Análisis de la anosmia para confirmar la cirugía exitosa).

La prueba de anosmia (gráfica 1) se observan el mismo comportamiento entre el grupo control y sham.

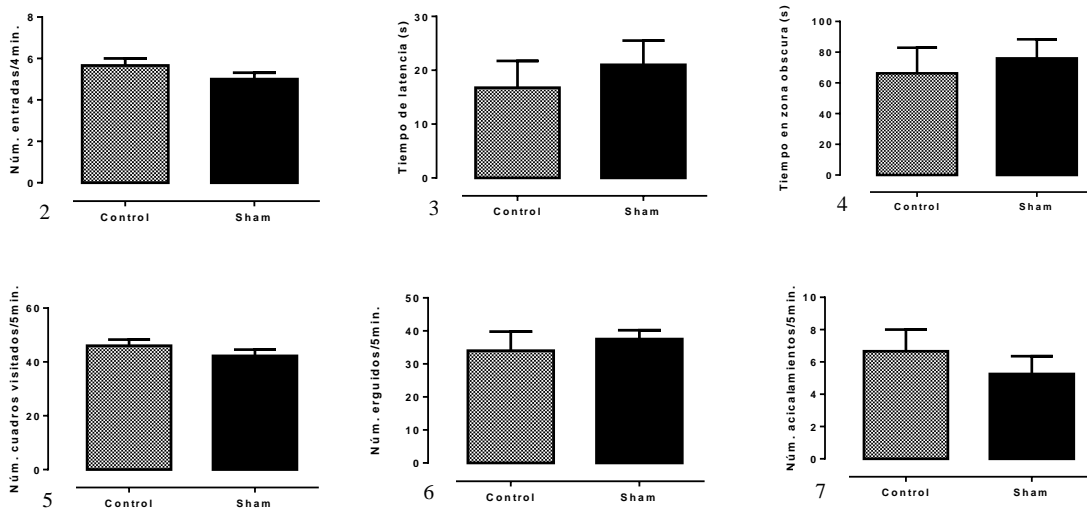


Gráfica 1. Prueba de anosmia durante 600s, n=10. Se compara el tiempo de reconocimiento del alimento entre el grupo sham y el grupo control.

Según Thomas en 1973 y Cairncross en 1978 toman a la bulbectomía olfatoria es considerada un excelente modelo para evaluar al TDM. Los resultados mostrados de la cirugía exitosa concuerda con la prueba de anosmia de Morales, 2013.

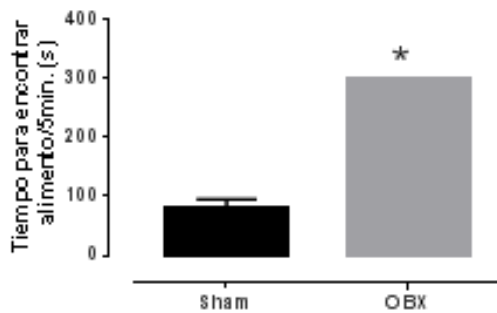
Con el fin de evitar sacrificios innecesarios se realizó una prueba piloto para saber si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y Sham teniendo como referencia el día 21 posterior a la lesión.

Se realizaron las pruebas conductuales encontrando los siguientes resultados: las gráficas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 que muestran que la cirugía realizada a las ratas Sham no modifica su comportamiento conductual habitual lo que da la pauta para no realizar uno de los grupos Sham/Control para cumplir con lo que marca el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).



Las gráficas 2-4. Evalúan la prueba de Luz/oscuridad durante 4min. donde: la gráfica 2 evalúa el número de entradas y salidas, la gráfica 3 el tiempo de latencia, la gráfica 4 el tiempo total de oscuridad. En las gráficas 5-7 se lleva a cabo el análisis de la prueba de Campo Abierto: la gráfica 5 mide la actividad horizontal mediante el número de cuadros visitados, la gráfica 6 mide la actividad vertical mediante el número de erguidos y el gráfico 7 determina el número de estáticos $\geq 3s$. Las gráficas 2-7 representan el valor medio \pm ESM, $n=10$ /grupo. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

➤ En los siguientes resultados se muestran las diferencias de comportamiento conductual en los grupos Sham y OBX en: Anosmia, Discriminación Olfatoria, Evitación a la Luz, Campo Abierto y Nado Forzado.



Gráfica 8. Tiempo de reconocimiento del alimento 5 min. La gráfica representa el valor medio \pm ESM. T de student $p < 0.05$, $n=10$ /grupo.

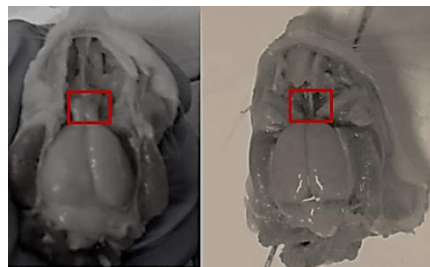
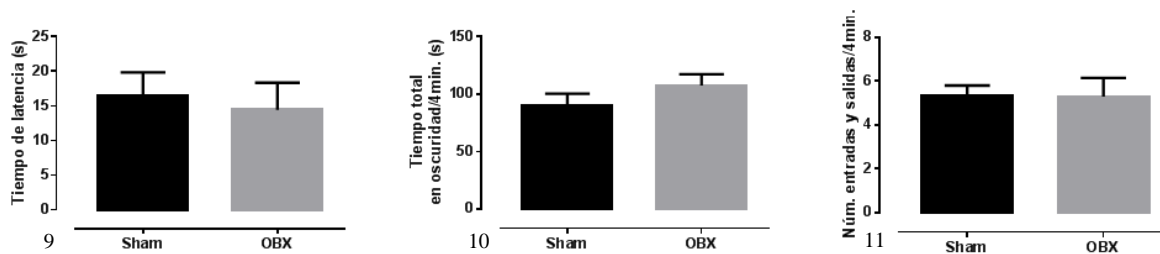
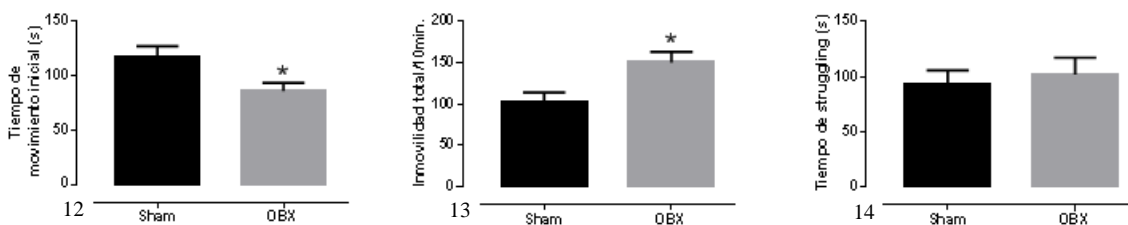


Figura 7. Cirugía exitosa OBX en rata



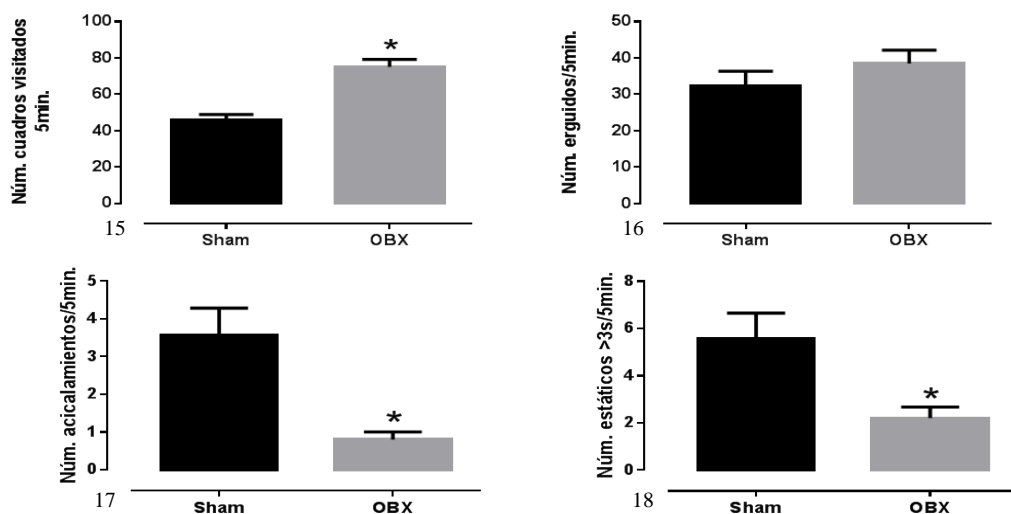
Gráficas 9, 10,11. Se Evalúa la prueba de Luz/oscurida. Gráfica 9: Tiempo para entrar a la zona oscura; Gráfica 10. Tiempo total en zona oscura y Gráfica 11. Núm. De entradas de una zona a otra, n=10 por grupo. Valor medio \pm ESM. NO se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo sham(cirugía falsa) y OBX (bulbectomía).



Gráficas 12, 13 y 14. Se analiza la prueba de nado forzado. Gráfica 12: Tiempo inmovilidad inicial; Gráfica 13. Tiempo de inmovilidad total; Gráfica 14. Tiempo que la rata araña la pared. Se evalúa al grupo sham (cirugía falsa) y OBX (bulbectomía) se observan diferencias estadísticamente significativas en el gráfico 12 y 13. n=10/grupo. Valor medio \pm ESM. * T de student $p < 0.05$

Los datos arrojados sobre la prueba de luz oscuridad de las gráficas 9,10 y 11 no se observa diferencias estadísticamente significativas entre el grupo sham comparado con el grupo de bulbectomía olfatoria.

Las gráficas 12,13 y 14 representan la prueba de Nado Forzado donde los animales OBX dejan de moverse primero en comparación con el grupo sham, además se observa que el tiempo de inmovilidad total es mayor en el grupo OBX que en el Sham por lo tanto hay un bajo sentido de supervivencia, en la prueba de struggling/climbing no se observan diferencias significativas entre ambos grupos [Borsoi et al. 2014; Morales et al., 2013].



Gráfica 15, 16, 17, 18. Prueba de Campo Abierto: gráfica 15 Actividad horizontal; Gráfica 16. Actividad vertical; Gráfica 17. Acicalamientos: Número de veces que realiza su limpieza. Gráfica 18. Número de estáticos >3s: Número de veces que deja de moverse. Cada gráfica representa el valor medio \pm ESM. T de student $p < 0.05$, $n=10$ /grupo.

Las gráficas 15,16,17 y 18 representan la prueba de campo abierto y con estos resultados se puede asegurar que el grupo OBX presenta una hiperactividad en comparación del grupo sham, además el grupo sham presenta mayor número de acicalamientos que conduce a comportamiento de confianza, mientras que OBX pierde el interés de acicalarse, por otro lado los resultados del periodo estático que presentan los animales sham permiten establecer un pronto reconocimiento en la caja de campo abierto que el grupo OBX no presenta [Prut and Belzung, 2003; Cárdenas, 2002].

Modelo de depresión frente a la administración de antidepresivos en los diferentes periodos.

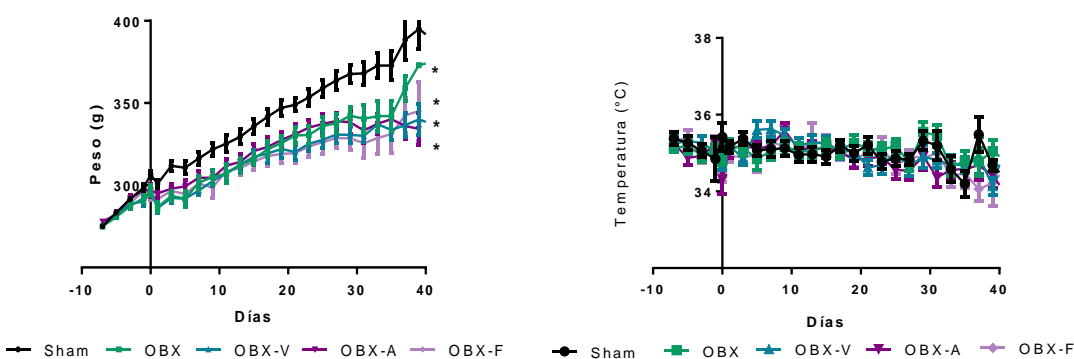
La bulbectomía olfatoria es un excelente modelo de depresión que emula las características conductuales que presenta una persona que sufre el Trastorno de Depresión Mayor.

Éste modelo comprende pruebas físicas que consisten en la toma de peso y temperatura, la prueba de anosmia para corroborar la cirugía, además de las pruebas conductuales de Luz Oscuridad, Campo abierto y Nado forzado.

Pruebas Físicas.

Se llevaron a cabo desde 7 días antes del día cero en el cual se realiza la cirugía, en la gráfica 19 se observa el efecto de la bulbectomía en ratas Wistar, donde se pesó cada tercer día a los animales observando una marcada diferencia en la obtención de peso, donde los animales con bulbectomía presentan una disminución en éste rubro comparados con el grupo Sham al cuál sólo se le realizó la perforación ósea, en éste parámetro podemos demostrar que el modelo de bulbectomía coincide con la pérdida de peso en pacientes deprimidos [DSM-IV-TR, 2002] y con estudios realizados con modelos de depresión con roedores [Qiao et al., 2014; Aparicio, 2014]. La diferencia de peso entre los diversos grupos son el resultado de la bulbectomía olfatoria en rata que evita el consumo del alimento debido a la manipulación quirúrgica, después de la recuperación por la cirugía no se alimentan de manera normal por la ausencia de bulbos olfatorios ya que no pueden oler y así reconocer su comida tomando el alimento por imitación del animal sham encontrado en cada caja; se puede comparar éste comportamiento con los pacientes deprimidos ya que presentan trastornos alimenticios ya sea por falta de apetito o comen de más por ansiedad, en la conducta presentada en el caso de OBX se observó que presentan ansiedad que las indujo roer incluso a tener coprofagia, hasta el momento no se han encontrado datos en la bibliografía sobre el tema.

En cuanto a los datos en la temperatura corporal mostrados en la gráfica 20 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, éstos resultados difieren con los estudios reportados [Roche et al., 2007]; por lo que se sugiere que los datos pueden variar en el tiempo y forma en que son tomados e incluso por las diferentes estaciones del año.



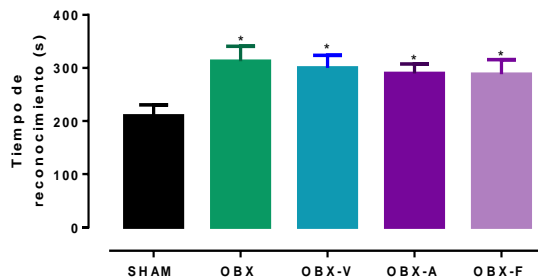
Gráfica 19. Efecto de la bulbectomía olfatoria sobre el peso. $n=24$ por grupo. ANOVA de una vía, $*p<0.05$. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

Gráfica 20. Temperatura tomada durante el tiempo de estudio. No se observan diferencias en éste parámetro. $n=24$ por grupo. ANOVA de una vía, $*p<0.05$.

Pruebas conductuales

Anosmia.

La prueba de Anosmia mostrada en la gráfica 21 se realizó para ver si 21 días después de la bulbectomía el roedor podía responder al estímulo oloroso (galletas de chocolate) donde las ratas Sham encuentran rápido el alimento oloroso tras un ayuno prolongado y esto se le atribuye a que su sistema olfatorio no fue dañado, sin embargo los animales con bulbectomía tardan o no detectan el estímulo oloroso dentro de 300s ésta prueba se ha extendió hasta 600s (datos no mostrados) dónde el grupo con la cirugía siguen sin encontrar el alimento [Morales et al., 2013]. Hay estudios con diferentes pruebas de detección de olores dónde ésta especie tiene un alto porcentaje asertivo a diferentes estímulos olorosos volátiles detectados por el bulbo olfatorio [Apfelbach et al., 1999; Kraemer, 2004]. La prueba de anosmia es necesaria para descartar la regeneración del bulbo olfatorio antes removido, si el sujeto OBX encuentra el alimento de manera rápida quiere decir que se ha regenerado o tiene restos de bulbo y por lo tanto se descarta al animal para las pruebas posteriores, los sujetos algunas veces tienden a encontrar el alimento oloroso mediante el tacto sin reconocerlo por el olor, esto puede dar falsos positivos por el ayuno prolongado al que se expusieron. Además se comprueba la bulbectomía post-eutanasia Imagen 1.

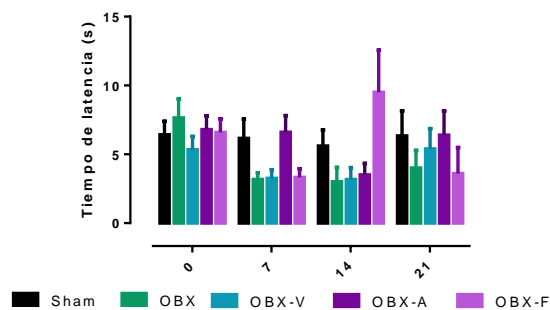


Gráfica 21. Tiempo de reconocimiento del alimento 5min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=24$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

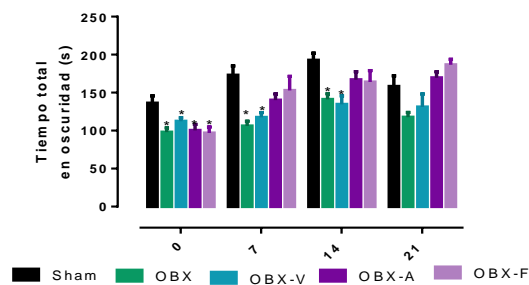
Luz/Oscuridad

La Prueba de luz oscuridad que es una modificación de la prueba de Evitación a la luz descrita inicialmente por Crawley y Goodwin en 1980 proporciona datos acerca del comportamiento natural de aversión a la luz. Sin embargo desde 1973 reportado por Thomas se observó daño en el aprendizaje de ratas mediante el análisis de la prueba de evitación a la luz. La determinación de un animal para no permanecer en la zona iluminada es inmediata pero la parte la permanencia

en la zona oscura es determinante para analizar su estado de ansiedad; cuando éste no es capaz de reconocer la zona en la que se encuentra inicia con episodios de ansiedad reflejados en la entrada y salida de la zona oscura e iluminada permaneciendo menor tiempo en la zona de oscuridad. Los resultados observados en la gráfica 22 aunque no muestra diferencias estadísticamente significativas en los grupos, se observa que el tiempo de ingreso a la zona oscura no es mayor a 12 segundos los animales con bulbectomía tienden a entrar más rápido que los sham, sin embargo, no permanecen en el área de confort (zona de oscuridad) mostrando los datos en la gráfica 23 y por lo tanto los animales pasan más tiempo en el área iluminada; al administrar antidepresivos con diferentes mecanismos de acción durante los periodos 7, 14 y 21 días en ratas con bulbectomía se puede observar la mejora de los dos grupos OBX a los que se les administró el antidepresivo agomelatina o fluoxetina teniendo un efecto notorio desde el día 7, éste efecto ansiolítico se mantiene para el periodo 14 de administración y sigue presentando mejoría hasta el día 21 comparado con el grupo sham.



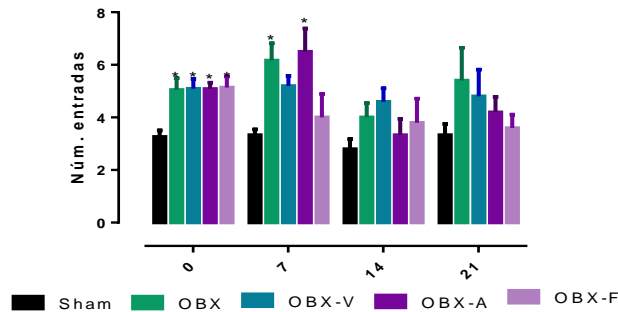
Gráfica 22. Tiempo que tarda el animal en pasar de un área iluminada a otra oscura. 4min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo.



Gráfica 23. Tiempo total que permanece en oscuridad. 4 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo

Siguiendo con la prueba de evitación a la luz los animales tienen como característica la conducta exploratoria que los empuja a transitar de un área iluminada a la parte oscura para reconocer el lugar en el cuál se encuentran, éste método se ha usado con éxito en ratones [Berrendero and Maldonado, 2002], en la gráfica 24 se detectó que los animales con bulbectomía tienen mayor número de entradas que el grupo Sham, éste dato habla sobre la ansiedad que presentan éstos grupos ya que al no tener su órgano principal (bulbo olfatorio) terminan la prueba sin reconocer el lugar. Se puede percibir el efecto de los antidepresivos teniendo una disminución del parámetro

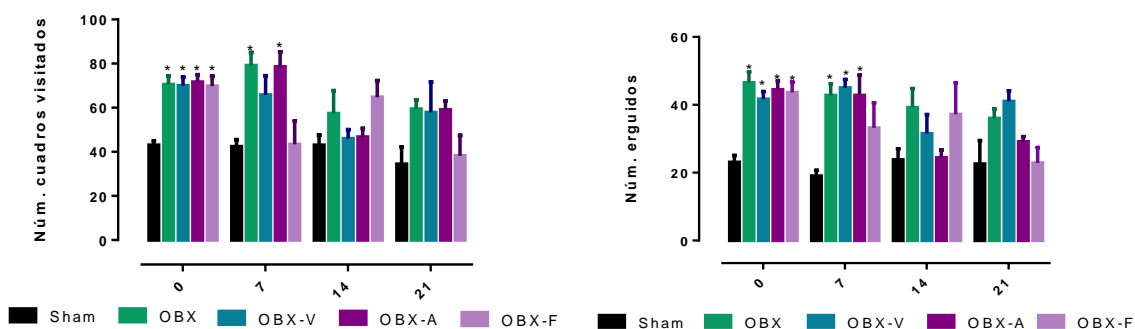
en un corto periodo de administración desde los 7 días para el grupo administrado con Fluoxetina, en cuanto al grupo administrado agomelatina presenta mejoría a partir del día 14 y manteniéndose el efecto hasta el día 21 de administración en ambos fármacos.



Gráfica 24. Número de entradas y salidas 4min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo control

Conducta Motora

La prueba de conducta motora mediante el modelo de Campo abierto descrita por Hall en los 30's es una de las pruebas más antiguas, simples y ampliamente utilizadas ya que se evalúa el comportamiento emocional y de ansiedad, en la gráfica 25 y 26 mediante la actividad horizontal y vertical [Prut and Belzung, 2003; Cárdenas, 2002]; se observa un estado inicial de ansiedad en los grupos con bulbectomía que concuerda con otros estudios realizados donde éstos animales visitan un número mayor de cuadros comparadas con el grupo sham [Jindal et al., 2015; Morales et al., 2013; Mostafa et al., 2015; Roche et al., 2007; Song and Leonard , 2005]. A pesar de su condición los grupos administrados con los antidepresivos Agomelatina y Fluoxetina ejercen un efecto positivo en la disminución de del número de cuadros visitados, los datos del grupo OBX-F concuerdan con estudios reportados con fluoxetina tras 5 semanas de administración los animales presentan mejoría [Roche et al., 2007] en cuanto al número de erguidos también se ha documentado el efecto del mismo fármaco sobre ratas OBX y su mejora frente a Fluoxetina [Machado et al., 2012], los grupos con el tratamiento de agomelatina también observan una disminución en la hiperactividad en número de cuadros visitados desde el día 7, 14 que concuerda con estudios de ratas SD administradas vía intraperitoneal por 14 días [Norman et al., 2011], para el día 21 el efecto se sigue dando para ambos grupos OBXA/OBX-F.

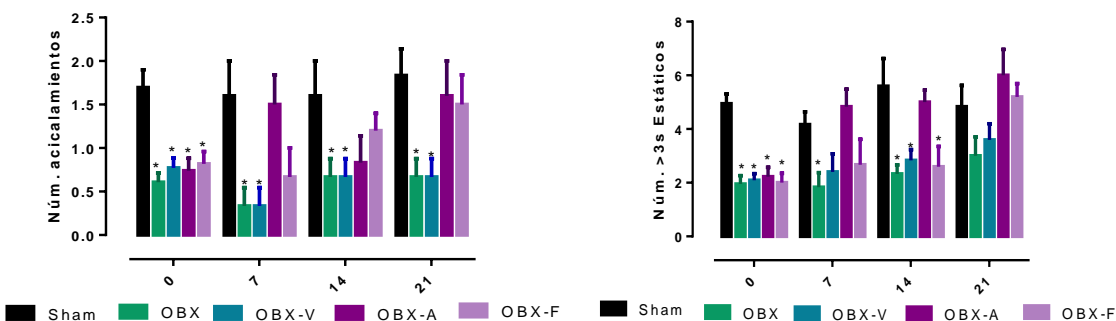


Gráfica 25. Actividad horizontal, 5min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

Gráfica 26. Actividad vertical, 5min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

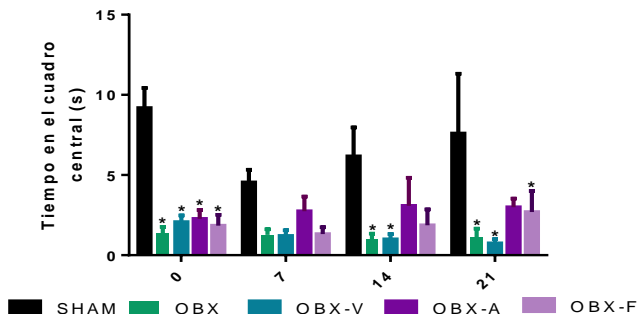
La conducta de acicalamientos en éstos roedores es parte de su comportamiento diario por lo tanto también se evalúa ya que el modelo de depresión mediante la bulbectomía Olfatoria presenta desinterés asemejando uno de los síntomas en el TDM que es la falta de aseo y cuidado personal; en la gráfica 27 se presentan los resultados de éste parámetro donde las ratas sin bulbos olfatorios pierden el interés por acicalarse, desde el día 0 donde se muestra que las ratas bulbectomizadas tienen menor número de acicalamientos comparados con las ratas sham; sin embargo los resultados obtenidos en éste trabajo concuerdan con otros reportes donde la exposición a fármacos aumenta el número de acicalamientos [Audet et al., 2006], esto se puede observar ya que ambos antidepresivos presentan una mejoría desde el día 7 hasta el día 21 sobre el animal bulbectomizado, en el fármaco Agomelatina destaca por su efecto en el día 7, aunque ha resultado ser controversial [Machado et al., 2012]. En cuanto al número de periodos estáticos que está íntimamente ligado con la actividad horizontal y vertical donde los animales OBX disminuyen el número de periodos estáticos por una marcada hiperactividad. En la gráfica 28 las pruebas iniciales (día 0) muestran que el grupo sham presenta más periodos estáticos que los grupos con bulbectomía, al realizar la administración de antidepresivos se detecta que el grupo del fármaco Agomelatina ejerce su efecto inmediato para el día 7 de administración y posteriormente fluoxetina llega a tener el mismo efecto a partir del día 14, ambos fármacos lo mantienen en el día 21. Se ha demostrado que varios antidepresivos como los IMAO o IRSS (fluoxetina) han sido utilizados para atenuar desordenes conductuales donde los IRSS incrementan los niveles de serotonina en el medio permitiendo la disminución de éste desorden, entre los padecimientos analizados se encuentran: desorden obsesivo compulsivo, bulimia nerviosa, pánico y ansiedad, a pesar de que el mecanismo no esté del todo claro. En el modelo de depresión mayor (OBX) conductualmente la ansiedad se presenta en éstos roedores; una forma de analizar éste desorden es mediante la conducta motora de manera específica analizando el tiempo que pasa el animal en el cuadrante central, los resultados presentados en la gráfica 28 que el grupo de bulbectomía pasa poco tiempo en dicho cuadrante o no llega a pasar por éste al igual que el grupo OBX-vehículo éstos resultados concuerdan con [Machado, 2012;] confirmando que

la administración de antidepresivos reduce la ansiedad, por otro lado los grupos bulbectomizados a los cuales se les administró fluoxetina y presentan un comportamiento de mejora a partir del día 14 el cual coincide con lo descrito por Borges et al., 2016 Utilizando misma dosis de fluoxetina en diferente especie (C57B/6J ratón); el antidepresivo de agomelatina se observa una marcada mejora desde el día 14 que sostiene hasta el día 21 por lo que se observa un efecto ansiolítico sobre el modelo de depresión mayor.



Gráfica 27. Limpieza en roedores, 5min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

Gráfica 28. Número de estáticos > 3s, 5 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

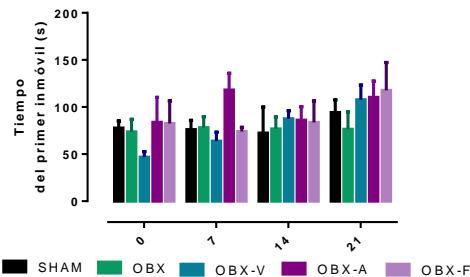


Gráfica 29. Tiempo total en el cuadrante central, 5 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

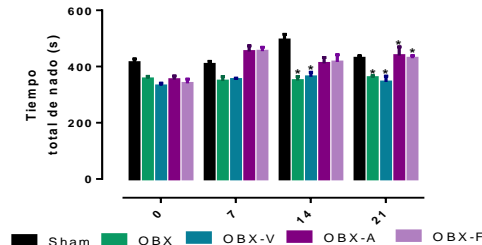
NADO FORZADO

Las gráficas 30, 31, 32 y 33 representan los datos parciales en la prueba de Nado Forzado método realizado por Porsolt en 1977 que evalúa la desesperanza mediante la exposición adversa en agua donde no hay una forma de escape. En la gráfica 30 se observa el tiempo del primer inmóvil en los grupos donde no se encuentran diferencias estadísticamente significativas para éste parámetro, sin embargo en el día 7 hay una tendencia para sobrevivir por el grupo administrado con agomelatina. En la gráfica 31 se muestra el Tiempo total de Nado donde se puede ver el efecto de ambos antidepresivos desde el día 7 y se mantiene hasta la administración prolongada de 21 días para agomelatina y Fluoxetina por lo tanto el efecto que ejercen ambos

fármacos es favorable ya que aumenta su movilidad dentro del agua y permanece más tiempo en la superficie comparado con los animales OBX sin tratamiento.

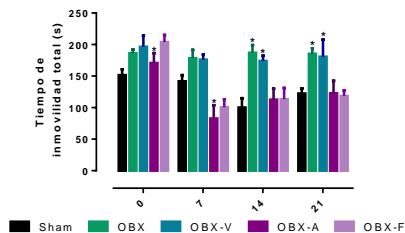


Gráfica 30. Tiempo de la primera inmovilidad 10 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo.

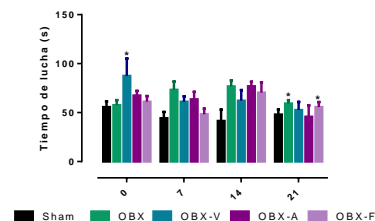


Gráfica 31. Tiempo de nado total 10 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

En el parámetro de Tiempo de inmovilidad total se observa incrementado del grupo OBX y OBX-V en comparación con el grupo sham desde el día 7 hasta el día 21, por lo tanto se habla de un bajo sentido de supervivencia en ratas con bulbectomía sin tratamiento que concuerda con los síntomas de depresión (desinterés por la vida) [Morales et al., 2013; Tasset et al., 2010] ; en cuanto a los grupos administrados con los antidepresivos podemos ver que asemejan el comportamiento con el grupo sham desde el día 7 presentando una marcada mejora disminuyendo el número de inmóviles y por lo tanto presentan mayor sentido de supervivencia debido al efecto del antidepresivo. En la prueba de struggling/climbing no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y concuerda con estudios anteriores [Borsoi et al., 2014; Morales et al., 2013] esto puede deberse a la prueba misma ya que por instinto buscan salida rasguñando las paredes.



Gráfica 32. Tiempo de inmovilidad total 10 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.



Gráfica 33. Struggling 10 min. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=6$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

Tinción de Hematoxilina y Eosina

El análisis de la corteza prefrontal (CPF) en rata se llevó a cabo sobre los cortes coronarios de las áreas Cg2 y Cg1 del Giro Cingulado, M2 y M1 vinculado a la parte motriz de rata observado en la figura 8.

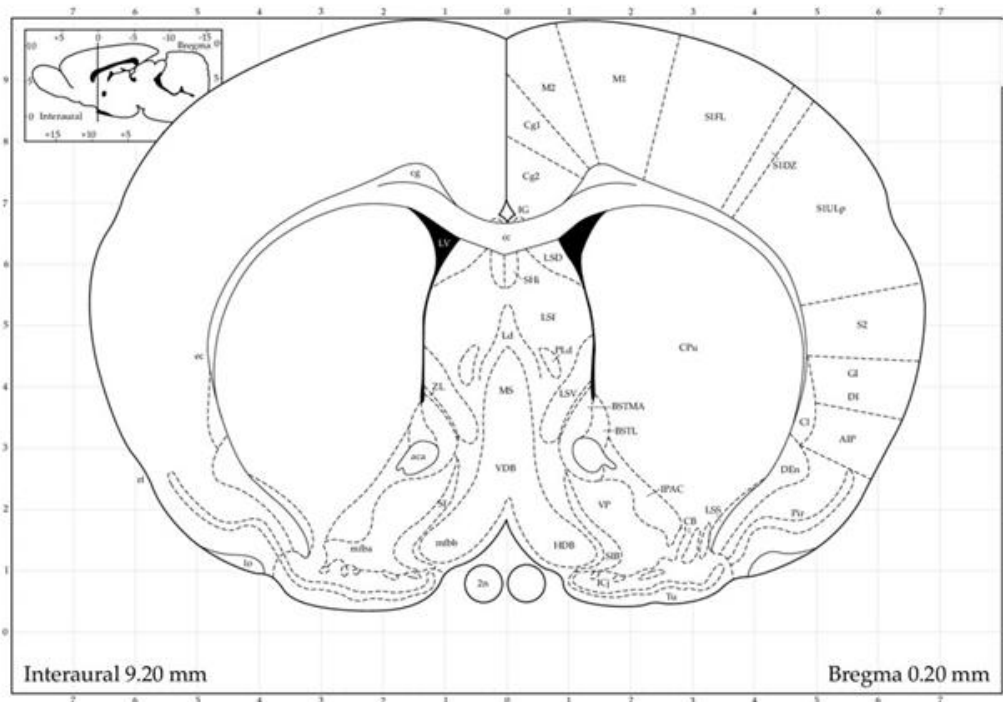


Figura 8. Corte coronal de cerebro de rata, áreas de la CPF: Cg2, Cg1, M2 y M1. Tomado de Paxinos y Watson, 2006.

El estudio de la figura 9 se llevó a cabo para poder observar la diferencia neuronal en las áreas analizadas de la corteza prefrontal las cuales fueron Cg1, Cg2, M1 y M2 de tres diferentes morfologías celulares Granular, Piramidal y células de la Glía de las cuales se puede observar la disminución en la cantidad de neuronas piramidales de los grupos OBX y OBX-V al día 42 post cirugía y un aumento en células de la glía en las 4 áreas analizadas, autores como Kelly et al. en 1997, Jarosik et al. en 2007 y Bernard en 2010 han reportado cambios neurodegenerativos de ratas con bulbectomía en áreas cerebrales de roedores dentro de las que destacan corteza frontal e hipocampo.

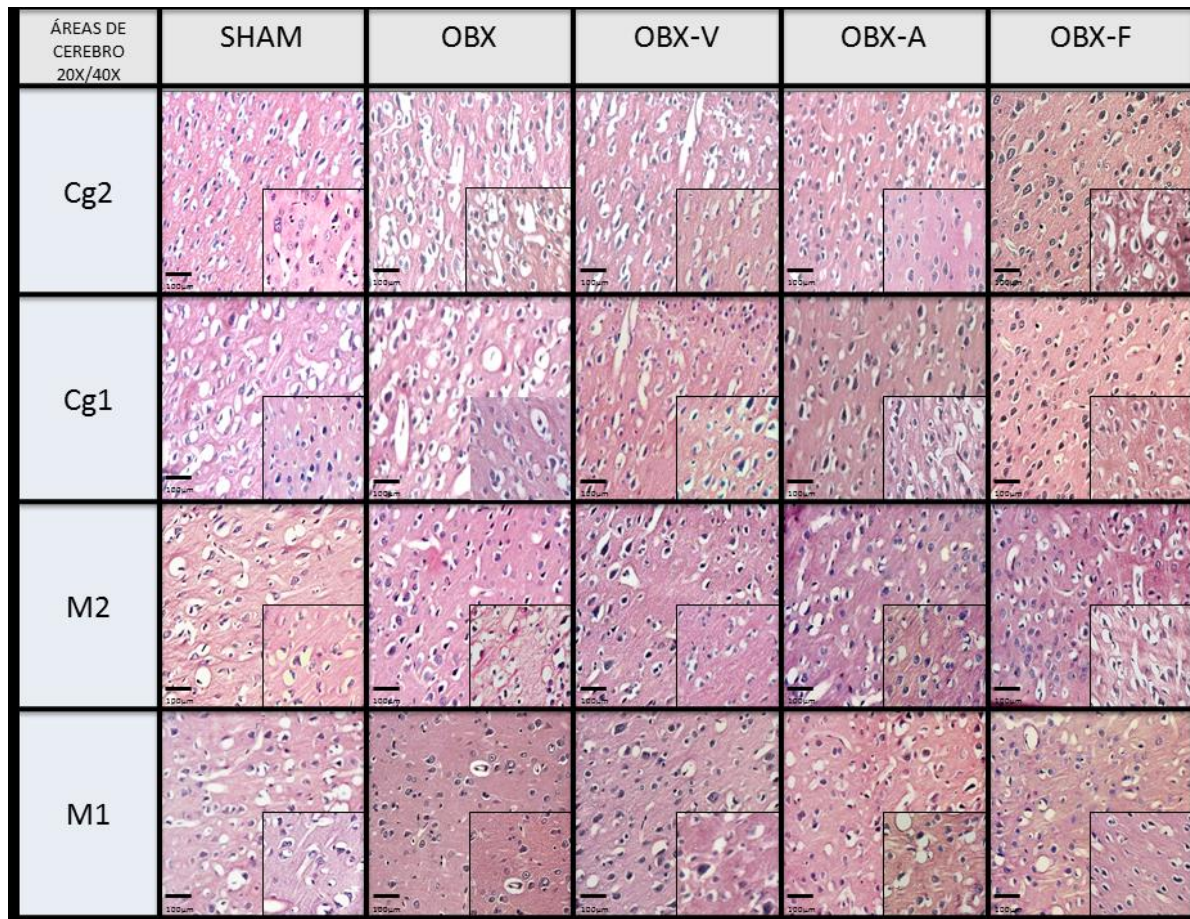
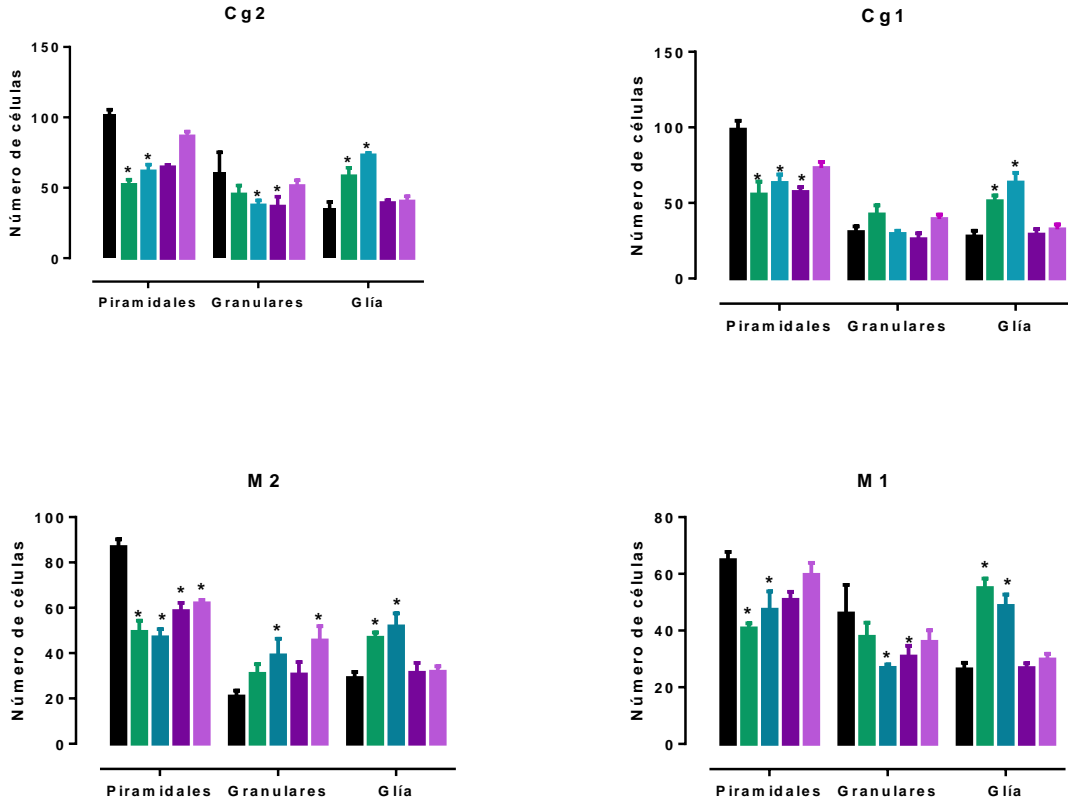


Figura 9. Tinción de Hematoxilina y Eosina de Corteza prefrontal áreas Cg2, Cg1, M2 y M1 sobre los grupos Sham, OBX (bulbectomía), OBX-V (bulbectomía + vehículo), OBX-A (bulbectomía + agomelatina) OBX-F (bulbectomía + Fluoxetina. barra=100 μ m).

En la corteza prefrontal se observa la disminución celular de neuronas granulares y piramidales en el modelo de depresión mayor y un aumento en la glía (astrocitos y oligodendrocitos); en estudios se ha correlacionado con el aumento de células Gliares con la presencia de citosinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y agentes neurotóxicos en hipocampo y CPF presentando daño neuronal [Song and Leonard, 2009; Rinwa et al., 2013].



Gráfica 34. Conteo celular. Células granulares, piramidales y de la glía en diferentes áreas de la Corteza Prefrontal Cg2, Cg1, M2 y M1. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.05$, $n=4$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

Inmunohistoquímica de Dopamina

Se realizó el análisis sobre CPF en rata wistar al día 21 de administración y día 42 postcirugía donde se puede observar el cambio en la celularidad de las diferentes áreas Cg2, Cg1, M2 y M1 las cuales están íntimamente ligadas con emociones y la parte motriz del roedor.

En la figura 10 analizada después de 21 días de administración de los antidepresivos Agomelatina y fluoxetina podemos observar un aumento en la expresión del neurotransmisor dopamina tanto en el grupo Sham, Agomelatina y Fluoxetina y una disminución en la expresión de dopamina sobre los grupos que fueron sometidos a la extracción de bulbos olfatorios OBX y OBX-V, éstos datos contradicen a lo reportado por Edwuarts et al., en 1977 donde no encuentra diferencia en la presencia de dopamina en el modelo de depresión mayor en rata en CPF.

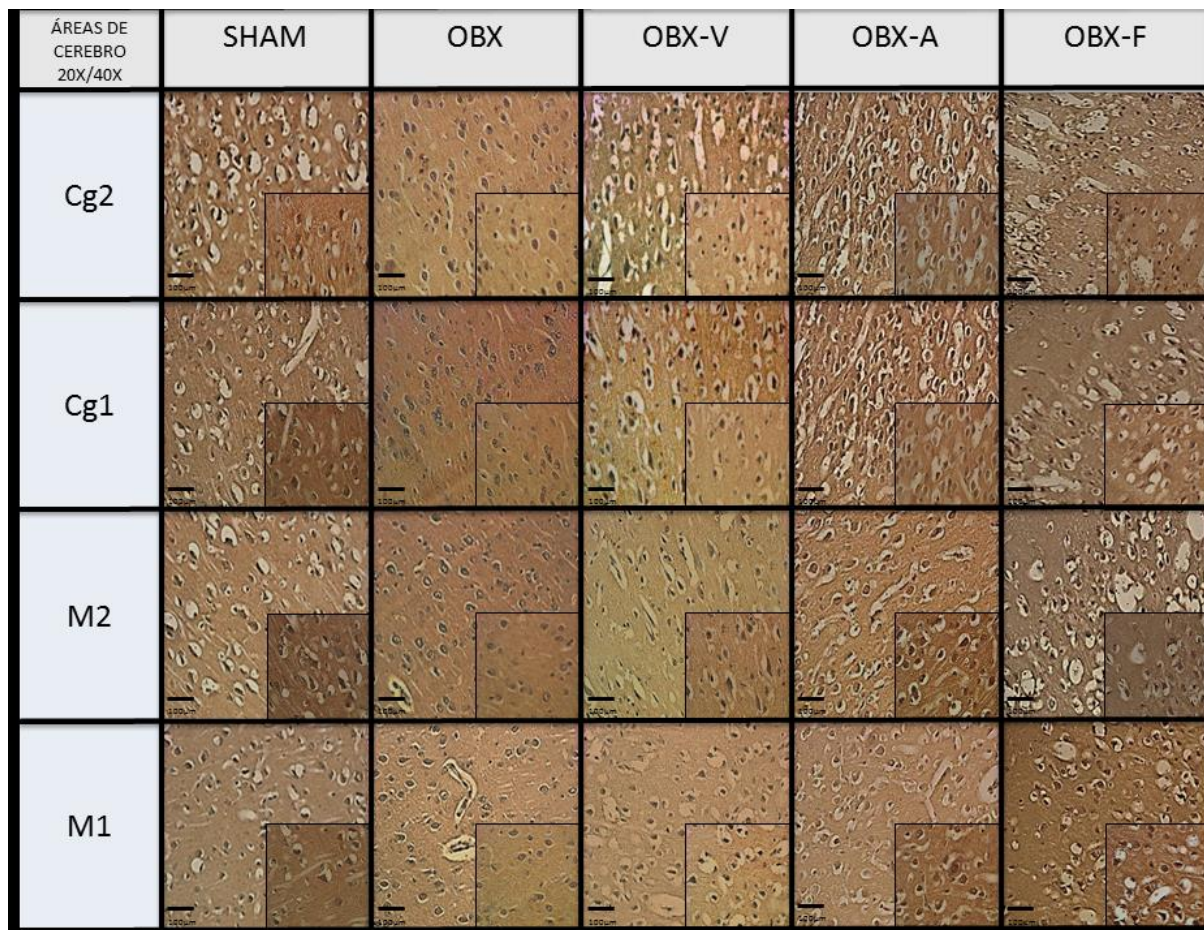


Figura 10 . Inmunohistoquímica de Dopamina en Corteza prefrontal de las áreas Cg2, Cg1, M2 y M1 sobre los grupos Sham, OBX (bulbectomía), OBX-V (bulbectomía + vehículo), OBX-A (bulbectomía + agomelatina) OBX-F (bulbectomía + Fluoxetina. barra=100 µm

Inmunohistoquímica del receptor de dopamina DRD2

Se evaluaron las diferentes áreas Cg2, Cg1, M2 y M1 de la CPF en rata wistar al día 21 de administración o día 42 postcirugía donde se puede observar el cambio de la inmunoreactividad del receptor a dopamina D2 (DRD2).

En la figura 11 se analiza el efecto de Agomelatina y fluoxetina en el que se observa un aumento en la expresión del DRD2 tanto en el grupo Sham, Agomelatina y Fluoxetina y una disminución en la expresión del mismo sobre los grupos con bulbectomía OBX y OBX-V.

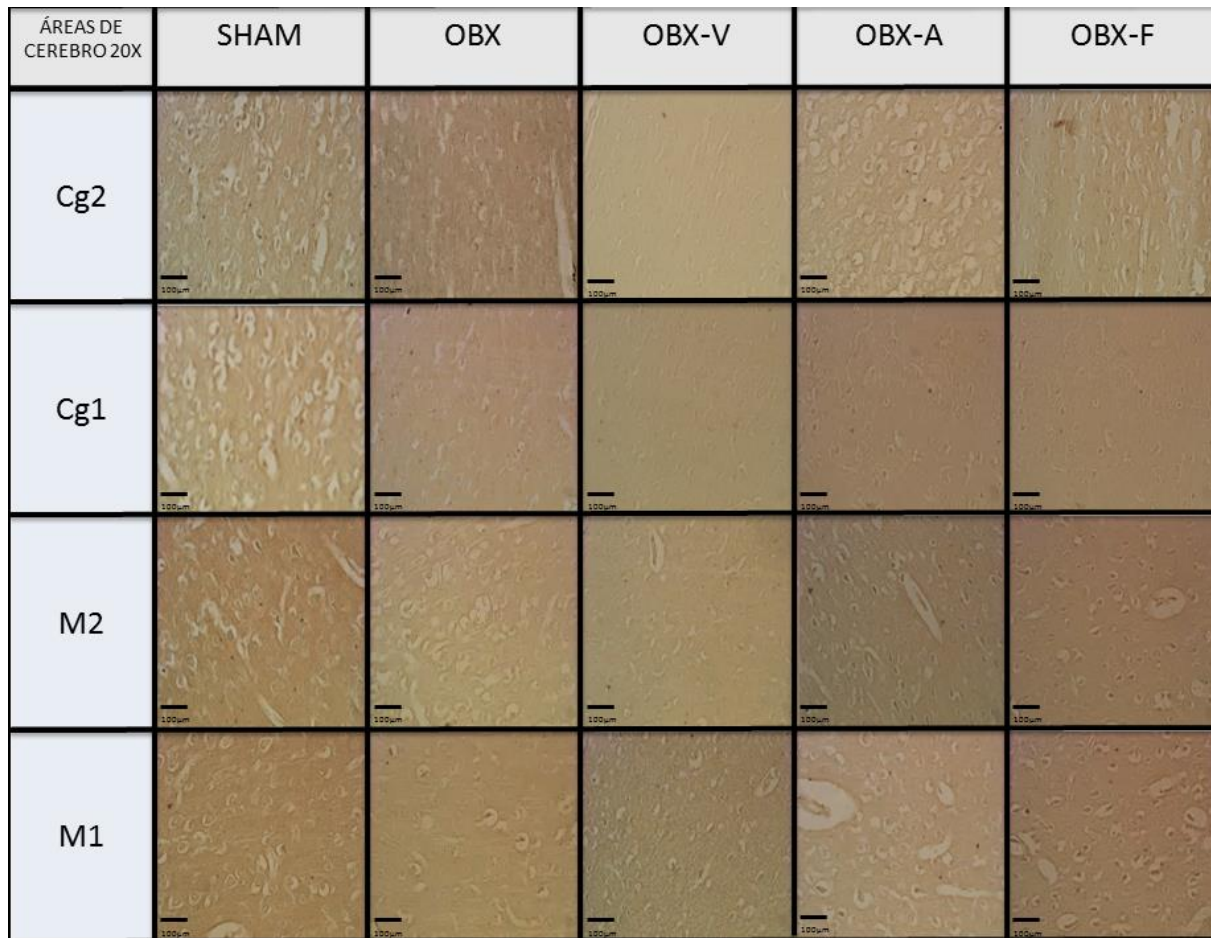


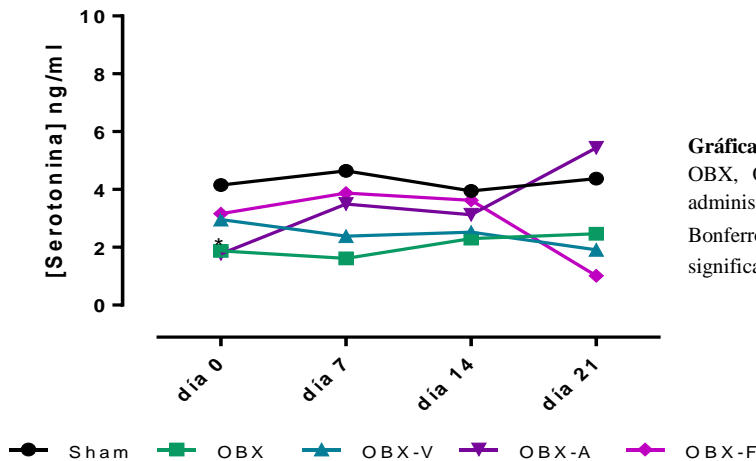
Figura 11. Inmunohistoquímica de DRD2 en Corteza prefrontal de las áreas Cg2, Cg1, M2 y M1 sobre los grupos Sham, OBX (bulbectomía), OBX-V (bulbectomía + vehículo), OBX-A (bulbectomía + agomelatina) OBX-F (bulbectomía + Fluoxetina. barra=100 μ m

Con éstos resultados se sugiere el aumento en la expresión del receptor D2 como respuesta al aumento de dopamina tras una administración prolongada ya que estudios demuestran que D2S regula los niveles de éste neurotransmisor disminuyendo la liberación de dopamina y reduce la actividad locomotora [Missale et al., 1998; Sibley, 1999]. Agonistas del D2 a bajas dosis inhiben locomoción y a altas dosis estimulan la locomoción [Beaulieu y Gainetdinov, 2011].

Determinación de serotonina mediante la técnica de ELISA

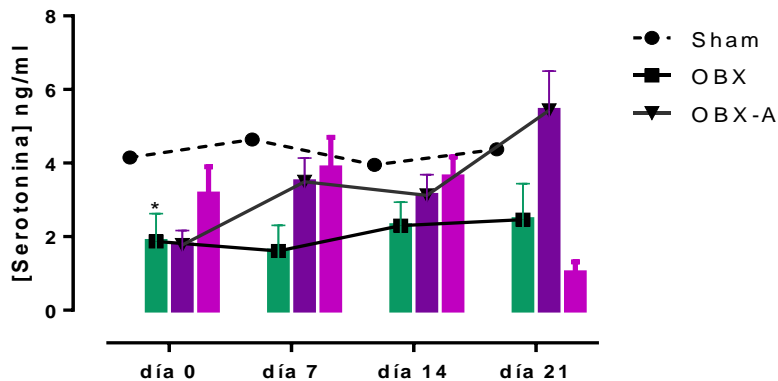
Se llevó a cabo la cuantificación de serotonina por el método de Elisa en el cuál se observa la concentración del neurotransmisor en CPF en los diferentes periodos en el cuál se administraron los antidepresivos agomelatina y fluoxetina al día inicial día 0 y después por periodos diarios de 7, 14 y 21 días según el grupo. Se presentan resultados de la evaluación llevada a cabo en 3 animales.

En los resultados parciales arrojados en la concentración de serotonina en CPF de la gráfica 35 se ven disminuidos en los animales que se sometieron a cirugía comparados con el grupo sham, por otro lado, los animales que fueron tratados con los antidepresivos especialmente fluoxetina presentan un aumento dentro desde el día 7, el aumento de serotonina para el día 14 concuerda con lo reportado por Borges 2016; sin embargo para el día 21 disminuye considerablemente su concentración la cual nos sugiere que diferentes áreas del cerebro accionan para regular ésta cantidad elevada de serotonina, estudios anteriores realizados en el laboratorio dónde se reporta un aumento en la expresión del receptor 5-HT1A en Hipocampo específicamente en el área CA1 junto con el factor AKT [Aparicio Díaz 2014] ya que éste receptor está íntimamente ligado en el proceso de regulación en la secreción serotoninérgica, se encuentra acoplado a proteína Gi la cuál a través de una serie de transducción de señales bloquea a FoXO que está implicado en procesos de proliferación, crecimiento, diferenciación y supervivencia celular y a CREB vinculado con la regulación de ritmos circadianos, y modulador universal en procesos de memoria [Polter, 2010].



Gráfica 35. Concentración de serotonina (ng/ml) de los grupos Sham, OBX, OBX-V, OBX-A y OBX-F después de los periodos de administración de los antidepresivos. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.1$, $n=3$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

La grafica 36 arroja resultados sobre el modelo de bulbectomía que concuerda con la teoría de las monoaminas en los 60's dada por Copen en la cual se ve una disminución marcada en la concentración de monoaminas principalmente serotonina, en éstos resultados tras una administración prolongada de agomelatina el neurotransmisor va a la alza y se confirma la hipótesis de éste trabajo en donde es notorio el aumento en la concentración de serotonina en corteza prefrontal después de un tratamiento crónico con agomelatina complementando lo que reportó Bodiant en 2010 donde detecta aumentos en la concentración de dopamina y noradrenalina pero no en serotonina tras la administración única de agomelatina a diferentes concentraciones en CPF; por lo que el efecto del fármaco como antidepresivo sobre los niveles de serotonina se ve reflejado 21 días después del inicio del tratamiento en el modelo de depresión mayor.



Gráfica 36 . Representación gráfica de la concentración de serotonina (ng/ml) de los grupos Sham, OBX, OBX-A y OBX-F después de los periodos de administración de los antidepresivos. ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni $p < 0.1$, $n=3$ /grupo. *diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo sham.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sobre el modelo de Depresión Mayor mediante la bulbectomía olfatoria exhiben conductas puntuales que emulan perfectamente con el comportamiento humano el cual cursa con un TDM como son reducción marcada en el peso; disminución en su aseo, episodios de ansiedad y un bajo sentido de supervivencia. Las diferentes pruebas conductuales como Nado Forzado, Luz/Oscuridad y Campo abierto nos permiten evaluar y comparar el efecto de ambos antidepresivos (Agomelatina y Fluoxetina) así establecer el tiempo de mejora en los diferentes periodos sobre el modelo de Depresión Mayor.

Los datos en el comportamiento conductual del animal se correlaciona con la decadencia neuronal en corteza prefrontal ya que en ésta área se lleva a cabo la toma de decisiones, el pensamiento y parte motriz teniendo; tras someter a los animales a una terapia con antidepresivos se observa mejoría debido al tratamiento prolongado con los antidepresivos agomelatina y fluoxetina.

En cuanto a la concentración de los neurotransmisores corroboramos la disminución de dopamina en CPF en los grupos con bulbectomía olfatoria, y la sobre expresión de éste neurotransmisor después de la administración por 21 días de ambos antidepresivos (agomelatina y fluoxetina) sugiriendo como mecanismo de regulación la expresión del receptor de Dopamina DRD2 ya que es el principal regulador de la liberación de dopamina. En cuanto a la concentración de serotonina se ve confirmamos la hipótesis planteada en el trabajo donde el fármaco de agomelatina tiene un efecto indirecto positivo sobre las concentraciones de serotonina en CPF tras una administración prolongada..

PERSPECTIVAS

El trabajo presentado sólo se enfoca al área de la corteza prefrontal por lo que se sugiere realizar RT-PCR del receptor de dopamina DRD2 involucrado en la sobre expresión de dopamina.

Es importante analizar la expresión y presencia del receptor DRD2 en otras áreas del cerebro como el área Ventral Tegmental y el Núcleo dorsal del rafe para saber cómo se encuentran regulando la liberación de neurotransmisores en las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas para elucidar mejor el efecto del antidepresivo Agomelatina

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Albert P.R. (2012). *Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness*. Phil. Trans. R. Soc. B 367, 2402–2415 (doi:10.1098/rstb.2011.0376)10.1098/rstb.2011.0376.
- [2] Aloyo V. et al (2009). *Current status of inverse agonism at serotonin 2A (5-HT2A) and 5-HT2C receptors*. Pharmacol. Ther. 121: 160–173.
- [3] American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*. Arlington (VA): American Psychiatric Association; 2013.
- [3] Aparicio V.B., (2014). *Análisis del receptor 5-HT1A en el trastorno depresivo mayor en rata*. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- [4] Apfelbach R. et al, (1999). *Selective and Reversible Reduction of Odor Sensitivity in the Rat by Concanavalin A*. *Physiol. Behav.*, 65:513-516.
- [5] Audet M. et al, (2006). *Repeated subchronic exposure to phencyclidine elicits excessive atypical grooming in rats*. *Behavioural Brain Research*. 167:103-110.
- [6] Baldwin D., Birtwistle, J. (2002). *An Atlas of Depression*. The Parthenon Publishing group. Southampton UK.
- [7] Beaulieu J.M. and Gainetdinov, RR. (2011). *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. *Pharmacol Rev*; 63: 182–217.
- [8] Benekareddy M, et al, (2010). *Enhanced Function of Prefrontal Serotonin 5-HT2 Receptors in a Rat Model of Psychiatric Vulnerability*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*; 30(36):12138-12150.
- [9] Bernard R y col. (2010). *Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression*. *Mol Psychiatry*.
- [10] Berrendero F. and Maldonado R. (2002). *Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Δ9-tetrahydrocannabinol*. *Psychopharmacology*. 163: 111-117.
- [11] Blows WT. Neurotransmitters of the brain: serotonin, noradrenaline (norepinephrine) and dopamine. **2000**. *J Neurosci Nursing*. 32:234-238.
- [12] Bockaert J et all, (2006). *Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation*. *Cell Tissue Res.*; 326(2):553–57.

- [13] Bodiant C. et al. (2010). *Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development*. Nature Reviews Drug Discovery AOP, published online.doi:10.1038/nrd3140.
- [14] Borsoi M. et al. (2014). *Repeated forced swimming impairs prepulse inhibition and alters brain-derived neurotrophic factor and astroglial parameters in rats*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 128:50-61.
- [15] Bray J.K, Goddard WA. (2008). *The structure of human serotonin 2c G-protein-coupled receptor bound to agonists and antagonists*. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 27:66–81.
- [16] Bremner J.D, Vermetten E. (2001). *Stress and development: behavioral and biological consequences*. Dev Psychopathol.; 13:473–89
- [17] Bremner, J. D. et al. (2002). *Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression*. Biol. Psychiatry 51, 273–279
- [18] Cairncross KD. et al. (1978). *Olfactory projection systems, drugs and behaviour: A review*. Psychoneuroendocrinology: 253–272.
- [19] Carpuso SA. (1997). *Deafferentation causes apoptosis in cortical sensory neurons in the adult rat*. J Neurosci 17(19):7372-84.
- [20] Carr GV, Lucki I. (2011). *The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies*. Psychopharmacology (Berl): 265–287.
- [21] Castaneda, Anu E., et al. (2008). *A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults*. Journal of affective disorders, vol. 106, no 1, p. 1-27.
- [22] Castren E. (2005). *Is mood chemistry?*. Nat Rev Neurosci.; 6:241–6.
- [23] Cárdenas J and Navarro JF. (2002). *Animal models of unconditioned anxiety*. Psiquiatría biológica. Vol.9.1.
- [24] Chenu F. et al. (2013). *Electrophysiological Effects of Repeated Administration of Agomelatine on the Dopamine, Norepinephrine, and Serotonin Systems in the Rat Brain*. Neuropsychopharmacology.38:275–284.
- [25] Crawley JN., Goodwin FK. (1980). *Preliminary report of a simple animal behavior for the anxiolytic effects of benzodiazepines*. PharmacolBiochemBehav.13:167
- [26] Connor TJ. Et al. (1999). *Stressor-induced Alteration in serotonergic activity in an animal model of depression*. Neuroreport 10,523–528.

- [27] Dennis TB. et al. (1993). *Differential effects of olfactory bulbectomy on GABA A and GABA B receptors in the rat brain*. Pharmacol. Biochem. Behav.46, 77–82.
- [28] Edwards DA. et al. (1997). *Olfactory system damage and brain catecholamines in the rat*. BrainRes.121,121–130.
- [29] Fiori LM. and Turecki G. (2012). *Broadening our horizons: Gene expression profiling to help better understand the neurobiology of suicide and depression*. Neurobiology of disease. 45: 14-22.
- [30] Grzanna R., Molliver ME. (1980). *The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation*. Neuroscience; 5: 21–40.
- [31] Germain A., Kupfer DJ. (2008). *Circadian rhythm disturbances in depression*. Hum. Psychopharmacol.23:571–585.
- [32] Guest et al. (2004). *Mechanisms of action of the antidepressants fluoxetine and the substance P antagonist L-000760735 are associated with altered neurofilaments and synaptic remodeling*. Brain Res. 1002(1-2):1-10.
- [33] Gurevich EV. et al. (1993). *Effects of bulbectomy and subsequent antidepressant treatment on brain 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors in mice*. Pharmacol. Biochem. Behav.45, 65–70.
- [34] Hale A et al. (2010). *Superior antidepressant efficacy results of agomelatine versus fluoxetine in severe MDD patients: a randomized, double-blind study*. Psicofarmacología Clínica Internacional:305-314.
- [35] Hirschfeld MD and Robert MA. (2012). *The Epidemiology of Depression and the Evolution of Treatment*. J Clin Psychiatry .73(suppl 1):5-9
- [36] Jancsar, S.M and Leonard BE. (1984). *Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 8,263–269.
- [37] Jarosik J et al. (2007). *Antidepressant-mediated reversal of abnormal behavior and neurodegeneration in mice following olfactory bulbectomy*. Exp Neurol. 204(1):20-8
- [38] Jindal A. et al. (2015). *Type 4 phosphodiesterase enzyme inhibitor, rolipram rescues behavioral deficits in olfactory bulbectomy models of depression: involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cAMP signaling aspects and antioxidant defense system*. Pharmacol Biochem Behav. 132:20-32.
- [39] Kaalund, SS., et al. (2014). *"Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain"*. Molecular psychiatry: 19.12 1258-1266.

- [40] Kelly JP. Et al. (1997). *The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update.* Pharmacol Ther.74(3):299-316.
- [41] Kim S. y Webster MJ. (2010a). *Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders.* Mol Psychiatry; 15(3):326-36.
- [42] Kores B. (2010a). *Efficacy and tolerability of agomelatine in the treatment of depression.* Patient Preference and adherence.: 8.
- [43] Kraemer S. and Apfelbach R. (2004). *Olfactory sensitivity, learning and cognition in young adult and aged male Wistar rats.* Physiology & Behavior.81: 435-442.
- [44] Kupfer J et al. (2012). *Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives.* The Lancet, vol. 379, no 9820, p. 1045-1055.
- [45] Lambe E et al. (2010). *Serotonin induces EPSCs preferentially in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex in the rat Cereb Cortex,* 10, pp. 974–980
- [46] Larue C. (1975). *Comparison of the effects of anosmia induced by either peripheral lesion or bulbectomy upon the feeding pattern of the rat.* J. Physiol. (Paris)70,299–306.
- [47] Larsson, K.. (1975). *Sexual impairment of inexperienced male rats following pre-and postpuberal olfactory bulbectomy.* Physiol.Behav.14, 195–199.
- [48] Lawrwnce NS., et al. (2004). *Subcortical and ventral prefrontal cortical neural responses to facial expressions distinguish patients with bipolar disorder and major depression.* Biological psychiatry, vol. 55, no 6, p. 578-587.
- [49] Leung, PM et al. (1972). *Food intake and preference of olfactory bulbectomized rats fed amino acid imbalanced or deficient diets.* Physiol. Behav, 9, 553–557.
- [50] MacQueen, G. M. et al. (2003). *Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression.* Proc. Natl Acad. Sci. USA 100.1387–1392
- [51] Machado DG., et al. (2012). *Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy.* El servier. 103: 220-229.
- [52] El Mansari M., et al. (2010). *Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder.* CNS Neurosci Ther, 16: e1–17.
- [53] *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (2002). DSM-IV-TR.* Barcelona: Masson.

- [54] Marazziti D. et al. (2010). *Cognitive impairment in major depression*. Eur. J. Pharmacol. 626:83–86.
- [55] Millan MJ. (2003). *Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies*. *Thérapie* 60:441–460.
- [56] Millan MJ et al.(2003).*Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents*. *J Psychopharmacol.* 14: 114-138.
- [57] Missale C et al. (1998). *Dopamine receptors: from structure to function*. *Physiol Rev.* 78: 189–225.
- [58] Morales JC et al. (2013). *Olfactory bulbectomy induces neuronal rearrangement in the entorhinal cortex in the rat*. *Journal of chemical neuroanatomy*. vol. 52, p. 80-86.
- [59] Morales JC et al. (2017). *The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: the hippocampal pathway* *Behavioural Brain Research.* 317:562-575
- [60] Morrissette DA, Stahl SM. (2014). *Modulating the serotonin system in the treatment of major depressive disorder*. *CNS Spectrums.*19: 54-68.
- [61] Mostafa EM., et al. (2015). *Restoration of Serotonin Neuronal Firing Following Long-Term Administration of Bupropion but Not Paroxetine in Olfactory Bulbectomized Rats*. *Neuropsychopharmacology.*18: (4): pyu050.
- [62] Musacchio JM (2013). *Chapter 1: Enzymes involved in the biosynthesis and degradation of catecholamines*. In Iverson L. *Biochemistry of Biogenic Amines*. Springer. pp. 1–35. ISBN 1-4684-3171-4.
- [63] Negoias s. et al.(2010). *Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression*, *Neuroscience.* 169(1) 415-21.
- [64] NI YG y Miledi R. (1997). *Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac)*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*. 94 (5) :2036-40.
- [65] Norman TR., et al. (2012). *Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats: a comparison to melatonin and to the 5-HT(2c) antagonist, S32006*. *Eur J Pharmacol.* 674(1):27-32.
- [66] Organización Mundial de la Salud. *La Depresión*. Recuperado el 30 de septiembre de 2016. Nota descriptiva N° 369: <http://158.232.12.119/mediacentre/factsheets/fs369/es/>.
- [67] Paxinos G and Charles W. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*.Elsevier.

- [68] Pollak, EI y Sachs BD. (1975). *Male copulatory behavior and female maternal behavior in neonatally bulbectomized rats*. *Physiol.Behav.*14,337–343.
- [69] Polter AM, (2010). *5-HT1A Receptor-Regulated Signal Transduction Pathways in Brain*. *Cellular signalling*; 22(10):1406-1412. doi:10.1016/j.cellsig.2010.03.019.
- [70] Pompili M et al. (2013). *Agomelatine, a novel intriguing antidepressant option enhancing neuroplasticity: A critical review*. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 14.6:412-431.
- [64] Porsolt RD et al. (1977) *Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments*. *Nature*. 266:730–2.
- [71] Prut L, Belzung C. (2003). *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review*. *Eur. J. Pharmacol*. 463. pp. 3–33.
- [72] Qiao H et al. (2014). *Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression*. *Behav Brain Res* 275:191-200.
- [73] Raymond JR et al. (2001). *Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction*. *Pharmacol Ther.*;92(2-3):179–212.
- [74] Redmond AM. Et al. (1997). *Behavioural and neurochemical effects of dizocilpine in the olfactory bulbectomized rat model of depression*. *Pharmacol. Biochem.Behav.*58,355–359.
- [75] Rinwa P et al., (2013). *Suppression of neuroinflammatory and apoptotic signaling cascade by curcumin alone and in combination with piperine in rat model of olfactory bulbectomy induced depression*. *PLoS One*.8(4):e61052.
- [76] Roche M, Harkin A, Kelly JP. (2007). *Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat*. *Neuropsychopharmacology*; 32:1312–20.
- [77] Robbins TW, Roberts A C. (2007). *Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine*. *Cerebral Cortex*, 17(suppl 1),151-i160.
- [78] Sangdun Choi. (2012). *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer. 12-19. DOI: 10.1007/978-1-4419-0461-4_55.
- [79] Sato N et al. (1974). *Sexual maturation in bulbectomized female rats*. *J.Reprod.Fertil.*36,301–309.
- [80] Schwartz E y Rowe FA. (1976) *Olfactory bulbectomy: influences on maternal behavior in primiparous and multiparous rats*. *Physiol.Behav.*17,879–883.

- [81] Sequeira et al. (2009). *Global Brain Gene Expression Analysis Links Glutamatergic and GABAergic Alterations to Suicide and Major Depression*. PLoS ONE;4(8):e6585.
- [82] Sibley DR. (1999). *New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 39: 313–41.
- [83] Song C and Leonard BE (2005). *The olfactory bulbectomized rat as a model of depression*. Neurosci Biobehav Rev; 29(4-5):627-47.
- [84] Srinivasan V et al. (2012). *Role of melatonin in mood disorders and the antidepressant effects of agomelatine*. Expert Opin. Investig. Drugs. 21:1503–1522.
- [85] Staal JA, Vickers JC. (2011). *Selective vulnerability of non-myelinated axons to stretch injury in an in vitro co-culture system*. J Neurotrauma. 28(5):841-7. doi: 10.1089/neu.2010.1658
- [86] Tasset I et al. (2010). *Olfactory bulbectomy induced oxidative and cell damage in rat: protective effect of melatonin*. Physiol Res 59: 105-112.
- [87] Thomas JB. (1973). *Some behavioral effects of olfactory bulb damage in the rat*. J. Comp. Physiol. Psychol. 83, 140–148.
- [88] Ungless MA. (2004). *Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli*. Science 303: 2040–2042.
- [89] Van Riezen H et al. (1976). *Behavioural changes following olfactory bulbectomy in rats: a possible model for the detection of antidepressant drugs [proceedings]*. Br. J. Pharmacol. 57, 426P–427P.
- [90] Van der Stelt HM . *Permanent deficits in serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study*. Biol . Psychiatry 57, 1061–1067.
- [91] Vertes RP. (2004). *Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat*. Synapse. 51: 32-58.
- [92] Vincenzo M. et al. (2001). *Role of 5-HT_{2C} receptors in the control of central dopamine function*. TRENDS in Pharmacological Sciences. Vol. 22 No. 5.
- [93] Walther DJ. et al. (2003). *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. Science; 299(5603): 76
- [94] Willner P et al. (2005). *Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients*. J Affect Disord 86:37–45.

[95] Wolf B, Buckwalter JA. (2006) *Randomized surgical trials and “sham” surgery: relevance to modern orthopaedics and minimally invasive surgery*. The Iowa Orthopaedic Journal. 26: 107-112.

[96] Wrynn, A. et al. (2000). *An in-vivo magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression*. Brain Res. 879: 193–199

[97] Xu C et al. (2016). *Orbitofrontal cortex 5-HT_{2A} receptor mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors and alterations of spine density and Kalirin7*. Neuropharmacology. 211:35-42.

ANEXOS

Materiales y Reactivos

ANÁLISIS	ESPECIFICACIONES
<i>Peso</i>	Balanza rango de 1-1500g
<i>Temperatura</i>	Termómetro digital Sejoy rango 30-42°C
<i>Material de vidrio</i>	Pyrex, portaobjetos y cubreobjetos
<i>Balanza analítica</i>	Precisa, Modelo XT220A
<i>Parrilla con agitación</i>	Thermolyne SP-131325, con 10 niveles de calentamiento
<i>Potenciómetro</i>	Conductronic modelo 100H
<i>Estereotáxico</i>	Biogen base en U
<i>Taladro</i>	Dremel modelo 7700
<i>Esponja quirúrgica</i>	Gelfoam 10x8x0.8cm
<i>Jeringas</i>	Insulina, 3 y 5ml,
<i>Materiales varios</i>	Sanitas, algodón, isopos, guantes de nitrilo, cubrebocas
<i>Material quirúrgico</i>	De acero inoxidable, pinzas de microcirugía, tijeras, navajas tipo industrial, suturas
<i>Soluciones</i>	Benzal, PBS 1X, alcohol, clorhexidina, anestésico(Ketamina/Xilacina), formalina 4%, H ₂ O ₂
<i>Antidepresivos</i>	Fluoxetina (Indozul/Degort's) Agomelatina (Valdoxa/Servier)
<i>Micropipetas</i>	Gilson/Eppendorff 20, 100, 200, 1000µl
<i>Microtomo</i>	Microm HM310
<i>Vibratomo</i>	Leica VT1000s
<i>Alimento</i>	5001 para rata, galletas chokis gamesa
<i>Parafina</i>	Paraplast Leica

Clasificación de Depresión de la American Psychiatric Association,

El DSM-IV publicado en el 2002 sigue siendo utilizado debido a la controversia que todavía existe con el nuevo DSM-V sobre la clasificación de los desórdenes mentales que incluyen al Trastorno de depresión Mayor.

En el 2013 se publicó la quinta edición del DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) la cual divide la anterior clasificación de “trastornos del estado de ánimo” en “trastornos depresivos” y “trastornos bipolares”. El DSM-5 no introduce cambios significativos respecto a los criterios diagnósticos del DSMIV- TR para el episodio de depresión mayor excepto de las modificaciones y especificaciones para describir el estado clínico del paciente. La característica esencial continúa siendo un período de al menos 2 semanas consecutivas en el que la persona manifiesta un mínimo de 5 síntomas de los cuales al menos 1 tiene que ser estado de ánimo depresivo y/o disminución del interés o placer. El cuadro depresivo mayor puede dividirse en leve, moderado y severo.

Criterios diagnósticos de trastorno de depresión mayor según DSM-5

- A. Cinco (o más) de los síntomas siguientes han estado presentes durante el mismo período de dos semanas y representan un cambio de funcionamiento previo; al menos uno de los síntomas es (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o de placer.
- (1) Estado de ánimo deprimido la mayor parte del día, casi todos los días, según se desprende de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas.
 - (2) Disminución importante del interés o el placer por todas o casi todas las actividades la mayor parte del día, casi todos los días (como se desprende de la información subjetiva o de la observación)
 - (3) Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso, o disminución del apetito casi todos los días
 - (4) Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
 - (5) Agitación o retraso psicomotor casi todos los días.
 - (6) Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.
 - (7) Sentimiento de inutilidad o culpabilidad excesiva o inapropiada (que puede ser delirante) casi todos los días (no simplemente el autorreproche o culpa por estar enfermo).
 - (8) Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o para tomar decisiones, casi todos los días (a partir de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas).
 - (9) Pensamientos de muerte recurrentes (no solo miedo a morir), ideas suicidas recurrentes sin un plan determinado, intento de suicidio o un plan específico para llevarlo a cabo.

- | |
|--|
| B. Los síntomas causan malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento. |
| C. El episodio no se puede atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia o de otra afección médica. |
| D. El episodio de depresión mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, u otro trastorno especificado o no especificado del espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos. |
| E. Nunca ha habido un episodio maníaco o hipomaníaco. |

Los cambios ejecutados sobre éste punto son los siguientes:

- Una reacción o proceso de duelo no excluye la existencia de un episodio depresivo mayor, indicando la conveniencia de valorar la presencia de depresión mayor además de la respuesta normal a una pérdida significativa.
- Se introduce el especificador “con características mixtas” que identifica los cuadros en los que coexisten síntomas depresivos con al menos 3 síntomas maníacos/hipomaníacos de un listado de 7. No obstante, las personas cuyos síntomas reúnan los criterios de manía o hipomanía, tendrán el diagnóstico de trastorno bipolar I o trastorno bipolar II, respectivamente.
- Otro especificador nuevo hace referencia a los cuadros de depresión mayor que cursan con síntomas ansiosos, en este caso la presencia de al menos 2 síntomas de ansiedad de un listado de 5 hacen a la persona tributaria del especificador “con ansiedad”.
- Se cambia la especificación “de inicio en el postparto” por la de “con inicio en el periparto” ampliándose la posible presencia de un cuadro de depresión mayor a la etapa de embarazo, además de las primeras 4 semanas del postparto contempladas anteriormente.
- Se traslada la especificación de “crónico” del trastorno depresivo mayor a los trastornos depresivos persistentes (distimia), de modo que, además de la distimia, se contempla la posibilidad de un trastorno depresivo mayor crónico o con episodios intermitentes, excluyéndose la exigencia que planteaba el DSM-IV-TR de que la persona no hubiese sufrido un episodio depresivo mayor durante los 2 primeros años de la alteración.

Técnica Inclusión en Parafina (CPF de rata)

Las muestras (cerebro de rata wistar) se conservaron en formalina al 4% a temperatura ambiente hasta su análisis mínimo 7 días en la solución.

-PBS 1X 1hr

-PBS 1X 1hr

-Alcohol 70% 1hr

-Alcohol 80% 1hr

-Alcohol 1 - 96% 1hr

-Alcohol 2 - 96% 1hr

-Alcohol 100% 1hr

-Xilol – Alcohol 1hr

- Xilol 1 1hr

- Xilol 2 1hr

-Parafina - Xilol 1hr

-Parafina 1 1hr (baño María por debajo de 55°C)

-Parafina 2 1hr (baño María por debajo de 55°C)

Inclusión:

Se coloca el tejido en los moldes, se vierte la parafina y se coloca la cnastilla (se deja enfriar de preferencia en placas congeladas).

Fundamento:

La técnica que consiste en deshidratar una pieza de tejido para posteriormente sumergirla en parafina líquida penetrando en el tejido para darle estabilidad (limpieza y dureza) además de conservar la forma del tejido y disposición espacial de las células.

Tinción de Hematoxilina-eosina

Una vez obtenidos los cortes en los portaobjetos se lleva a cabo la desparafinación:

-Derretir la parafina durante 30 min. en estufa a 65°C

-Xilol 1: 10 min.

-Xilol 2: 15 baños

-Xilol-alcohol: 15 baños

Acohol 100% 1: 15 baños

Acohol 100% 2: 15 baños

Alcohol 96% 1: 15 baños

Alcohol 96% 2: 15 baños

Hidratar en lo que se traslada para colocarla en el colorante

Hematoxilina de Harris 5 min.

Agua de llave: enjuagar

Carbonato de Litio: 1 baño

Agua destilada: 2,3 baños

Eosina: 40 seg

Agua destilada: enjuagar

Comienza el proceso de deshidratación:

Alcohol 96% 2: 15 baños

Alcohol 96% 1: 15 baños

Acohol 100% 2: 15 baños

Acohol 100% 1: 15 baños

-Xilol-alcohol: 15 baños

-Xilol 2: 15 baños

-Xilol 1: 15 baños

-Colocar sin dejar secar resina sintética Entellan y cubrir objetos.

-Secar y limpiar

Fundamento:

La tinción se realiza para ver la estructura completa de la célula que consta del citoplasma y núcleos en un contraste colorimétrico.

La eosina es un colorante ácido $\text{Na}^+ \text{Anilina}^-$ se une a los componentes del medio a través interacciones electrostáticas sobre los grupos amino ionizados de las proteínas como filamentos. Por otro lado la hematoxilina posee propiedades semejantes a las anilinas básicas los cuales reaccionan con los grupos aniónicos como los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), grupos sulfato de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilo de las proteínas la reacción de éstos grupos varía según el pH.

Inmunohistoquímicas

Laminillas silanizadas con Tejido 5 micras.

Colocar en estufa 30 min. A 60°C

Desparafinación

Xilol 1-----10 min.

Xilol 2-----15 baños

Alcohol-xilol-----15 baños

Alcohol 100 % 1-----15 baños

Alcohol 100 % 2-----15 baños

Alcohol 96% 1-----15 baños

Alcohol 96% 2-----15 baños

3 lavados con PBS

Recuperación del antígeno

Diva de cloacker dilución 1:10 en agua destilada 40 min a 60°C

Enfriar a temperatura ambiente 10-20 minutos

Inactivación de peroxidasa endógena H₂O₂ 0.3% (10 min)

3 lavados. PBS

Bloqueo con albúmina libre de IgG al 2% horas

Zonas hidrófobas/diluir con SSI 0.9% 50 microlitros a temperatura ambiente

Anticuerpo primario diluidos en azida de sodio 0.1% incubado a 4°C por un tiempo dependiendo cada antígeno.

3 lavados con PBS

Anticuerpo secundario 2 horas temperatura ambiente

3 lavados con PBS

Revelar con DAB (diaminobencidina)

Solución de DAB A 50 microlitros 5 minutos

Solución de DAB B 50 microlitros al vire

3 lavados con PBS

Si se hace contratinción con hematoxilina agregar después de la hematoxilina carbonato de Litio 1% al vire.

3 lavados con PBS

Deshidratación

Alcohol 96 % 2-----15 lavados

Alcohol 96 % 1-----15 lavados

Alcohol 100 % 2-----15 lavados

Alcohol 100 % 1-----15. lavados

Alcohol-xilol-----15 lavados

Xilol 2-----15 lavados

Xilol 1-----dejar hasta montar

Montar con resina.



PRODUCT DATA SHEET

Dopamine polyclonal antibody

BML-DA1140

Product Number/Sizes

BML-DA1140-0100	100 µl
BML-DA1140-0025	25 µl

Product Specifications

HOST:	Rabbit
IMMUNOGEN:	Dopamine.
SPECIES REACTIVITY:	Species independent
APPLICATIONS:	ELISA, IHC
FORMULATION:	Liquid. Antiserum containing 0.1% sodium azide.
SHIPPING:	Shipped on Blue Ice
LONG TERM STORAGE:	-20°C

Revised 26-Jul-16

Physical State: Freeze-dried powder

Storage:

Store freeze-dried powder at 2-8°C. When ready to use, rehydrate with indicated volume of d. water and centrifuge if not clear. Product is stable for about 6 weeks at 2-8°C as an undiluted liquid. Prepare working dilution fresh each day. For extended storage after rehydration, add an equal volume of glycerol (ACS grade or better) for a final concentration of 50%, and store at -20°C as a liquid. Note: after the addition of glycerol, the concentration of protein and buffer salts is one-half of the original. Alternatively, aliquot and freeze the product at -70°C or below in the absence of glycerol. Avoid repeated freezing and thawing. Expiration date: one year from date of rehydration. However, the expiration date may be extended if the product is stored according to the recommendation and the test results are acceptable for its intended use.

Purity: The antibody was purified from antisera by immunoaffinity chromatography using antigens coupled to agarose beads.

Buffer: 0.01M Sodium Phosphate, 0.25M NaCl, pH 7.6

Stabilizer: 15 mg/ml Bovine Serum Albumin (IgG-Free, Protease-Free)

Preservative: None (Warning: Use of sodium azide as a preservative will substantially inhibit the enzyme activity of horseradish peroxidase.)

Suggested Working Concentration or Dilution Range:

ELISA:- 1:5,000-1:100,000

Western Blot- 1:5,000-1:100,000 (non-ECL) / 1:10,000-1:200,000 (ECL)

Histo-/Cyto-Chemistry:- 1:500-1:5,000

Dilution factors are presented in the form of a range because the optimal dilution is a function of many factors, such as antigen density, permeability, etc. The actual dilution used must be determined empirically.

DetECCIÓN DE SEROTONINA POR EL MÉTODO DE ELISA

Preparación del tejido de corteza prefrontal

Se realiza el homogenado del tejido 50 mg de tejido / 250 microlitros PBS 1X. Homogenizar con hielo seco, dos ciclos de congelación/descongelación, para romper las membranas celulares. Centrifugar a 15 minutos 1500 x g (o 5000 rpm). Remover el sobre nadante y realizar el ensayo. Almacenar a -20°C y -80°C.

Procedimiento

Determinar número de pozos para usar.

Eliminar los pozos que no son necesarios para el ensayo, regresarlos con el desecante y sellar, almacenar 4°C.

- 1.- Pipetear 150 microlitros de buffer de ensayo dentro de los pozos (enlaces no específicos).
- 2.- Pipetear 100 microlitros de buffer de ensayo dentro de los pozos (0ng/ml standar).
- 3.- Pipetear 100 microlitros de Standar #1 al #6 en los pozos (hasta el fondo).
- 4.- Pipetear 100 microlitros de las muestras en cada pozo, del #1 al #6.
- 5.- Pipetear 50 microlitros del conjugado dentro de cada pozo excepto TA y el blanco.
- 6.- Pipetear 50 microlitros del anticuerpo en cada pozo, excepto el blanco, TA y NSB.
- 7.- Sellar la placa. Incubar por dos horas, mezclar vibradora 500rpm a temperatura ambiente.
- 8.- Vaciar los contenidos de los pozos, y lavar con 400 microlitros del buffer. En cada pozo tres lavados. Vaciar bien los pozos y golpear la placa sobre una servilleta para quitar los residuos del buffer de lavado.
- 9.- Pipetear 5 microlitros del conjugado (diluido 1:20) a los TA.
- 10.- Agregar 200 microlitros de la solución con el sustrato en cada pozo.
- 11.- Incubar por una hora a temperatura ambiente, mezclando.

12.- Pipetear 50 microlitros de la solución de paro en cada pozo.

13.- Después de blanquear leer contra el blanco (sustrato) a 405 nm. Si la lectura del plato no se ajusta al blanco se puede leer manualmente densidad óptica del blanco del sustrato de las Reacciones.



PRODUCT DATA SHEET

Serotonin ELISA kit

ADI-900-175

Easy-to-use, well-validated serotonin ELISA kit for hormone research.

Product Number/Sizes

ADI-900-175

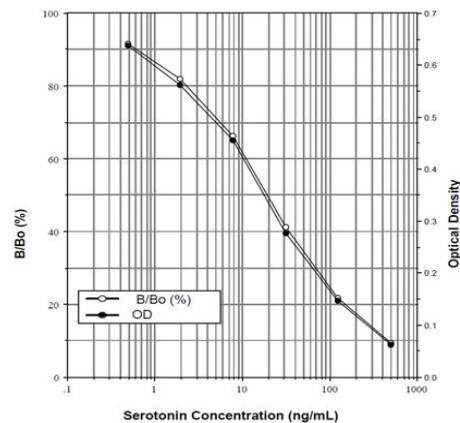
96 wells

- Highly sensitive measurement of serotonin, detecting as little as 0.293 ng/ml
- No acylation required for standards and samples
- Thoroughly validated in multiple complex sample matrices
- High throughput format with results in just 3 hours for up to 39 samples in duplicate
- Fully quantitative results that surpass semi-quantitative Western blot analysis

The Serotonin EIA kit is a colorimetric competitive enzyme immunoassay kit with results in 3 hours.

Product Specifications

ALTERNATIVE NAME:	5-HT, 5-hydroxytryptamine
SENSITIVITY:	0.293 ng/ml (range 0.49 - 500 ng/ml)
ASSAY TIME:	3 hours
APPLICATIONS:	ELISA, Colorimetric detection
APPLICATION NOTES:	For the quantitative determination of Serotonin in platelets, plasma, serum, and urine from any species. Cited sample type includes culture supernatant.
SPECIES REACTIVITY:	Species Independent
CROSSREACTIVITY:	N-acetyl serotonin (17%), 5-hydroxy-L-tryptophan (0.4%), Tryptamine (0.1%), 5-hydroxyindoleacetic acid (0.03%), Melatonin (0.01%), Tyramine (-0.004%), Tryptophan (-0.004%)
USE/STABILITY:	Store all components at +4°; except antibody, standard, conjugate at -20°.
SHIPPING:	Shipped on Blue Ice
KIT/SET CONTAINS:	GxR IgG Microtiter plate, Conjugate, Antibody, Assay buffer, Wash buffer concentrate, Standard, pNpp Substrate, Stop solution
SCIENTIFIC BACKGROUND:	Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a monoamine found in the central nervous system, gastrointestinal tract, and blood with broad physiological functions in neurotransmission, gastric motility, hemostasis, and cardiovascular integrity. Seven subclasses (5-HT 1-7) of serotonin receptors have been identified, a majority of which are members of the seven transmembrane domain-containing GPCR family, and are the target of several anti-depressant drugs. The 5-HT1 subclass consists of five highly homologous receptors that couple via G(i/o) alpha subunits to inhibit adenylyl cyclase activity. 5-HT1A expression in mammals is strongest in CNS limbic pathways that control emotion, including tissue of the hippocampus, dorsal raphe, and septum.



Pruebas Conductuales

Discriminación olfatoria

Para ésta prueba se utilizó una caja de plástico semitransparente con las medidas 34cm de largo x 27cm de ancho y 22cm de altura, tras un ayuno prolongado de 12 horas se expuso a cada animal al estímulo oloroso ya que se colocaron 2 galletas de chispas de chocolate (chokis- gamesa) en esquinas opuestas escondidas debajo de una capa de aserrín en la base de la caja (25g aprox.) se grabó durante 5 minutos tomando el tiempo en que tardaba el animal en encontrar a la primera galleta. Ésta prueba se realizó entre 7:00am-8:30am.

Luz Oscuridad

Con lo reportado inicialmente por Crawley y Goodwin en 1980 inicialmente usado con ratones se realizan modificaciones, el aparato fabricado de cartón utilizado es completamente negro tanto por dentro como por fuera con medidas 50cm de largo x 32cm de ancho y 25cm de altura, se dividió a la mitad donde una zona estaba en completa oscuridad y la otra quedaba al descubierto para ser iluminada con una lámpara de leds, ambas áreas se conectan a través de una puerta; la prueba tuvo una duración de 4 min. Donde se evaluó el tiempo de latencia, Tiempo total en el área oscura y el número de entradas que realizaba el animal. Éste análisis se llevó a cabo entre las 7:30am -9:00am.

Campo abierto

Ésta prueba es una de las más antiguas y mayormente reportadas debido a su fácil evaluación, utilizada por Hall en 1960 la prueba se lleva a cabo en un dispositivo cúbico de madera con medidas de 60cm de largo x 60cm de ancho y 60 cm de alto donde la base se divide en 3 cuadrantes de 20cm x 20cm. La prueba consiste en colocar al animal en el cuadrante medio y evaluar la conducta horizontal (número de cuadros visitados), vertical (número de erguidos), acicalamientos y conducta estática >3segundos, grabando durante 5 min. Se evaluó entre 8:30am-9:30am.

Nado Forzado

La prueba modificada del protocolo inicial de Porsolt en 1977 consta de un cilindro de acrílico el cual es transparente y nos permite observar ampliamente el movimiento del animal cuando es expuesto al evento adverso. La duración de la prueba consta de un solo periodo de 10min donde el animal es colocado en el cilindro llenado hasta 40cm de su capacidad manteniendo una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en la que se estima el tiempo total de nado, tiempo total de inmovilidad, tiempo de lucha o escalamiento (struggling/climbing). El estudio fue hecho entre las 11:00am – 1:00pm.

INTERACCIÓN DE SEROTONINA Y FÁRMACOS ANTAGONISTAS FRENTE AL RECEPTOR DE SEROTONINA (5- HIDROXITRIPTAMINA 2C) Y EL ANÁLISIS DE AGOMELATINA Y FLUOXETINA.

La serotonina es un neurotransmisor el cuál se sintetiza en la célula a partir de L-Triptófano observado en torrente sanguíneo, pertenece a la familia de las indol aminas, su estructura se basa en una amina aromática compuesta por un anillo indol hidroxilado en la posición 5 y una cadena lateral etilamino. Dado que la indolamina no puede cruzar la barrera hematoencefálica, toda la serotonina neuronal del sistema nervioso central se sintetiza localmente, también se ha observado presencia de serotonina en plaquetas.

La serotonina es degradada por monoaminooxidasas transformándolas en 5-hidroxiindolacético en el espacio intersináptico.

La manera en como las neuronas se comunican es a través de neurotransmisores que son liberados al espacio extracelular para interactuar con receptores de las neuronas post sinápticas. Existen 7 familias de receptores de serotonina acoplados a la proteína G, donde 5-HT₃ es la excepción, la familia 5-HT₁ tiene 5 subtipos A, B, D, E, F; 5-HT₂ tiene 3 subtipos A, B, C, completando 13 receptores diferentes. Los autorreceptores son 5-HT_{1A} y 1B.

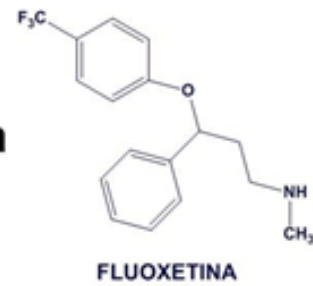
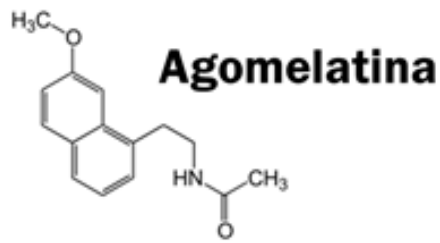
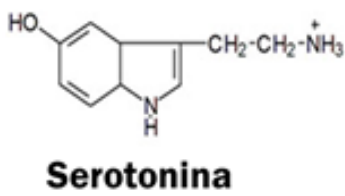
Estructura química de la serotonina y los fármacos antagonistas Agomelatina y Fluoxetina.

Los grupos funcionales en la **serotonina** 5-hidroxitriptamina se observan con una carga positiva en su compuesto amino primaria, una carga parcial negativa en el NH del anillo y una carga parcial negativa en el grupo Hidroxilo los cuales ayudan a las interacciones con el receptor.

La **agomelatina** N-[2- (7-metoxinaftalen-1-il) etil]acetamida donde el compuesto metoxinaftalen presenta propiedades hidrófobas posee poca reactividad lo que hace estable ésta parte (C-O), en la parte de la acetamida el estado de la amina secundaria tiene una carga parcial positiva, mientras que el oxígeno del carbonilo tiene una carga parcial negativa formando un dipolo eléctrico.

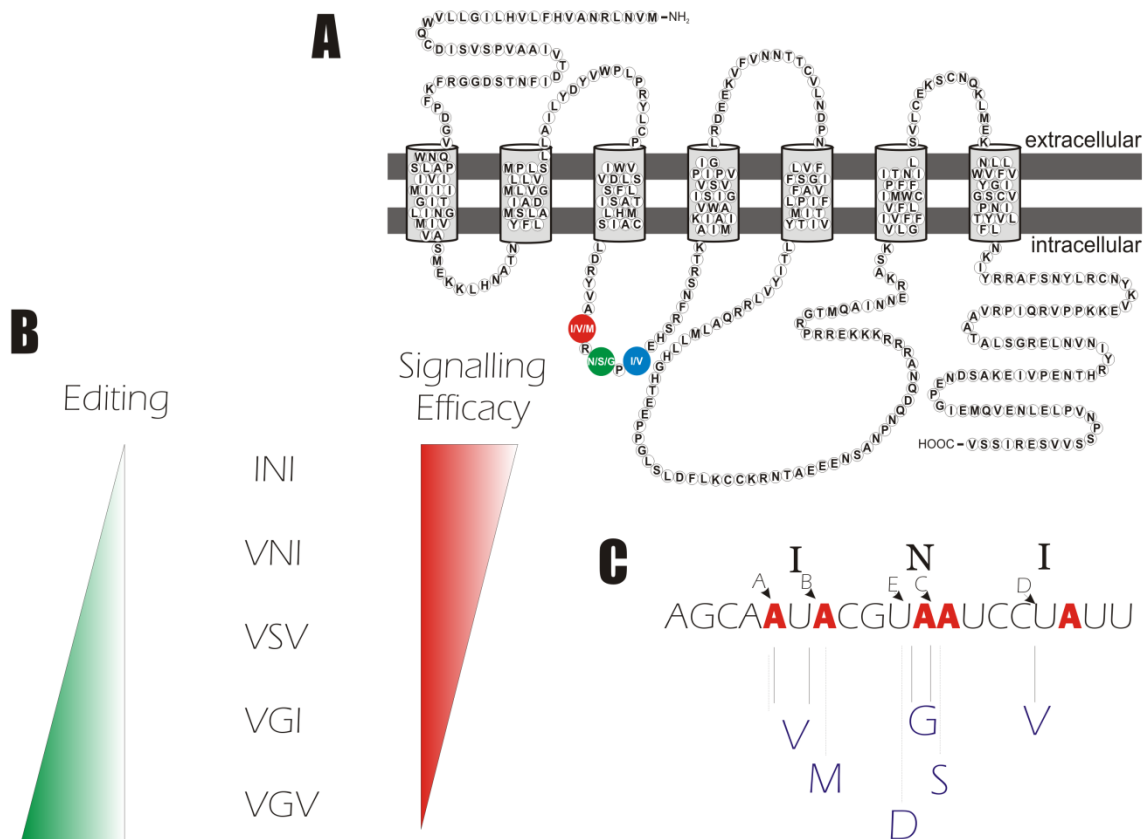
La **fluoxetina** N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propan-1-amina el trifluorometil tiene como característica una fuerte electronegatividad debido a los 3 fluoruros que están como sustituyentes en compuestos que frecuentemente son ácidos fuertes, con respecto al fenoxi se observa una carga parcial negativa sobre el oxígeno y en el N de la amina se observa una carga formal positiva.

No sea esclarecido la forma de interacción específica de los antagonistas agomelatina y fluoxetina frente al receptor 5-HT_{2C}, sin embargo mediante su estructura y el análisis de otros compuestos estudiados se pueden inferir los sitios de contacto que producen el efecto antagónico.



Análisis de la estructura del receptor transmembranal.

La secuencia de aminoácidos del receptor 5-HT_{2C} donde el extremo amino terminal se encuentra en la parte extra celular y el grupo carboxilo terminal en el citoplasma celular, se observa en la siguiente figura:



El análisis sobre el receptor 5-HT_{2C} se lleva a cabo con rearrreglos de las 7 estructuras transmembranales alfa hélices estudiando la hidrofobicidad de los aminoácidos que estructuran a la proteína mediante SCRWL (Prediction of protein side-chain rotamers from a backbone-

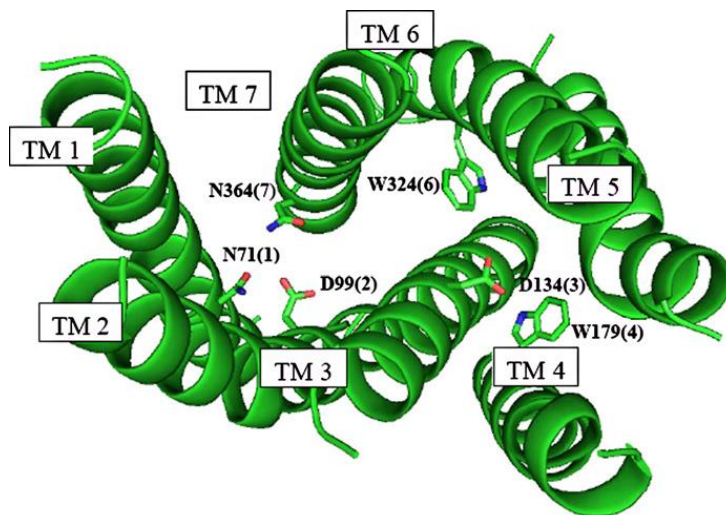
dependent rotamer library: a new homology modeling tool) donde a partir de lo predicho las alfa hélices se van rotando en orden 3, 2, 1, 7, 6, 5, y 4, comenzando con $\pm 5^\circ$ hasta 25° obteniendo del 1 al 7 dominio transmembranal de alfa hélices con ángulos 0° , 5° , 10° , 5° , 55° , 0° y 10° .

Se observan los siguientes residuos altamente conservados (Clase A/GPCRs): ASN71 hélice 1, ASP99 hélice 2, TRP179 hélice 4. Los siguientes aminoácidos altamente conservados en mamíferos: ASP134 hélice 3, TRP324 hélice 6, ASN364 hélice 7.

Experimentos sugieren la formación de puentes de hidrógeno entre el ASP99 (hélice 2) y ASN71 (hélice 1) y ASN364 (hélice 7), el ASP134 (hélice 3) la amida enlaza con aminas biogénicas, el TRP179 (hélice 4) es altamente conservado y estabiliza la estructura, el TRP324 (hélice 6) se cree que es importante para la activación, en la hélice 5 no hay un aminoácido conservado y se sugiere la interacción con el ligando específico.

En la siguiente figura se observa la predicción de la estructura proteica apo 5-HT_{2C} indicando a los 6 aminoácidos en cada hélice.

Predicción de la interacción entre el sitio del ligando (serotonina) y el receptor (5-HT_{2C}).



Interacciones del receptor 5-HT_{2C} con la serotonina

La serotonina es un agonista endógeno de varios receptores, en el receptor 5-HT_{2c} tiene como constante de enlace $K=16\text{nM}$, los análisis arrojados muestran las interacciones de los grupos R de aminoácidos específicos del receptor con los grupos funcionales de la serotonina:

ASP134 (hélice 3) forma un puente salino de su grupo carboxilo terminal con la amina primaria de la serotonina ya que posee una carga parcial positiva (8.7 Kcal/mol).

SER138 (hélice 3) forma un puente de hidrógeno entre su grupo OH y el H de la amina primaria (5.7 Kcal/mol).

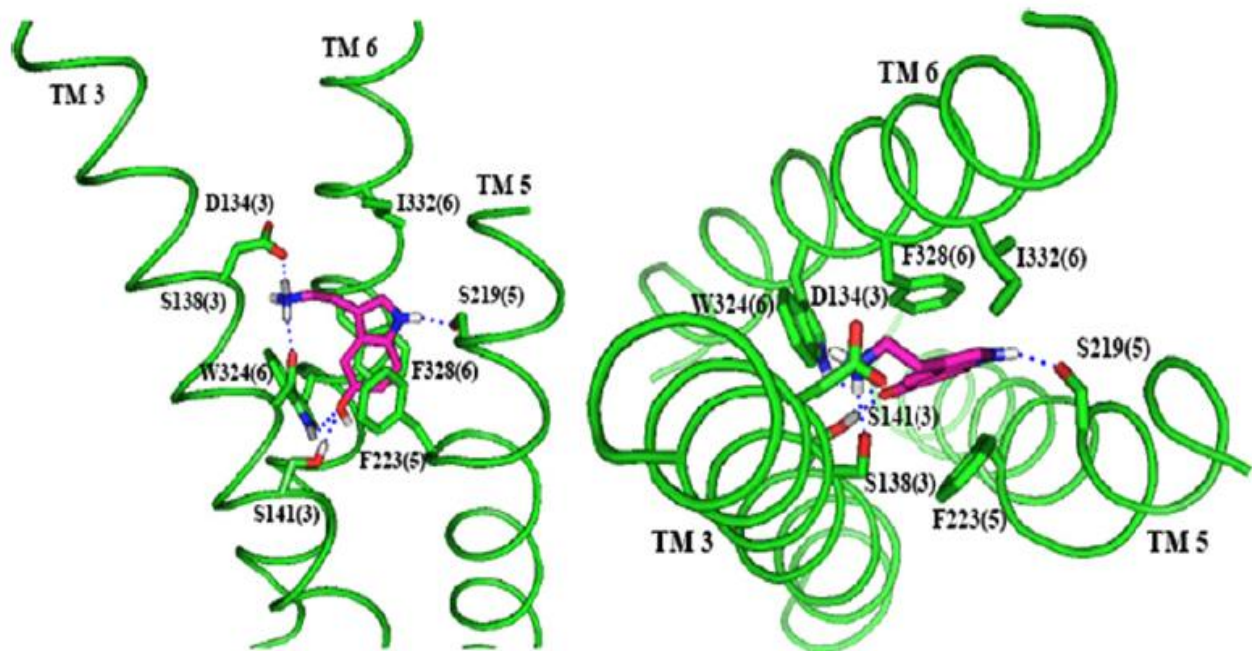
PHE223 (hélice5) posee interacciones de van der Waals con el anillo indol de la serotonina (3.0 Kcal/mol) y PHE 328 (hélice6) (4.9 Kcal/mol) debido a los dipolos temporales generados la indolamina se encuentra en medio de ambos aminoácidos.

SER219 (hélice 5) forma un puente de hidrógeno entre su OH y el H de la amina del indol (6.5 Kcal/mol).

SER141 (hélice 3) (3.3Kcal/mol) y TRP324 (hélice 6) (2.0 Kcal/mol) forman puentes de hidrógeno con el sustituyente OH del anillo indol de la serotonina.

Ile332 (hélice6) se observa la interacción de fuerzas de van der Waals con el anillo indol de la serotonina. (2.0 Kcal/mol).

Interacciones entre el receptor 5-HT2C y la serotonina en la siguiente figura.

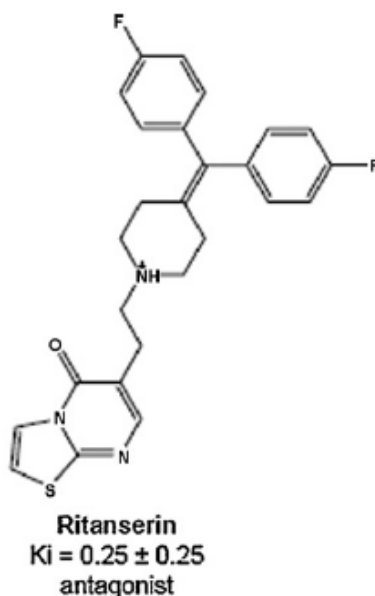


En la siguiente tabla se comparan los aminoácidos de dos receptores de serotonina que independientemente de la posición interaccionan con los grupos funcionales de la serotonina.

Aminoácido 5-HT2A	Aminoácido 5-HT2C
ASP155 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)
SER159 (hélice 3)	SER138 (hélice3)
SER239 (hélice 5)	SER219 (hélice 5)
PHE243 (hélice5) y PHE244 (hélice5)	PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5)
LEU339 (hélice 6) mutación a PHE	PHE328 (hélice 6)
ALA336 (hélice 6) mutación a TRP	TRP324 (hélice 6)

Interacciones del receptor 5-HT2C con fármacos antagonistas

La **ritanserina** es una antagonista del receptor 5-HT2C se utiliza en el tratamiento de la cefalea crónica con la depresión; su constante de enlace $K=0.25\text{nM}$ las interacciones más marcadas con el receptor son:



ASP134 (hélice 3) forma un puente salino con el grupo carboxilo y la amina de la piperidina (9.6 Kcal/mol).

TRP324 (hélice 6) la amina del anillo hace un puente de hidrogeno el oxígeno de la pirimidina del fármaco (8.5 Kcal/mol).

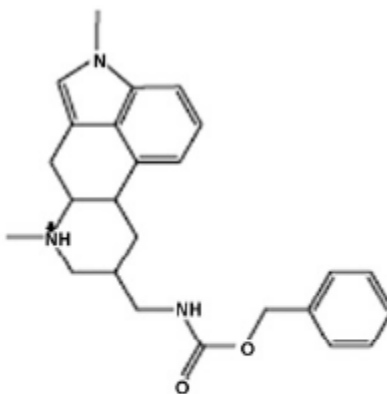
PHE137 (hélice 3) (4.9 Kcal/mol) y ASN331 (hélice 6) (2.2 Kcal/mol) tienen interacción de fuerzas de van der Waals con el grupo aromático tiazolo-pirimidina del antagonista.

ILE332 (hélice 6) (4.1Kcal/mol) y VAL215 (hélice 5) (3.5 Kcal/mol) tienen interacciones de fuerzas de van der Waals con los grupos fluorofenil del fármaco.

La tabla resume los aminoácidos que interaccionan tanto con el fármaco antagonista como con la serotonina.

Aminoácido 5-HT _{2C} /serotonina	Antagonista Ritanserina
ASP134 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)
SER138 (hélice3)	X
SER219 (hélice 5)	X
PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5)	X
PHE328 (hélice 6)	X
TRP324 (hélice 6)	TRP324 (hélice 6)
X	PHE137 (hélice 3) y ASN331 (hélice 6)
X	ILE332 (hélice 6) y VAL215 (hélice 5)

La **metergolina** es un antagonista del receptor 5-HT_{2C} es un analgésico para el dolor de cabeza especialmente en migraña presenta una constante de enlace $K=0.9\text{nM}$.



Metergoline
 $K_i = 0.29 \pm 0.11$
 antagonist

Los sitios de contacto entre el antagonista y el receptor 5-HT_{2C} son:

ASP134 (hélice 3) forma un puente salino con el nitrógeno protonado de la ergolina (10.9 Kcal/mol).

SER138 (hélice 3) forma un puente de hidrógeno ambos grupos tanto de la amida y como del carboxil del éster (7.4 Kcal/mol).

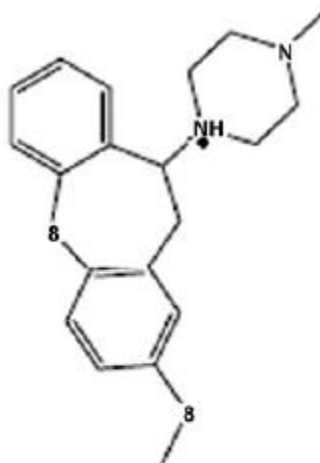
VAL215 (hélice 5) (5.9 Kcal/mol) y PRO190 (hélice 4) (4.7 Kcal/mol) tiene interacciones de fuerzas de van der Waals con el grupo aromático ergolina.

ILE142 (hélice 3) (2.9 Kcal/mol) y ILE 182 (hélice 4) (2.0 Kcal/mol) tienen interacciones de fuerzas de van der Waals con el grupo fenil del antagonista.

En el siguiente cuadro se comparan las interacciones de la serotonina y el antagonista metergolina con el receptor 5-HT_{2C}.

Aminoácido 5-HT _{2C} /Serotonina	/Antagonista Metergolina
ASP134 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)
SER138 (hélice3)	Ser 138 (hélice3)
SER219 (hélice 5)	X
PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5)	X
PHE328 (hélice 6)	X
TRP324 (hélice 6)	X
X	VAL215 (hélice 5 y PRO190 (hélice 4)
X	ILE142 (hélice 3) y ILE 182 (hélice 4)

La **metiotepina** es una antagonista del receptor 5-HT_{2C} el cuál es utilizado como antipsicótico, su constante de enlace es $K_i = 0.35 \text{ nM}$.



Methiothepin
 $K_i = 0.35 \pm 0.35$
 antagonist

La forma de interacción que se presenta entre el receptor 5-HT_{2C} y el antagonista metiotepina se da con los siguientes aminoácidos.

ASP134 (hélice 3) el grupo OH forma un puente salino con el protón del N central de la metiotepina (12.2 Kcal/mol).

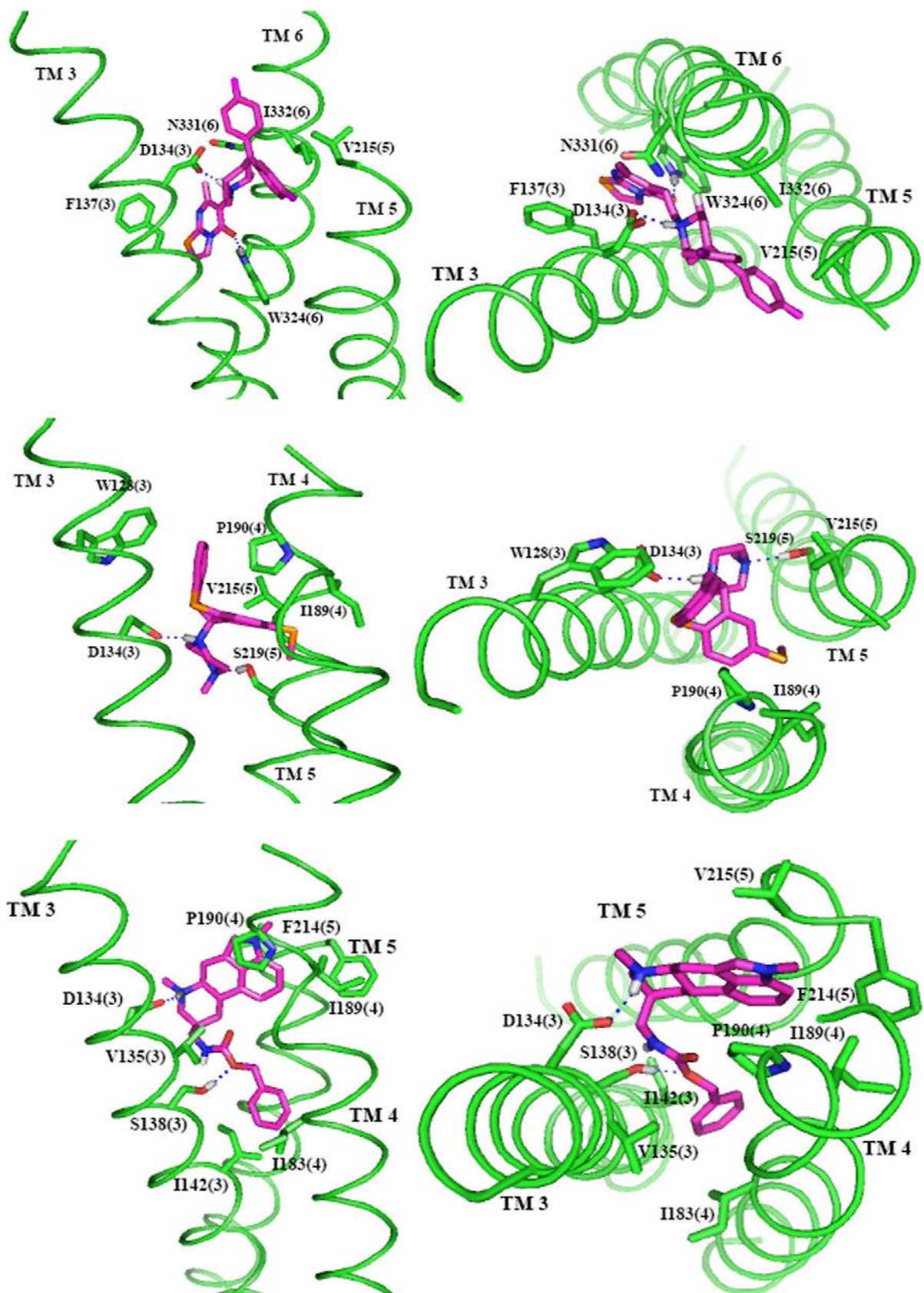
SER219 (hélice 5) forma un puente de hidrógeno con la NH de la piperazina (2.8 Kcal/mol).

PHE190 (hélice 4) (-3.9 Kcal/mol), TRP128 (hélice 3) (2.8 Kcal/mol) y VAL225 (hélice 5) tienen fuerzas de van der Waals con los dos anillos benceno del antagonista.

ILE138 (hélice 4) tiene interacciones de fuerzas de van der Waals con el tiol éter (2.5 Kcal/mol).

Aminoácido 5-HT_{2C}/Serotonina	/Antagonista Metiotepina
ASP134 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)
SER138 (hélice 3)	X
SER219 (hélice 5)	Ser 219 (hélice 5)
PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5)	X
PHE328 (hélice 6)	X
TRP324 (hélice 6)	X
X	PHE190 (hélice 5), TRP128 (hélice 3) y VAL225 (hélice 5)
X	ILE138 (hélice 4)

En la siguiente figura se muestra la interacción del fármaco ritanserina, metergolina y metiotepina sobre el receptor de serotonina 5-HT_{2C}.



La siguiente tabla muestra los aminoácidos en común que interaccionan entre la serotonina y el receptor 5-HT2A y 5-HT2C con los fármacos antagonistas.

Aminoácido 5-HT2A/Serotonina	Aminoácido 5-HT2C/Serotonina	/Antagonista Ritanserina	/Antagonista Metergolina	/Antagonista Metiotepina
ASP155 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)	ASP134 (hélice 3)
SER159 (hélice 3)	SER138 (hélice3)	X	Ser 138 (hélice3)	X
SER239 (hélice 5)	SER219 (hélice 5)	X	X	Ser 219 (hélice 5)
PHE243 (hélice5) y PHE244 (hélice5)	PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5)	X	X	X
LEU339 (hélice 6) mutación a PHE	PHE328 (hélice 6)	X	X	X
ALA336 (hélice 6) mutación a TRP	TRP324 (hélice 6)	TRP324 (hélice 6)	X	X
X	X	PHE137 (hélice 3) y ASN331 (hélice 6)	VAL215 (hélice 5 y PRO190 (hélice 4)	PHE190 (hélice 5), TRP128 (hélice 3) y VAL225 (hélice 5)
X	X	ILE332 (hélice 6) y VAL215 (hélice 5)	ILE142 (hélice 3) y ILE 182 (hélice 4)	ILE138 (hélice 4)

De acuerdo con la tabla anterior los 3 antagonistas coinciden en la formación de un puente salino de un protón amino del fármaco con el ácido aspártico ASP134 de la tercera hélice del receptor de serotonina 5HT2C. Metergolina y Metiotepina interaccionan con serinas que se encuentran en diferente hélice pero la interacción es la misma al formar puentes de hidrógeno.

También se ha observado que debido a la composición de los fármacos éstos llevan a cabo interacciones de fuerzas de van der Waals con aminoácidos del receptor que tienen anillos aromáticos como sustituyentes dentro de los observados TRP y PHE, aún no se ha mencionado TYR.

Interacciones propuestas de los antagonistas Agomelatina y Fluoxetina frente al receptor 5-HT_{2C}

Gracias a los datos arrojados donde ASP134 (hélice 3) interacciona con los antagonistas, para el caso de agomelatina éste aminoácido podría llevar a cabo la formación del puente salino entre el grupo carboxilo del ASP134 y el nitrógeno de la acetamida del fármaco. Hablando del anillo naftalén podría tener interacciones de fuerzas de van der Waals con aminoácidos aromáticos del receptor: PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5), PHE190 (hélice 5) y TRP128 (hélice 3) debido a que los 3 antagonistas antes mencionados coinciden con ésta interacción. La última interacción aceptada y tal vez la más importante para el bloqueo del receptor es la del aminoácido Isoleucina que tiene interacciones de fuerzas de van der Waals con los diferentes grupos funcionales de los antagonistas para éste caso sería con metoxi del antagonista frente a alguno de los siguientes: ILE332 (hélice 6), ILE142 (hélice 3), ILE 182 (hélice 4) ó ILE138 (hélice 4).

En cuanto a la fluoxetina la interacción del grupo carboxilo del aminoácido ASP134 (hélice 3) podría formar un puente salino con la amina secundaria del antagonista. Para los anillos fenil y fenoxi es probable que debido a su separación las interacciones sean diferentes aunq también cabe la posibilidad de que se lleve a cabo con aminoácidos aromáticos del receptor como interacciones de fuerzas de van der Waals: PHE223 (hélice 5) y PHE224 (hélice 5), PHE190 (hélice 5) y TRP128 (hélice 3) siguiendo el comportamiento anteriormente estudiado. El trifluorometil debido a su fuerte electronegatividad podría interaccionar con Isoleucinas del receptor por fuerzas de van der Waals: ILE332 (hélice 6), ILE142 (hélice 3), ILE 182 (hélice 4) ó ILE138 (hélice 4).