

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS- CENTRO DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Área: Bioquímica y Biología Molecular

“ANÁLISIS DEL RECEPTOR 5-HT1A EN EL TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR EN RATA”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.F.B. VENUS BERENICE APARICIO DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS

D.C. PATRICIA AGUILAR ALONSO

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-CLÍNICAS

Diciembre, 2014

Índice General

ABREVIATURAS.....	4
Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	6
RESUMEN	7
1 ANTECEDENTES	8
1.1 Depresión, episodio depresivo mayor y trastorno depresivo mayor	8
1.2 Neurobiología de la depresión mayor	11
1.3 Teorías moleculares de la depresión mayor	13
1.3.1 Estrés Oxidativo/Nitrosativo y citocinas pro-inflamatorias	13
1.3.2 Desbalance del eje HPA	15
1.4 Sistema serotoninérgico	16
1.5 Receptores de serotonina.....	19
1.6 Receptor 5-HT1A.....	22
1.7 Receptor 5-HT1A y su implicación en la depresión	26
1.8 Modelos depresivos	28
1.8.1 Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral.....	28
2 JUSTIFICACIÓN	31
3 HIPÓTESIS	32
4 OBJETIVOS	32
4.1 General.....	32
4.2 Particulares.....	32
5 DIAGRAMA DE TRABAJO.....	33
6 METODOLOGÍA.....	34
6.1 Animales.....	34
6.2 Bulbectomía olfatoria bilateral en ratas de la cepa Wistar	34
6.3 Pruebas conductuales	35
6.4 Técnicas moleculares	36
6.4.1 Aislamiento de RNA total.	36
6.4.2 Retrotranscripción- qPCR	36
6.5 Inmunohistoquímica.....	37

6.6 Determinación de AMP cíclico	38
6.7 Tinción de Nissl	38
7.- RESULTADOS	40
7.1 Bulbectomía olfatoria bilateral en ratas de la cepa Wistar	40
7.2 Peso.....	40
7.3 Temperatura	41
7.4 Discriminación olfatoria.....	42
7.5 Evitación a la luz.....	43
7.6 Actividad motora en el modelo de campo abierto	45
7.6.1 Actividad horizontal	45
7.6.2 Conducta estática.....	46
7.6.3 Actividad vertical	47
7.6.4 Acicalamiento	48
7.7 qPCR	49
7.9.1 Curva de eficiencia de los genes β -actina y 5-HT1A.....	49
7.9.2 Expresión relativa del receptor 5-HT1A.....	50
7.8 Inmunohistoquímicas	51
7.8.1 Receptor 5-HT1A en el hipocampo	51
7.8.2 Factor Akt en el hipocampo.....	53
7.8 ELISA cAMP	55
7.9 Tinción de Nissl	56
8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
8.1 Características físicas de la bulbectomía olfatoria	58
8.2 La extracción de los bulbos olfatorios reproduce conductas depresivas	59
8.3 Participación del receptor 5-HT1A como heterorreceptor en el TDM en rata	63
8.4 Citoarquitectura del hipocampo en el modelo OBX	64
8.5 Diagrama hipotético	66
9 CONCLUSIONES.....	67
10 PERSPECTIVAS.....	68
11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ANEXOS 79

ABREVIATURAS

μl	Microlitro(s)
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT_{1A}	Receptor de serotonina 1A
5-HTT	Transportador de serotonina
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AKT	Proteína Cinasa B
AMP	Adenosin mono fosfato
BDNF	Factor neuronal derivado del cerebro
CA	Cornu Amonis
cAMP	Adenosin mono fosfato cíclico
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRE	Elemento represor dual
DSM IV	Manual de estadística y diagnóstico de enfermedades mentales IV
ERK	Señal extracelular reguladora de cinasas
GD	Giro dentado
GIRK	Canal de potasio regulado por proteínas G
HPA	Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal
IFN-γ	Interferón gamma
IGF-1	Factor de crecimiento similar a insulina 1
IL-(2,6,8,10)	Interleucinas (2,6,8,10)
IL-1β	Interleucina 1 beta
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IRSS	Inhibidores de la recaptura selectiva de serotonina
MAO-B	Monoamino oxidasa B
NE	Noradrenalina
NFκB	Factor nuclear de cadenas kappa
ng	Nanogramo(s)
NOS2A	Sintasa de óxido nítrico 2A
OBX	Bulbectomía olfatoria bilateral

PET	Tomografía por emisión de positrones
pg	Picogramos
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKA	Fosfocinasa A
PLC	Fosfolipasa C
pM	Picomol
RE-1	Elemento represor 1
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TDM	Trastorno depresivo mayor
TPH2	Triptófano hidroxilasa 2
TRP	Triptófano
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas 2

Índice de Figuras

Figura 1.- Representación de los principales episodios depresivos.....	9
Figura 2.- Comportamiento de suicidios en México.....	10
Figura 3.- Localización de las zonas del hipocampo	12
Figura 4.- Resumen esquemático de los mecanismos involucrados en la depresión mayor	16
Figura 5.- Núcleos cerebrales involucrados en síntomas de la depresión	17
Figura 6.- Síntesis de serotonina a partir de su precursor L-triptófano.....	18
Figura 7.- Esquema de neurotransmisión de serotonina.....	18
Figura 8.- Familia de receptores de serotonina (5-HT).....	20
Figura 9.- Localización esquemática de los elementos promotores del gen 5-HT1A de humano	23
Figura 10.- Vías principales activadas por el receptor 5-HT1A	24
Figura 11.- Vías de señalización reguladas por el receptor 5-HT1A	25
Figura 12.- Acción propuesta del receptor 5-HT1A en los núcleos del rafe en personas con depresión mayor.	27
Figura 13.- Esquema general de conexiones del sistema olfatorio y sistema olfatorio accesorio	29
Figura 14.- Efecto de la bulbectomía olfatoria bilateral sobre el peso en ratas de la cepa Wistar	41
Figura 15.- Efecto de la bulbectomía olfatoria bilateral sobre la temperatura corporal en ratas de la cepa Wistar	42
Figura 16.- Prueba de discriminación olfatoria	43

Figura 17.- Prueba de evitación a la luz	44
Figura 18.- Actividad horizontal en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepresivos	45
Figura 19.- Actividad estática en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepresivos	46
Figura 20.- Número de erguidos en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepresivos.....	47
Figura 21.- Acicalamiento en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepresivos	48
Figura 22.- Curva de eficiencia de oligonucleótidos y [RNA].....	50
Figura 23.- Expresión relativa del receptor 5-HT1A	51
Figura 24.- Inmunohistoquímica del Receptor 5-HT1A en el hipocampo	52
Figura 25.- Porcentaje de reactividad del receptor 5-HT1A en la zona CA1 de hipocampo.....	53
Figura 26.- Inmunohistoquímica factor Akt en hipocampo	54
Figura 27.- Porcentaje de células positivas a reactividad del factor Akt en la zona CA1 de hipocampo.....	55
Figura 28.- Niveles de cAMP en la zona de hipocampo.....	56
Figura 29.- Tinción de Nissl del hipocampo	57
Figura 30.-Diagrama hipotético del receptor 5-HT1A post sináptico.	66

Índice de Tablas

Tabla 1.- Principales vías de señalización de los receptores de serotonina.	21
Tabla 2.- Diseño de oligonucleótidos para qPCR.....	37
Tabla 3.- Componentes de reacción de RT-PCR.....	37
Tabla 4.- Optimización de las coordenadas para la zona de lesión en ratas de la cepa Wistar.	40

RESUMEN

El trastorno depresivo mayor es una enfermedad que en los últimos años se ha incrementado en jóvenes entre los 15 y 24 años de edad; es un problema de salud pública debido a que gran porcentaje de los pacientes llegan al suicidio. Los diversos mecanismos involucrados en este trastorno incluyen estrés oxidativo/nitrosativo, desbalance del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, y desregulación de algunos neurotransmisores, tal es el caso de la serotonina. Las terapias farmacológicas de elección, para tratar este padecimiento, no han resultado lo suficientemente eficaces por lo que se sugiere que exista desregulación en los receptores de serotonina en este trastorno. En este trabajo se estudió la participación del receptor de serotonina 1A (5-HT1A) en la zona de hipocampo, utilizando el modelo de bulbectomía olfatoria en rata (OBX) como modelo de depresión mayor. El modelo fue caracterizado conductualmente encontrando signos equiparables con la depresión en humanos como la falta de aseo. Estos cambios conductuales se presentan tempranamente y persisten hasta los 45 días después la cirugía. Se corroboró con la tinción de Nissl que las características de la cito arquitectura del hipocampo no fueran un factor determinante en los niveles del receptor. En la evaluación del RNA mensajero del receptor no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo el principal metabolito sobre el que tiene efecto el receptor: el AMP cíclico; se encontró disminuido en ratas OBX, tratadas con vehículo (OBX+V) o con fluoxetina (OBX+A); ésta disminución es asociada al incremento del receptor encontrado en la zona CA1 del hipocampo pues al analizar el factor Akt, que forma parte de la cascada de señalización tras la activación del receptor, se encuentra incrementado en la misma zona. Este trabajo abre un nuevo panorama sobre la participación del receptor 5-HT1A en el trastorno depresivo mayor, aunque se proponen otros análisis para mejorar el estudio.

1 ANTECEDENTES

1.1 Depresión, episodio depresivo mayor y trastorno depresivo mayor

El estudio de la conducta humana es un gran reto para todos los especialistas encargados de analizar los procesos mentales del estado de ánimo. Alteraciones en estos procesos pueden desencadenar en diferentes patologías, una de ellas, que ha tomado relevancia en los últimos años, es la depresión. Ésta es definida como un síndrome caracterizado por una tristeza profunda y por la inhibición de las funciones psíquicas, a veces con trastornos neurovegetativos [RAL, 2001].

La depresión es catalogada como una de las alteraciones del estado de ánimo que tiene como base a la tristeza (figura 1). Cuando la sintomatología se prolonga durante días consecutivos el cuadro es considerado un episodio depresivo mayor. La característica esencial de un episodio depresivo mayor es un período de al menos 2 semanas durante las cuales el individuo presenta una pérdida de interés o placer en casi todas las actividades cotidianas. En los niños y adolescentes el estado de ánimo puede ser irritable en lugar de triste. El sujeto también debe experimentar al menos otros cuatro síntomas de una lista que incluye cambios en el apetito con pérdida o ganancia de peso, del sueño y de la actividad psicomotora, falta de energía; sentimientos de infravaloración o culpa; dificultad para pensar, concentrarse o tomar decisiones, y pensamientos recurrentes de muerte o ideación de planes suicidas. Cabe mencionar que para que se declare el estado como episodio depresivo mayor el paciente debe presentar uno de esos signos como nuevo o bien empeorar notablemente en comparación con un estado anterior, permanecer así la mayor parte del día y durante al menos dos semanas, presentando malestar clínico significativo (sujetos con un episodio depresivo mayor se presentan a menudo con llanto, irritabilidad, tristeza, rumiaciones obsesivas, ansiedad, fobias, preocupación excesiva por la salud física y quejas de dolor) y en consecuencia un deterioro laboral y social notable [Allen y cols., 2000a].

El curso de un episodio depresivo mayor puede remitir por completo aún sin tratamiento y dos terceras partes de la población afectada regresarán a un estado premórbido, en caso contrario, cuando los síntomas no desaparecen o remiten parcialmente, la persona afectada puede evolucionar al trastorno depresivo mayor (TDM). Este trastorno es una enfermedad heterogénica cuya etiología aún no es comprendida completamente; es un desorden crónico e incapacitante con una alta tasa de prevalencia a nivel mundial [Chung y cols., 2013; El-Hage y cols., 2013; Jabbi y cols., 2008; Kupfer y cols., 2012; Schmidt y cols., 2011], actualmente afecta a personas jóvenes (menores a 25 años) [Pajer y cols., 2012] su impacto es tan grande que si sigue su incremento actual, para el año 2030 será una de las primeras y más costosas enfermedades en el mundo [Andrus y cols., 2012].

Bajo los criterios del manual de estadística y diagnóstico de enfermedades mentales IV (DSM IV), el TDM es una enfermedad del estado de ánimo catalogada como unipolar, que se declara cuando el individuo presenta dos o más episodios de depresión mayor consecutivos (no aislados) junto con otros cuadros típicos de depresión (falta de apetito, desinterés, irritabilidad, etc.) [Allen y cols., 2000b; Villanueva, 2013].

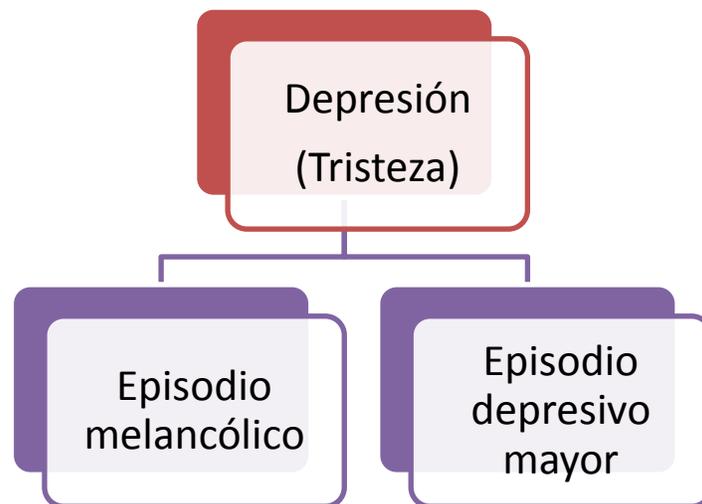


Figura 1.- Representación de los principales episodios depresivos.

Las características de personalidad pueden predisponer a un individuo a sufrir un evento de depresión mayor o modificar la clínica que sigue dicho episodio [Oba y cols., 2013]. El desarrollo del TDM puede ser progresivo incrementando la intensidad de la sintomatología somática y desencadenar en pensamientos suicidas [Allen y cols., 2000b]. A nivel mundial, el suicidio, es considerado un problema de salud pública, superando los 850,000 individuos anuales [Ganz y cols., 2010; Ekinci y cols., 2012]. En México, según datos del INEGI en la última década se han incrementado las muertes por suicidio, especialmente entre el rango de los 15 a los 24 años (figura 2), lo que representa no solo un problema de salud pública sino también un problema económico debido a que este grupo de personas se encuentra en una edad laboral importante [INEGI, 2014]. A diferencia de otros países como Estados Unidos [Ganz y cols., 2010], la estadística general mexicana apunta que el 80% de los casos se presentan en hombres, sin embargo esto varía entre estados, por ejemplo en Colima en 2012 alcanzó hasta el 95% de los casos mientras que en Guerrero tan solo el 68% [INEGI, 2012; INEGI, 2014].

**Tasa de suicidios
1990 a 2011**
(Por 100 mil habitantes)

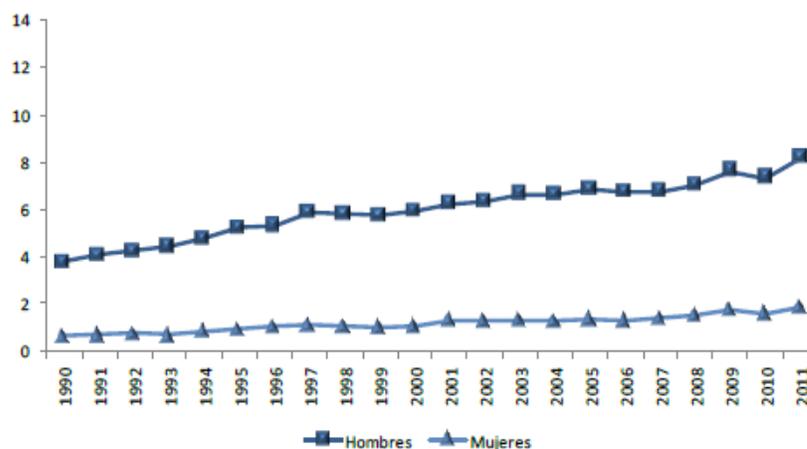


Figura 2.- Comportamiento de suicidios en México. El número de muertes por suicidio se ha duplicado en el periodo 1990-2011 y continúa incrementándose. Fuente: INEGI, 2014.

1.2 Neurobiología de la depresión mayor

Para comprender de manera más adecuada la depresión mayor, es importante tener una visión que abarque los diversos niveles fisiopatológicos. Debido a que se trata de una enfermedad compleja que se manifiesta con una amplia variedad de síntomas emocionales, ansiosos y somáticos, se sugiere la participación de diferentes zonas del cerebro tales como: corteza cingulada anterior, corteza prefrontal, amígdala e hipocampo.

La corteza cingulada anterior y la corteza prefrontal son estructuras localizadas en el lóbulo frontal del cerebro implicadas en el aprendizaje temprano así como también en la función ejecutiva y la memoria operativa, su alteración puede provocar que los pacientes con depresión mayor tengan problemas en toma de decisiones [Öngür y Price, 2000]. La amígdala es una estructura que se encuentra en la porción medial del lóbulo temporal, una de sus funciones más importantes es el control del desarrollo de la memoria emocional, así como las respuestas emocionales a estímulos adversos (miedo, ansiedad, etc.) [Sheline y cols., 2001].

El hipocampo es una estructura ubicada en el interior del lóbulo temporal, es vital en la formación, almacenamiento y consolidación de la memoria, en el control del aprendizaje y en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, está conectado también a zonas corticales y otras zonas del sistema límbico que son importantes en el desarrollo de procesos depresivos. La región hipocampal es un componente prominente del sistema nervioso (tanto en rata como en humano), asociado a los procesos de memoria emocional en conjunto con la amígdala en alteraciones del humor y procesos de estrés [Andrus y cols., 2012]; está constituido por dos principales regiones: la formación hipocampal y la región parahipocampal. En la formación hipocampal se pueden diferenciar tres regiones citoarquitectónicamente distintas: el giro dentado, el hipocampo y el subículo (figura 3).

Se han realizado numerosos estudios en donde se da énfasis al hipocampo en el transcurso de la depresión mayor y el suicidio, encontrando que en la zona hipocampal existen disminuciones de factores neurotróficos y sus receptores por ejemplo BDNF [Banerjee y cols., 2013] y que por otro lado se ven incrementados en respuesta a antidepresivos [Schmidt y cols., 2011]; otros investigadores han detectado el incremento en la expresión de iNOS en pacientes con desordenes depresivos recurrentes [Talarowska y cols., 2014]; también se ha dado importancia a los factores epigenéticos que puedan impactar en las distintas zonas del hipocampo y su relación con la depresión mayor [Na y cols., 2014].

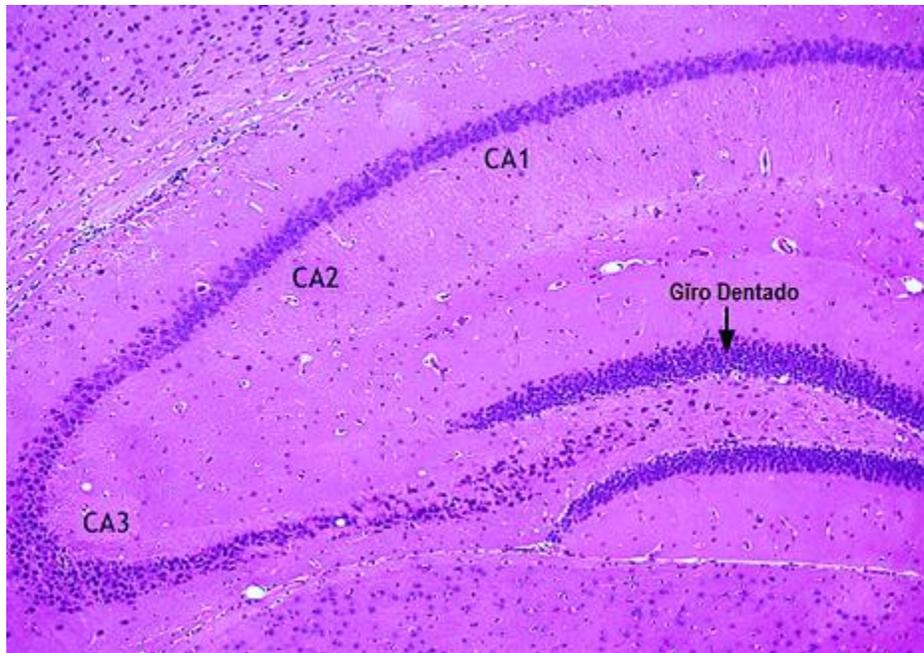


Figura 3.- Localización de las zonas del hipocampo. Tinción de Nissl de la zona hipocámpica en rata: giro dentado, e hipocampo conformado por las zonas CA1, CA2 y CA3.

Las regiones del hipocampo propiamente dicho, anteriormente descritas por Ramón y Cajal, fueron posteriormente clasificadas por Lorente de Nó en tres zonas: CA1, CA2 y CA3. Estas zonas además de la diferencia de tamaños celulares de las neuronas piramidales se diferencian en el tipo de conexiones que reciben, por ejemplo, la zona CA3 recibe inervación del giro dentado mientras que la zona CA1 no.

1.3 Teorías moleculares de la depresión mayor

Los pacientes con depresión mayor presentan una gran variabilidad de síntomas, así como la respuesta al tratamiento farmacológico, enfatizando así la compleja naturaleza de esta enfermedad. La dificultad en la identificación de nuevas dianas farmacológicas radica en la elaborada neurobiología de este padecimiento y los factores de predisposición subyacentes [Bale, 2006].

Aunque los avances en genética molecular y neuroimagen (PET) han contribuido notablemente a las bases neurobiológicas de la depresión mayor, no existen genes individuales asociados a este trastorno, por lo que es importante seguir profundizando en los mecanismos patológicos para complementar los avances descritos por distintos autores [Kupfer y cols., 2012; Smith, 2013]. Se han desarrollado diversas líneas de investigación en las que se destacan 4 teorías importantes, que son: 1) el desarrollo de procesos inflamatorios como factor de riesgo [Najjar y cols., 2013], 2) la generación de estrés oxidativo/nitrosativo y el incremento de citocinas pro inflamatorias [Bouayed y cols., 2009; Chung y cols., 2013; Galecki y cols., 2010; Kupfer y cols., 2012; Talarowska y cols., 2014], 3) desbalance en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), o una mezcla de las dos anteriores [Anisman, 2009] y 4) alteraciones en los neurotransmisores monoaminérgicos (dopamina, noradrenalina y serotonina) destacando la participación del sistema serotoninérgico [Albert y François, 2010; Jabbi y cols., 2008; Kupfer y cols., 2012; Haleem, 2011; Pytliak y cols., 2011] aunque no se han encontrado resultados contundentes al respecto por lo que constituye un área de interés para los investigadores.

1.3.1 Estrés Oxidativo/Nitrosativo y citocinas pro-inflamatorias

El estrés oxidativo está definido como el desbalance persistente entre las moléculas antioxidantes y pro-oxidantes. El resultado de ese fenómeno es la producción excesiva de radicales libres y especies reactivas de oxígeno [Siwek y cols., 2013]. El cerebro es uno de los órganos más susceptibles al daño por oxidación [Bouayed y cols., 2009; Talarowska y cols., 2014], debido en gran parte

a su alta composición de lípidos factibles de ser atacados por especies reactivas de oxígeno (ROS), así como la presencia de iones metálicos que favorecen la formación de ROS [Talarowska y cols., 2014].

En concentraciones muy bajas las ROS pueden favorecer procesos biológicos como la activación del sistema inmunológico, sin embargo cuando existen niveles altos de ellas y otros radicales libres se favorece la oxidación de moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [Siwek y cols., 2013] e impactar en organelos o células completas del sistema nervioso central, tal es el caso del daño encontrado en el DNA mitocondrial a causa del estrés oxidativo en algunas zonas del cerebro, como hipocampo, y que se ha asociado al trastorno depresivo mayor [Tobe, 2013].

Los factores genéticos pueden favorecer los procesos oxidativos y a su vez éstos impactar sobre enfermedades mentales como trastornos depresivos recurrentes; por ejemplo, un polimorfismo en el gen de la sintasa de óxido nítrico 2A (NOS2A) NOS2A -1026C/A encontrado en un estudio sobre depresión recurrente en la población polaca, sugiere que la etnia, y por ende los factores genéticos, tienen impacto en el desarrollo de trastornos depresivos [Galecki y cols., 2010].

Aunque existen diversas terapias antidepresivas, no se ha encontrado una que pueda funcionar adecuadamente para contrarrestar los efectos globales de la depresión mayor, se han realizado, sin embargo, estudios en busca de moléculas que puedan funcionar como marcadores biológicos asociados a la depresión mayor, destacando: factores de crecimiento (BDNF, IGF-1, VEGF, GDNF), citocinas y marcadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y diversas interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10). De manera clínica se han encontrado alteraciones en esos marcadores, proponiendo diferencias en pacientes con trastorno depresivo mayor, sin embargo la sensibilidad del método de detección influye en los resultados, así como también otras patologías asociadas puesto que se han encontrado alteraciones en

otros padecimientos, lo que los vuelve inespecíficos y se requiere profundizar en los estudios para encontrar (si es posible) escalas adecuadas a cada enfermedad [Schmidt y cols., 2011].

1.3.2 Desbalance del eje HPA

La desregulación del eje HPA, evaluada a través del incremento de niveles de cortisol, se ha asociado con desórdenes mentales además de la depresión mayor [Savitz y cols., 2009; van der Werf-Eldering y cols., 2012]. El incremento en esta molécula se ha encontrado en estudios pos mortem de personas suicidas así como en pacientes con trastorno depresivo mayor. El exceso de liberación de cortisol se ha propuesto como uno de los mecanismos potenciadores de estados depresivos (figura 4) desde hace más de 30 años; algunos estudios han mostrado un fracaso en la disminución de cortisol ante el tratamiento con dexametasona [López y cols., 1998]; éste exceso puede asociarse también a los desórdenes cognitivos presentados en pacientes con trastorno bipolar y depresión pues el cortisol funciona entonces como molécula pro-oxidante [van der Werf-Eldering y cols., 2012].

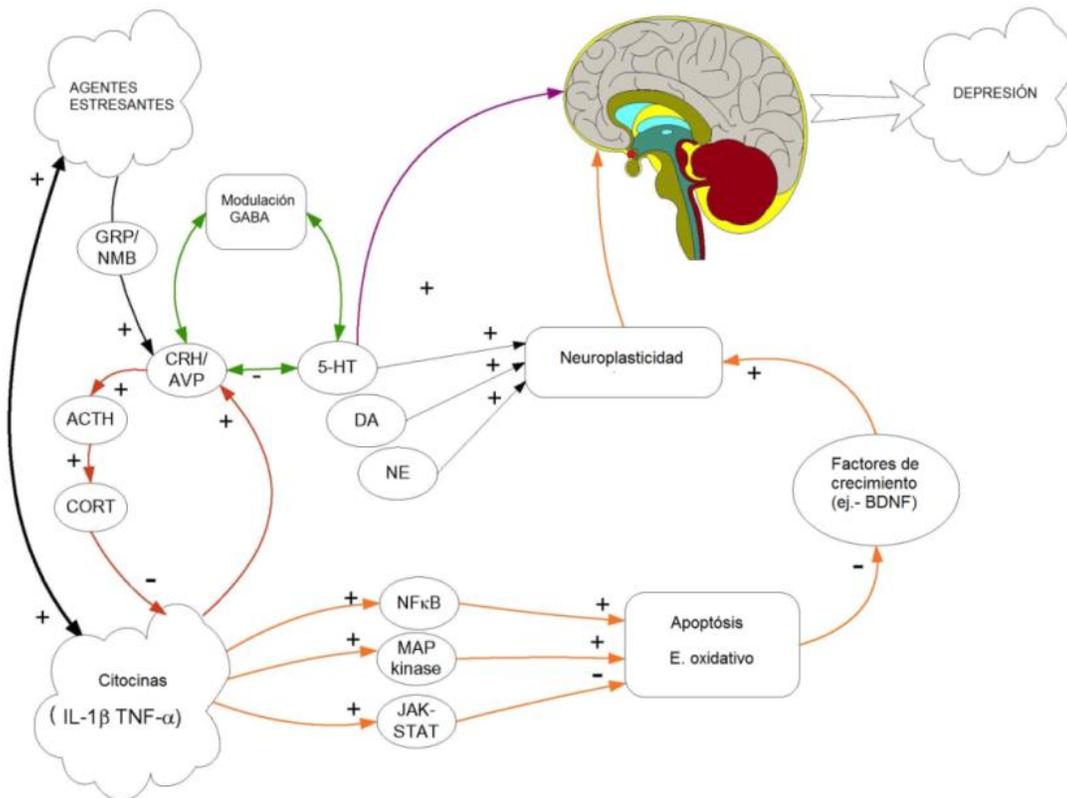


Figura 4.- Resumen esquemático de los mecanismos involucrados en la depresión mayor. Los factores estresantes y las citocinas promueven cambios y sensibilizan los neurotransmisores, esto provoca la liberación de hormonas como CRH que favorece los cambios en los neurotransmisores y el exceso de la liberación de cortisol. Las variaciones de serotonina (5-HT) y otras aminas (DA, NE) pueden inducir estados depresivos de manera directa o por vías alternativas como el estrés oxidativo y la apoptosis, que puede ser contrarrestada por el incremento de factores de crecimiento. Tomado y modificado de Anisman, 2009.

1.4 Sistema serotoninérgico

Desde 1969 se ha asociado al sistema serotoninérgico con los desórdenes afectivos a través de lo que se conoce como la hipótesis de la indolamina. La serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una de las moléculas más conocidas y al mismo tiempo más intrigante para los investigadores [Bockaert y cols., 2006], desempeña diversos e importantes papeles, tal como: regulación de la temperatura corporal, control del apetito y estado de vigilia así como también de los cambios en el estado de ánimo [Albert y cols., 2011; Berumen y cols., 2012; Oba y cols., 2013].

La serotonina es sintetizada en las neuronas serotoninérgicas que se encuentran en los núcleos del rafe y que proyectan hacia diferentes zonas del cerebro como cerebelo, hipotálamo, amígdala, corteza frontal e hipocampo (figura 5), las cuales han sido asociadas a las emociones y también a las alteraciones del estado del ánimo [Pierz y Thase, 2014], su síntesis (figura 6) comienza a partir de la conversión del triptófano en 5-hidroxytriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa 2 (encontrada solo en las neuronas serotoninérgicas) y posteriormente en 5-hidroxitriptamina por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, es almacenada en vesículas hasta su liberación (figura 7), se encuentra tanto en el cuerpo neuronal como en las terminales sinápticas en donde al ser liberada puede actuar sobre sus diferentes receptores, cuenta con un transportador (5-HTT) que se encarga de recapturar este neurotransmisor para posteriormente ser metabolizado por la monoaminoxidasa [Pytliak y cols., 2011].

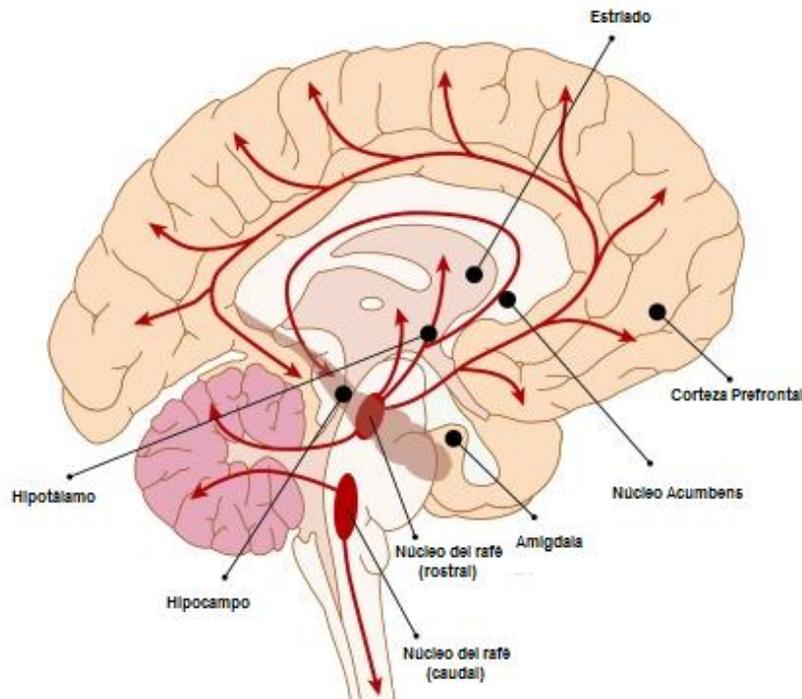


Figura 5.- Núcleos cerebrales involucrados en síntomas de la depresión. En rojo se presentan los núcleos del rafe y las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas. Tomado y modificado de Pierz y Thase, 2014.

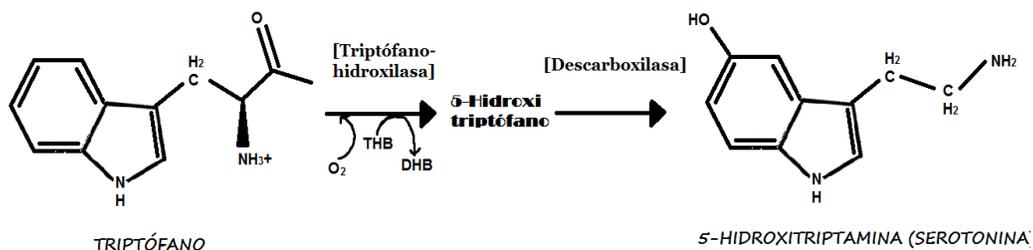


Figura 6.- Síntesis de serotonina a partir de su precursor L-triptófano. El triptófano es convertido en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa (enzima limitante de la reacción), posteriormente la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos convierte el 5-hidroxitriptófano en 5-hidroxitriptamina. Tomado y modificado de Pytliak y cols., 2011.

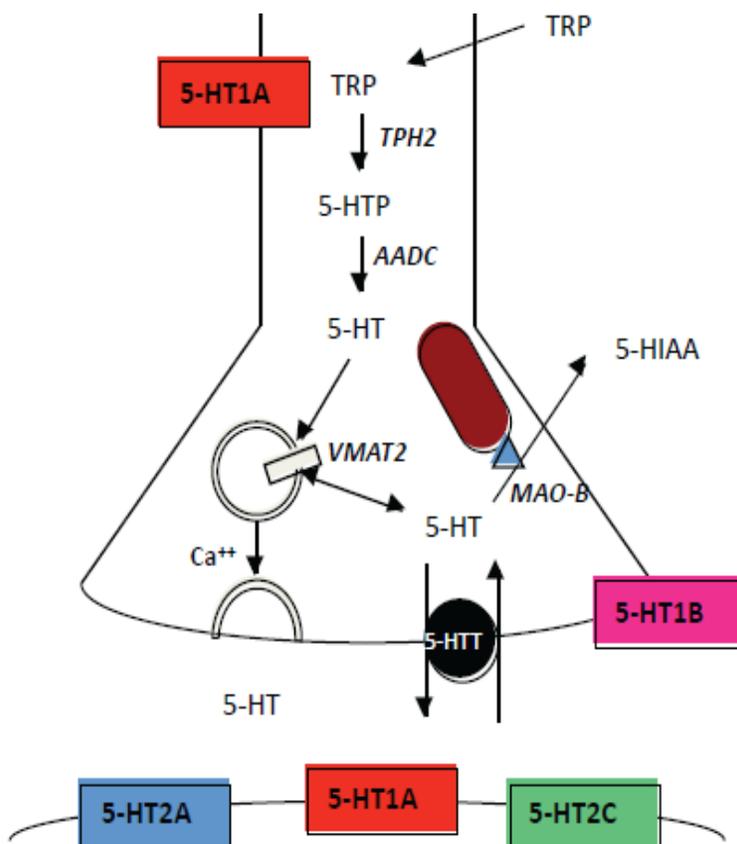


Figura 7.- Esquema de neurotransmisión de serotonina. Principales componentes que intervienen en la síntesis, liberación, recaptura y degradación de la serotonina. TRP, triptófano; TPH2, triptófano hidroxilasa 2; 5-HTP, 5-hidroxitriptófano; AADC, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); VMAT2, transportador vesicular de mono aminas 2; 5-HTT, transportador de serotonina; MAO-B, mono amino oxidasa B; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético. Tomado de Albert y cols., 2011.

Con base a lo anterior diversas terapéuticas antidepresivas están diseñadas para incrementar el tiempo de permanencia de la serotonina ya sea, en el espacio sináptico o en su vida media al impedir que sea metabolizada; estas terapias incluyen fármacos como: inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO, actualmente en desuso por sus complicaciones y efectos adversos), antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la recaptura selectiva de serotonina (IRSS) [Lee y cols., 2010] y algunas otras combinaciones aunque no han resultado ser totalmente efectivos [Adell y cols., 2005; Jakobsen y cols., 2011]. Dado lo observado en esos resultados, toman gran importancia la familia de los receptores 5-HT, sugiriendo alteraciones en ellos pues a pesar de que la serotonina se encuentre disponible en el espacio sináptico, la terapia no resulta del todo efectiva.

1.5 Receptores de serotonina

De acuerdo a sus características, estos receptores se clasifican en 7 grupos principales (figura 8), hasta la fecha se han encontrado más de 13 subtipos distintos, la mayoría de ellos están acoplados proteínas G [Albert y François, 2010; Dass y Sudandiradoss, 2012; Pytliak y cols., 2011], en la tabla 1 se resumen las principales vías de señalización de cada grupo.

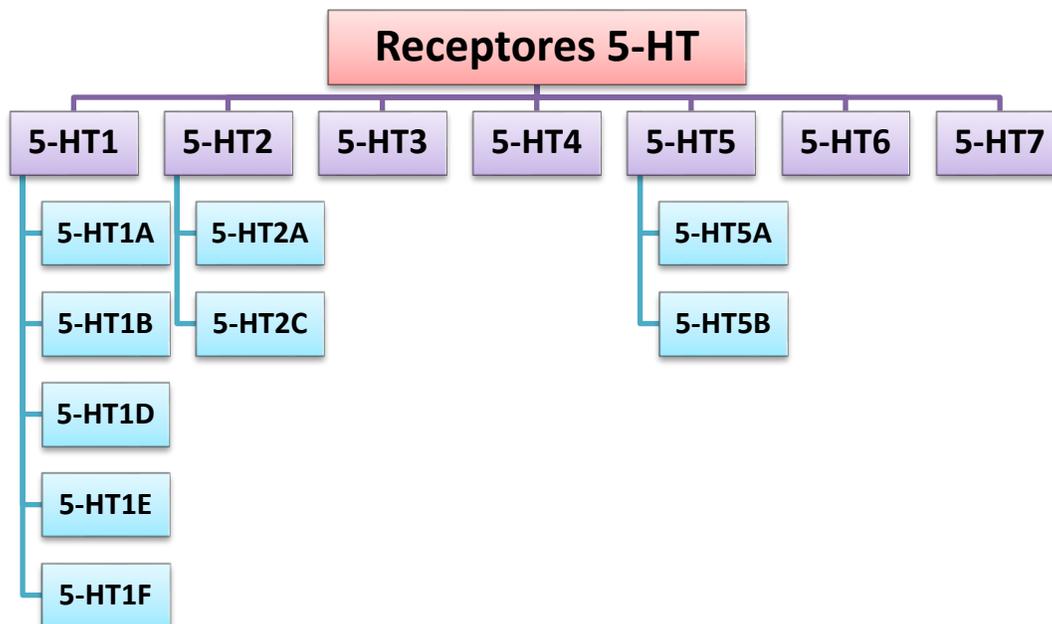


Figura 8.- Familia de receptores de serotonina (5-HT).

Los receptores de serotonina se encuentran distribuidos por todo el organismo, teniendo abundancia en algunas zonas sobre otras. En el sistema nervioso central pueden encontrarse todos los grupos de receptores; algunos estudios sugieren la participación de los receptores 5-HT1A, 5-HT2A y 5-HT2C (que se encuentran abundantemente en zonas cortico-límbicas) [Albert y François, 2010; Albert, 2012; Gurevich y cols., 2002; Mannoury la Cour y cols., 2006; Oba y cols., 2013; Pytliak y cols., 2011] en el desarrollo de desórdenes del estado de ánimo. Análisis sobre los receptores 5-HT2A y 5-HT2C que se encuentran de manera predominante en la corteza frontal no muestran cambios relevantes en los niveles de mRNA, sin embargo pueden verse afectados bajo el tratamiento con IRSS [Gurevich y cols., 2002; Oba y cols., 2013]. Otros estudios han demostrado el papel que juega el receptor 5-HT1A como regulador del sistema serotoninérgico en general [Albert y cols., 2011], sugiriendo una participación importante en el trastorno depresivo mayor [Savitz y cols., 2009].

Tabla 1.- Principales vías de señalización de los receptores de serotonina.

Receptor	Tipo	Principal vía de señalización	Localización mayoritaria en CNS
5-HT1A	Acoplado a proteínas G _{i/o}	↓cAMP	Autorreceptor somatodendrítico en núcleos del rafe/ Heterorreceptor postsináptico en hipocampo.
5-HT1B	Acoplado a proteínas G _{i/o}	↓cAMP	Autorreceptor terminal/ Receptor postsináptico en estriado, núcleo acumbens y área ventral-tegmental.
5-HT2A	Acoplado a proteínas G _{q11}	IP ₃	Receptor postsináptico en corteza frontal.
5-HT2C	Acoplado a proteínas G _{q11}	IP ₃	Receptor postsináptico en corteza frontal.
5-HT3	Canal habilitado por ligando	Canal iónico Na ⁺ /K ⁺	Receptor postsináptico en corteza y amígdala.
5-HT4	Acoplado a proteínas G _s	↑cAMP	Receptor postsináptico.
5-HT5	Acoplado a proteínas G _i	Indefinido	Sin caracterizar.
5-HT6	Acoplado a proteínas G _s	↑cAMP	Receptor postsináptico en hipocampo.
5-HT7	Acoplado a proteínas G _s	↑cAMP	Receptor postsináptico en núcleo supraquiasmático y corteza.

Fuente: Modificado de Carr y Lucki., 2011 y Pytliak y cols., 2011.

1.6 Receptor 5-HT1A

De todos los subtipos de receptores de serotonina, éste receptor es uno de los más abundantes en zonas córtico-límbicas que se han asociado a los trastornos del estado del ánimo y las emociones [Albert y cols., 2011], como heterorreceptor en neuronas piramidales en la corteza prefrontal, la amígdala, el septum, el hipotálamo, el hipocampo, y como autorreceptor en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe [Albert y cols., 2011; Berumen y cols., 2012; Drevets, 1999; Hoyer y cols., 1994].

El gen que codifica para el receptor 5-HT1A está localizado en el cromosoma 5 en humanos, 13 en ratón y 2 en rata; es altamente conservado entre éstas y otras especies de mamíferos [Dass y Sudandiradoss, 2012]. Se trata de un gen que no contiene intrones y codifica para una proteína de 7 dominios transmembranales acoplada a proteínas G de tipo inhibitorias; en su región promotora contiene una zona denominada promotor mínimo (figura 9); éste promotor mínimo contiene zonas ricas en G/C y un elemento en respuesta al factor nuclear de las cadenas kappa ($\text{NF}\kappa\text{B}$); río arriba del promotor mínimo se encuentran regiones denominadas elemento represor-1 (RE-1) y elemento represor dual (DRE) que en condiciones normales al ser activados reprimen la transcripción del receptor [Albert y cols., 2011].

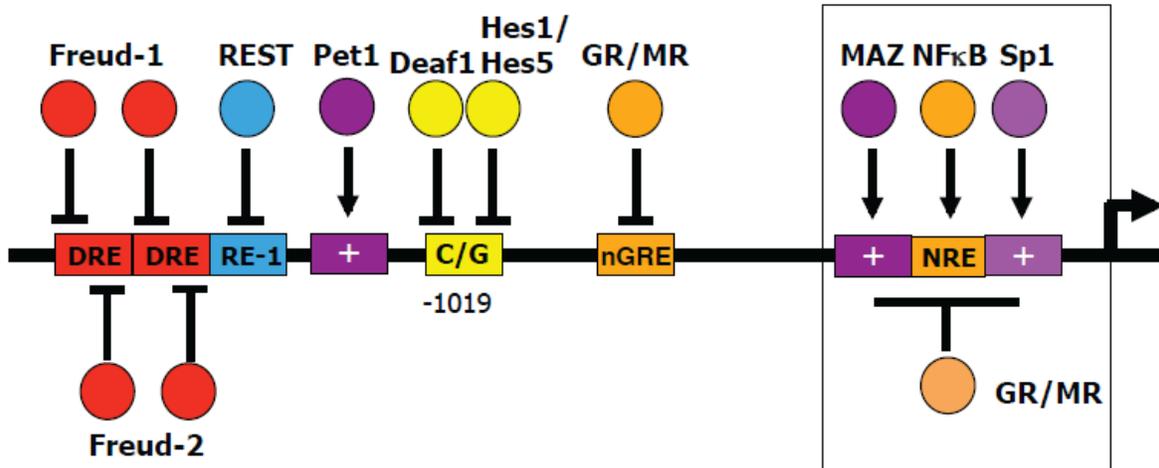


Figura 9.- Localización esquemática de los elementos promotores del gen 5-HT1A de humano. En el promotor mínimo (recuadro) se encuentran zonas ricas en G/C (Sp1 y MAZ), así como una zona de respuesta al elemento NFκB (NRE) y receptores de glucocorticoides (GR/MR) que inhiben la transcripción al bloquear Sp1. Río arriba se encuentran elementos represores de la transcripción como nGRE, DRE1/2, RE-1 y un sitio de represión en la posición -1019. Se ha encontrado que la unión de Pet1 puede favorecer la transcripción. Tomado de Albert y cols., 2011.

El receptor 5-HT1A está acoplado a G_0 y G_i dependiendo de su localización, por ejemplo, en los núcleos del rafe tiene mayor afinidad por la proteína Gai3 [Polter y Li, 2010; Berumen y cols., 2012; Hoyer y cols., 1994], produce la inhibición de la adenilato ciclasa y con ello disminuye los niveles de AMP cíclico (cAMP), un segundo mensajero que impacta sobre proteínas cinasas dependientes de cAMP como proteína cinasa A (PKA) y sobre la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB) [Li y cols., 2009], esta ruta se conoce también como ruta canónica del receptor 5-HT1A [Polter y Li, 2010]; actúa también activando los canales de potasio regulados por proteína G (GIRK) modificando el flujo este ión, también inhibiendo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y en consecuencia deteniendo la puesta en marcha neuronal; todo lo anterior se ha observado en los núcleos del rafe (figura 10) [Albert y cols., 2011; Berumen y cols., 2012]. En otros estudios se ha asociado a las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas $G_{0/i}$ acopladas a este receptor, en la activación de la fosfolipasa C (PLC), así mismo en las cascadas de señalización que implican la activación de cinasas de regulación de señales extracelulares (ERK) vía MAP cinasas (MAPK), además activa también la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) que incide sobre el

factor Akt (figura 11) [Polter y Li, 2010]. En neuronas corticales este receptor, mediante la disminución del cAMP, puede reducir la actividad de CAMKII así como los niveles de receptores AMPA; en hipocampo se ha observado la activación de Akt y con ello una disminución de GSK3 β (figura 11), esto puede observarse también en los núcleos del rafe (donde el receptor tiene mayor afinidad por la proteína), sin embargo, de manera contradictoria, parece no tener efecto sobre la fosforilación basal de ERK1/2 [Albert y cols., 2011].

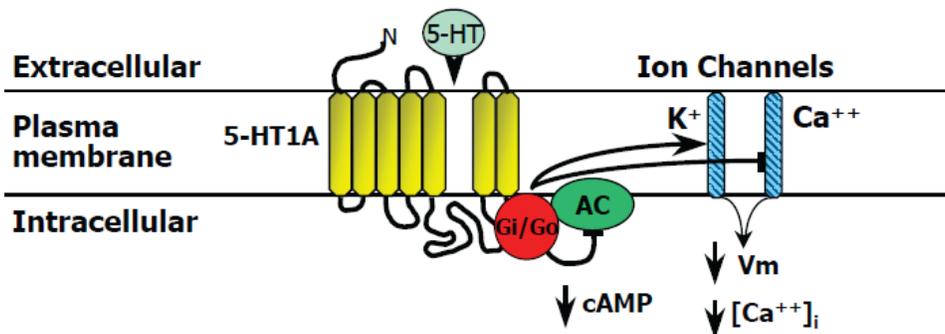


Figura 10.- Vías principales activadas por el receptor 5-HT1A. El receptor 5-HT1A se acopla a proteínas G inhibitorias, provoca la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), promueve la apertura de canales de potasio regulados por proteínas G (GIRK) y bloquea los canales de calcio dependientes de voltaje. Fuente: Tomado de Albert y cols., 2011.

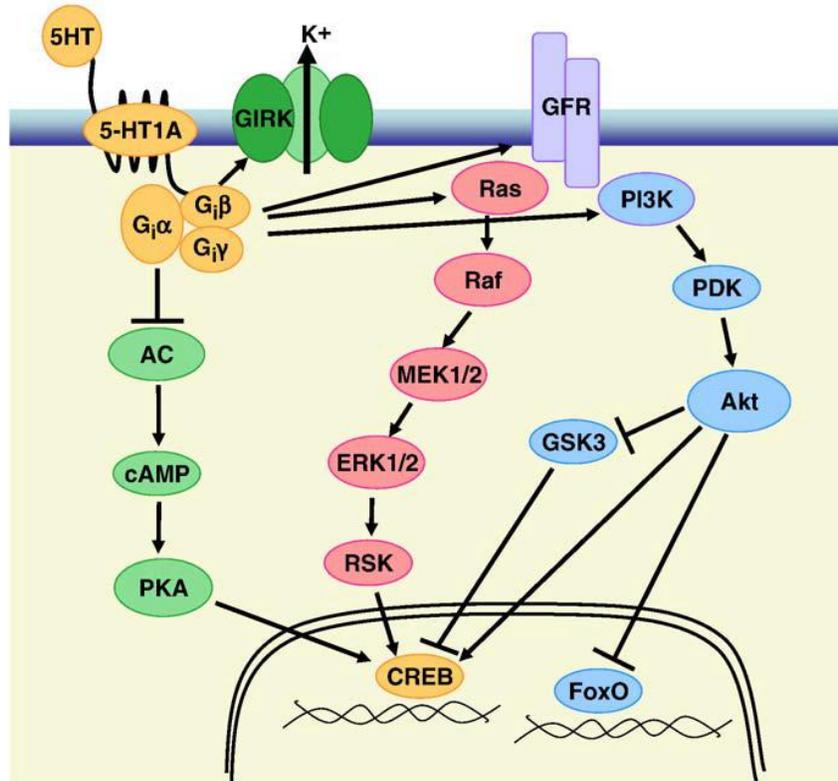


Figura 11.- Vías de señalización reguladas por el receptor 5-HT1A. Vía canónica: AC, cAMP, PKA. Otras vías: activación de GIRK y receptor a factores de crecimiento (GFR) que inciden sobre MEK1/2, ERK1/2, PI3K, Akt, CREB y FoxO. Tomado de Polter y Li, 2010.

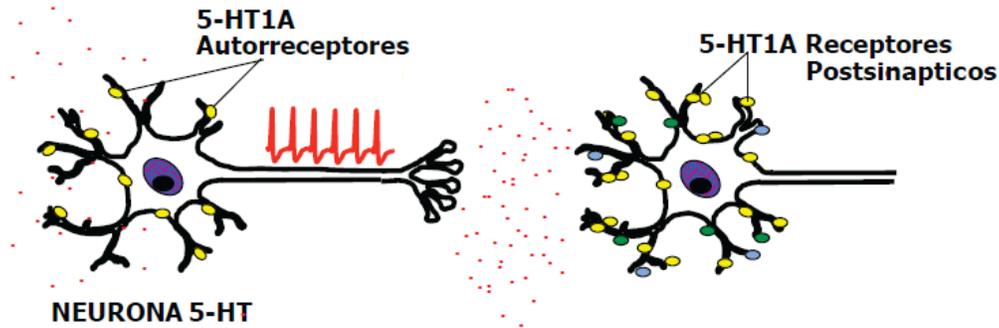
Por su localización como autorreceptores se ha asociado a los receptores del grupo uno con el control de la neurotransmisión de serotonina. Se destacan los receptores 5-HT1A y 5-HT1B, en un estudio sobre éstos, se encontró que la actividad de ambos receptores está regulada por cascadas de señalización de fosfolípidos aunque de maneras distintas y que depende del agonista que se emplee; las fosfolipasas A₂ y C (PLA₂ y PLC) fueron las enzimas involucradas en este proceso [Berg y Clarke, 2001], esta desregulación puede impactar sobre la activación de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), lo que provoca un incremento en los niveles de estrés oxidativo/nitrosativo y de este modo predisponer procesos depresivos.

1.7 Receptor 5-HT1A y su implicación en la depresión

Existen diversas investigaciones que buscan evidenciar la participación del receptor 5-HT1A en las enfermedades mentales [Berg y Clarke, 2001; Bravo y cols., 2014; Carabelli y cols., 2014], especialmente en el trastorno depresivo mayor [Savitz y cols., 2009]; éstas investigaciones incluyen estudios post mortem en busca de alteraciones del receptor en diferentes áreas del cerebro [Albert, 2012], pruebas farmacológicas (empleando modelos sanos de animales tratados con antidepresivos), análisis de neuroimagen (PET) y ensayos genéticos [Savitz y Drevets, 2009].

En estudios de estrés temprano [Bravo y cols., 2014], ansiedad y estrés crónico [Berumen y cols., 2012], enfermedades neurodegenerativas como Parkinson [Dupre y cols., 2013], desórdenes psiquiátricos como trastorno bipolar o esquizofrenia [Selvaraj y cols., 2014] se han encontrado modificaciones y tendencia al incremento de éste receptor en zonas como corteza frontal y amígdala. Su participación en el trastorno depresivo mayor se asocia por su localización como autorreceptor, sugiriendo incremento de éste en los núcleos del rafe (figura 12) [Albert y cols., 2011] a causa del polimorfismo C(-1019)G que presenta en la región promotora que impide la unión de represores transcripcionales [Lemonde y col., 2003].

HTR1A C/C (-1019)/Normal



HTR1A G/G (-1019)/Depressed

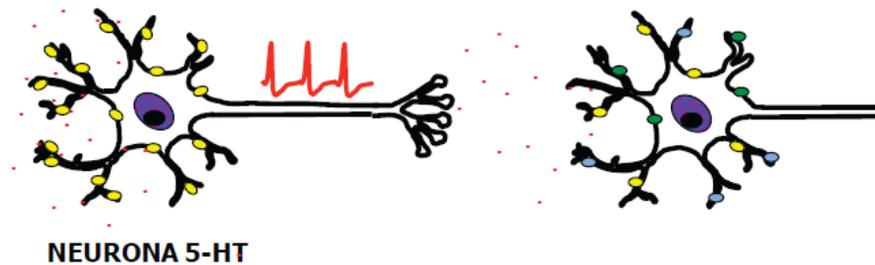


Figura 12.- Acción propuesta del receptor 5-HT_{1A} en los núcleos del rafe en personas con depresión mayor. Participación del polimorfismo de un solo nucleótido en el gen del receptor que puede provocar un incremento de los autorreceptores 5-HT_{1A} e inhibir la liberación de serotonina (puntos rojos). Tomado y modificado de Albert y cols., 2011.

Mannoury la Cour y colaboradores en 2006 en un estudio del receptor 5-HT_{1A} encontraron que se acoplan a varias proteínas G dependiendo de su localización en el cerebro y que bajo la acción de antidepresivos IRSS pueden tener una respuesta diferente; en hipocampo se ha observado una desensibilización de los receptores bajo el tratamiento prolongado con estos fármacos y en ratones knockout para el transportador de serotonina [Mannoury la Cour y cols., 2006].

Se ha encontrado que el tratamiento con IRSS provoca un incremento en los niveles del receptor en hipocampo, sin embargo también existe una disminución en el potencial de unión del receptor 5-HT_{1A} [Møller y cols., 2007]. En otras investigaciones se ha observado que el receptor 5-HT_{1A} tiene repercusión sobre el eje HPA pues por un lado en hipocampo promueve la expresión de

receptores de glucocorticoides y por otro lado en el hipotálamo favorece la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) [Jovanovic y cols., 2011], sin embargo no hay hasta la fecha análisis que relacionen directamente la participación del receptor en la zona hipocampal en el trastorno depresivo mayor.

1.8 Modelos depresivos

Para facilitar el estudio de esta y otras patologías el uso de modelos animales es de gran ayuda. Se han diseñado distintos modelos que mimetizan algunos procesos de estrés agudo o crónico y que pueden ser equiparados con síntomas de depresión. Los más utilizados son los murinos y comprenden entre otros: prueba de nado forzado [Sugimoto y cols., 2010] o algunas variantes y modificaciones de dicha prueba [Carabelli y cols., 2014; Nosedá y cols., 2014] y prueba de suspensión de la cola [McDevitt y cols., 2011; Yang y cols., 2014] que han servido para analizar el efecto de los antidepresivos sobre las conductas motoras [Sugimoto y cols., 2010]; existen también otros modelos para analizar este padecimiento destacando: modelos de exposición crónica a agentes estresantes [Haleem, 2011], hipofagia inducida, desamparo aprendido y bulbectomía olfatoria bilateral en rata (OBX) [Carr y Lucki., 2011; Pollak y cols., 2008].

1.8.1 Modelo de bulbectomía olfatoria bilateral

Los seres humanos se distinguen por ser ampliamente visuales, sin embargo, la mayoría de los animales, especialmente los mamíferos, dependen más del sentido del olfato para desarrollarse y reconocer su entorno [Leinwand y Calasani, 2011]. El sistema olfativo es muy importante en la respuesta y conducta materno-infantil [Feierstein, 2012], la regulación neuroendócrina, el control de emociones como la respuesta agresiva o predatoria, y otras funciones cotidianas como el reconocimiento del alimento y su asociación con el sentido del gusto [Song y Leonard, 2005].

Éste sistema, como otros es capaz de identificar e intensificar el estímulo percibido [Leinwand y Chalasani, 2011], se encuentra innervado desde la periferia hasta el cerebro, el circuito básico del sistema olfatorio (figura 13) comienza con las neuronas sensoriales olfatorias en el epitelio olfatorio, sus axones proyectan hacia el bulbo olfatorio (OB), de este núcleo las neuronas proyectan hacia la región ventro-lateral del telencéfalo formando el tracto lateral olfatorio (LOT), y éstas hacia distintas zonas del cerebro [De Castro, 2009].

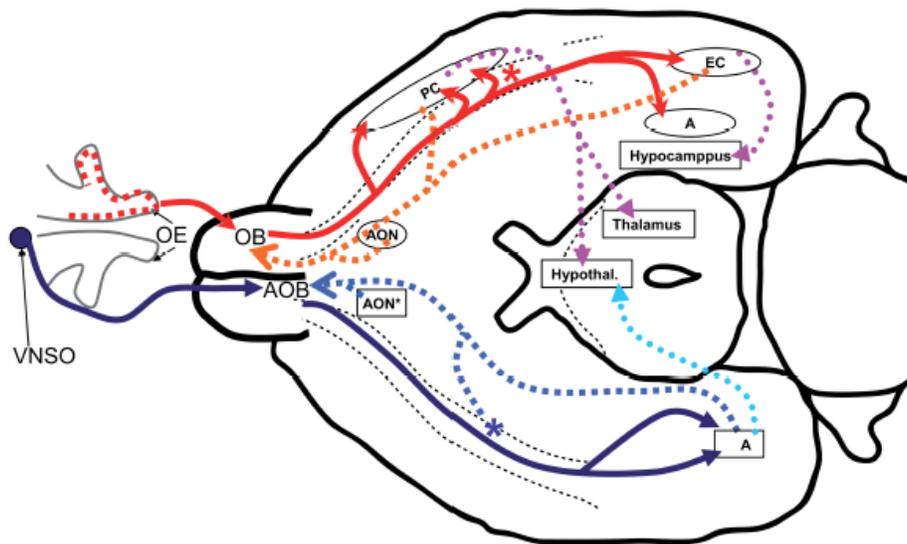


Figura 13.- Esquema general de conexiones del sistema olfatorio y sistema olfatorio accesorio. En rojo se muestran las proyecciones que empiezan en las neuronas sensoriales olfatorias. Las neuronas que proyectan del órgano vomeronasal (VNSO) hacia el bulbo olfatorio accesorio (AOB) se muestran en azul. Las conexiones intercorticales con núcleos de interés están marcadas en morado y celeste. Epitelio olfatorio (OE), bulbo olfatorio (OB), corteza piriforme (PC), corteza entorrinal (EC), amígdala (A). Fuente: De Castro, 2009.

El modelo OBX es uno de los preferidos para estudiar la depresión y un buen modelo para el trastorno depresivo mayor, debido a que el hecho de remover los bulbos olfatorios resulta en cambios conductuales reminiscentes de varios síntomas de la depresión, incluyendo disfunciones en el aprendizaje y la memoria, conducta de evasión alterada, anhedonia (característica del trastorno depresivo mayor) y cambios en la conducta motora en campo abierto como hiperactividad

que puede observarse a partir del día 10 después de la cirugía [Arias-Carrión y cols., 2007; De Castro, 2009; Carr y Lucki., 2011; Galecki y cols., 2010; Imai y Sakano, 2011; Kupfer y cols., 2012; Ekinci y cols., 2012; Riezen y cols., 1977; Roche y cols., 2007; Sanchez-Andrade y Kendrick, 2009; Song y Leonard, 2005; Wang y cols., 2010].

Con ayuda del modelo OBX Slotkin y colaboradores observaron que la respuesta ante la bulbectomía olfatoria es dependiente de la edad de la rata y por lo tanto es un factor importante a considerar para quienes trabajen con este modelo [Slotkin y cols., 1999; Oba y cols., 2013; Primeaux y cols., 2007].

2 JUSTIFICACIÓN

El trastorno depresivo mayor (TDM) afecta a una gran cantidad de personas en el mundo, actualmente se ha incrementado alarmantemente afectando a jóvenes entre 15 y 24 años. El progreso de esta enfermedad tiene consecuencias graves y hasta letales pues más del 16% de los pacientes tienen tendencias suicidas. Hasta la fecha los mecanismos moleculares implicados en el trastorno depresivo mayor, que funcionan como blancos terapéuticos no son del todo conocidos.

Se ha demostrado la participación del sistema serotoninérgico en este proceso por lo que las terapias clásicas y alternativas actuales involucran diversos fármacos, destacando a los inhibidores de la recaptura selectiva de la serotonina (IRSS) que se han utilizado como terapia de elección en pacientes con TDM, sin embargo, dado que existen reportes de que la terapia no resulta del todo funcional, se sugiere una alteración en los receptores de serotonina.

Debido a su localización, amplia distribución y función en el sistema nervioso central, el principal receptor involucrado en este proceso es el 5-HT1A, debido a que se encuentra abundantemente en regiones cortico-límbicas, las cuales se asocian a la conducta, las emociones y los trastornos del humor; este trabajo se enfoca en la participación del receptor 5-HT1A en el hipocampo utilizando el modelo OBX y analizando si existen variaciones en la expresión y su posible función.

3 HIPÓTESIS

El receptor 5-HT1A altera su expresión en el hipocampo en el modelo de bulbectomía olfatoria bilateral en rata, como proceso depresivo mayor.

4 OBJETIVOS

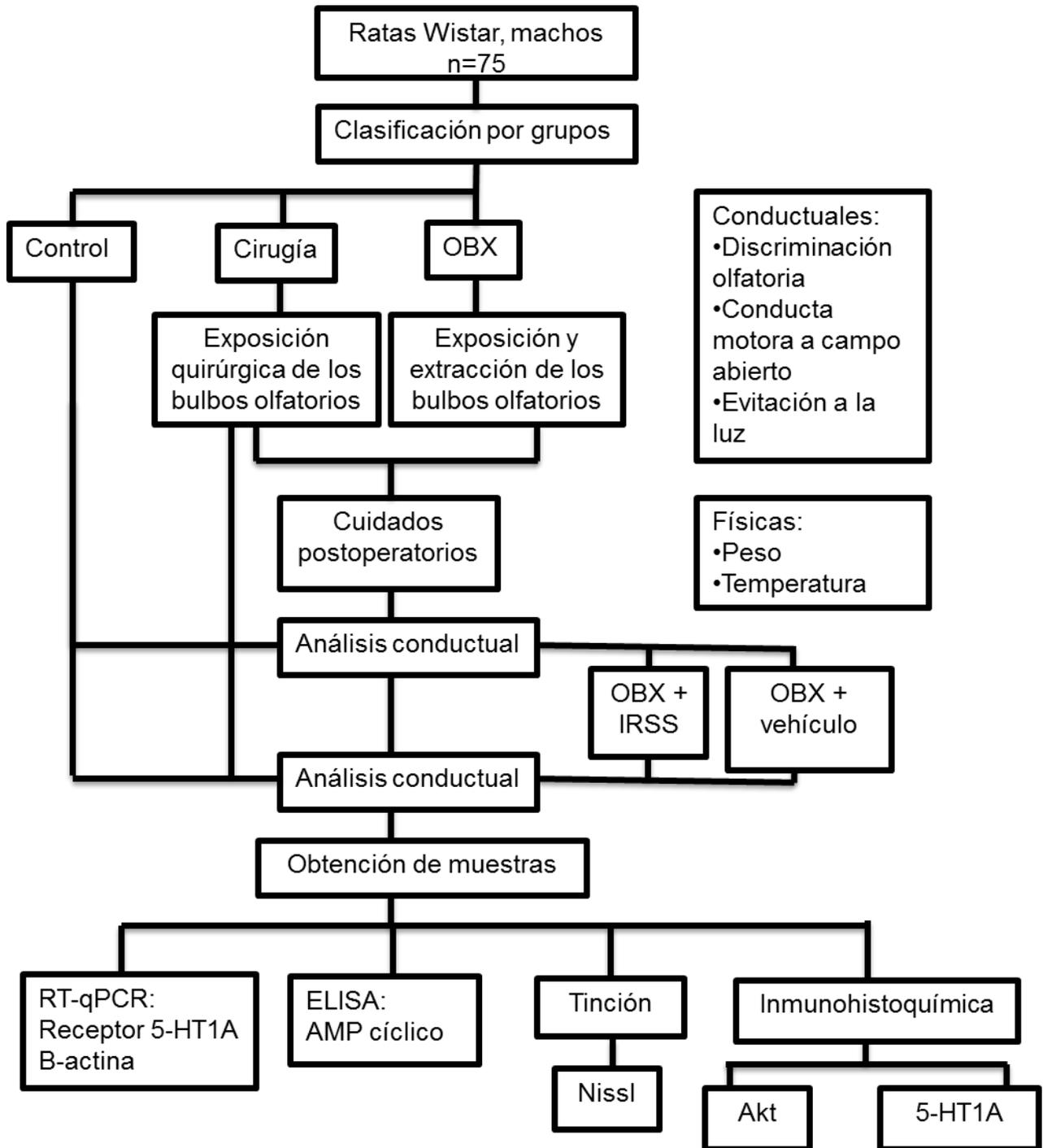
4.1 General

Analizar al receptor 5-HT1A en el trastorno depresivo mayor en rata

4.2 Particulares

1. Analizar a la discriminación olfatoria como prueba de anosmia en ratas OBX respecto de ratas control y cirugía sin extracción.
2. Analizar los patrones de conducta motora en el modelo de campo abierto comparando ratas OBX respecto de ratas OBX administradas con antidepresivos, control y cirugía sin extracción.
3. Evaluar la respuesta de evitación a la luz en ratas OBX, OBX tratadas con antidepresivos, controles y cirugía sin extracción.
4. Evaluar los niveles del mRNA del receptor 5-HT1A en el hipocampo de los grupos control, cirugía, OBX y tratados.
5. Estudiar si existen variaciones en los niveles proteicos del receptor 5-HT1A en el hipocampo de los diferentes grupos estudiados.
6. Analizar vías de señalización implicadas con el receptor 5-HT1A en ratas control, cirugía, OBX y OBX administradas con antidepresivos.

5 DIAGRAMA DE TRABAJO



6 METODOLOGÍA

6.1 Animales

Se solicitaron al bioterio Claude Bernard ratas machos de la cepa Wistar con un peso entre 250 g y 300 g, sin muestras de patologías o alteraciones físicas. Fueron clasificadas en cinco grupos: control (C), cirugía (S), OBX, OBX administrados con vehículo (OBX+V) y OBX administrado con antidepresivo (OBX+A); se mantuvieron en condiciones óptimas de temperatura y humedad, con ciclos de luz obscuridad de 12/12 [Oba y cols., 2013; Wann y cols., 2009] y acceso a agua y alimento *ad libitum*. Se seleccionaron aleatoriamente 15 animales por grupo. Una vez realizadas las pruebas conductuales de todos los grupos a los tiempos indicados se procedió al sacrificio de cada animal para la extracción del cerebro que se guardó en frascos con formalina al 10% en PBS, o disección de núcleos obtenidos en tubos herméticos de 1.5 ml. Todos los procedimientos siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” de México, aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

6.2 Bulbectomía olfatoria bilateral en ratas de la cepa Wistar

Para el grupo denominado OBX se realizó el siguiente protocolo quirúrgico: se empleó como anestesia una mezcla de Ketamina/Xilazina (0.2 ml por 100g de peso) proporcionada por los veterinarios del bioterio Claude Bernard; una vez anestesiado, se rasuró el pelo de la cabeza procurando no arrasar las vibrisas ni lesionar los ojos. Se posicionó y sujetó al animal en el aparato estereotáxico, colocando un colchón de toallas absorbentes para amortiguar el descenso de temperatura. Ya posicionado se procedió el embrocado de la piel del cráneo con benzal al 20%, limpiando la zona en una sola dirección. Se hizo una incisión justo en medio de la cabeza, separando la piel para dejar expuesto el periostio que se retiró por fricción con el bisturí. Se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno para contrarrestar el sangrado secando con algodón estéril el exceso de líquido.

Una vez retirado el periostio, se localizó la altura de los bulbos olfatorios, realizando varias pruebas hasta obtener las coordenadas adecuadas, con base a lo reportado por Kelly y colaboradores en 1997. Se realizaron dos huecos de aproximadamente 2 mm de diámetro con ayuda de un taladro con fresa; para extraer los bulbos olfatorios primero se removió el tejido con una pinza de microcirugía y posteriormente se succionó con una cánula adaptada. Se utilizó esponja quirúrgica (Gelfoam) para realizar hemostasia y al mismo tiempo sirviera para rellenar los huecos; finalmente se procedió a suturar. Terminada la cirugía, se desmontó a la rata del aparato y administró vía subcutánea 0.05 ml/100g de Ketoprofeno (analgésico) y 0.3 ml/100g de solución salina isotónica, se colocaron en un colchón cálido para su recuperación. Terminado el efecto del anestésico se le administró a cada rata 1 ml de solución glucosada y se mantuvo en vigilancia constante. Se les administró como medida profiláctica 40000 UI/Kg de Penicilina vía intramuscular para evitar infecciones [Oba y cols., 2013; Wann y cols., 2009; Slotkin y cols., 1999] durante 7 días posteriores a la cirugía. Los grupos que fueron administrados con antidepresivos y vehículo recibieron el mismo proceso quirúrgico. Los animales del grupo cirugía fueron sometidos al proceso de exposición de los bulbos olfatorios pero sin extraer el tejido, los cuidados postoperatorios fueron similares al grupo OBX.

6.3 Pruebas conductuales

Tres semanas posteriores al proceso quirúrgico [Slotkin y cols., 1999] se evaluaron a los animales. Para tener resultados preliminares de que la extracción de los bulbos olfatorios se llevó a cabo de manera exitosa se realizó la prueba de discriminación olfatoria con un estímulo oloroso (galletas que contenían chispas de chocolate) [Riezen y cols., 1977] (ver ANEXO 3); se emplearon las ratas OBX que no respondieron al estímulo o lo hicieron en un periodo tardío respecto a los controles (datos corroborados por craneotomía al final de las pruebas). Se realizó también la prueba de evitación de la luz, colocando al animal en una caja especial que contiene una división de tal manera que exista una zona de oscuridad y una de luz (ANEXO 3). Como parte de la caracterización del modelo se realizó la

prueba de conducta motora en el modelo de campo abierto evaluando acicalamiento, conducta erguida, conducta inmóvil, exploración interna y externa (actividad horizontal) [Kelly y cols., 1997; Wang y cols., 2010]. Posterior a estas pruebas se procedió a realizar la administración de un antidepresivo del tipo IRSS (fluoxetina 0.8 mg/Kg/día, vía oral) para obtener el grupo OBX+IRSS y el vehículo correspondiente (metilcelulosa 1%) para obtener el grupo OBX+V durante tres semanas más al final de las cuales se volvieron a realizar las pruebas conductuales en todos los grupos. Todos los animales fueron monitoreados en la temperatura corporal, así como pesados diariamente a partir tres días antes de la cirugía y hasta el día de eutanasia. Los animales incluidos en los análisis estadísticos corresponden a los seleccionados tras la verificación final de la ablación de bulbos olfatorios en la craneotomía.

6.4 Técnicas moleculares

6.4.1 Aislamiento de RNA total.

Se extrajo el RNA total de 35 mg de hipocampo de cada grupo a analizar por el método de Quick-RNA MiniPrep de Zymo Research utilizando el protocolo incluido por el proveedor (ANEXO 4). El RNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm, determinando su pureza utilizando las relaciones 260 nm/280 nm.

6.4.2 Retrotranscripción- qPCR

El RNA total adquirido de cada muestra fue llevado a una dilución de 100 ng/ μ l. Para la retrotranscripción y PCR en tiempo real se utilizó el método de iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit de BIORAD. Se utilizaron 2 μ l (200 ng) de RNA total y oligonucleótidos específicos (ANEXO 8) para cada gen a analizar. En la tabla 2 se encuentran las características de los oligonucleótidos utilizados y en la tabla 3 se muestra el resumen de reactivos empleados para la curva estándar y las muestras.

Tabla 2.- Diseño de oligonucleótidos para qPCR.

Gen	Oligonucleótido	Tipo	Longitud	Tm	Amplicón
5-HT1A	GGTACTGGGCTATCACC GACC	Fw	21 pb	65.3 °C	105 pb
	TGGAGATGAGAAAGCCA ATGAGCC	Rv	24 pb	65.2 °C	
B-actina	CAAGGCTGAGAATGGGA AGCTGG	Fw	23 pb	66.6 °C	88 pb
	ATCACCCCATTTGATCTT GACGGG	Rv	24 pb	65.2 °C	

Se determinó la expresión relativa del mensajero para el receptor 5-HT1A por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak y Schmittgen, 2001] adaptado a las condiciones del aparato de PCR en tiempo real (Pikoreal software 2.2).

Tabla 3.- Componentes de reacción de RT-qPCR

Componente	Volumen de reacción
Mezcla de reacción iTaq Universal SYBR Green	7.5 µl
Transcriptasa inversa iScript	0.2 µl
Oligonucleótidos (sentido y antisentido)	1 µl (c/u)
RNA (Diferentes concentraciones)	Variable
Agua libre de nucleasas	Variable
Volumen de total de reacción	15 µl

6.5 Inmunohistoquímica

Se seccionaron los cerebros para ser almacenados en una solución de formalina al 10% en PBS para fijar el tejido, se cortaron secciones coronales de 3 mm y fueron incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 20 micras en el micrótopo, se recolectaron en portaobjetos con polilisina y se dejaron secar. Se

seleccionaron laminillas de cada grupo a analizar. La inmunohistoquímica (ANEXO 5) se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para inactivar a las peroxidasas endógenas, para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó albúmina de suero de bovino libre de IgG al 1%, se utilizaron anticuerpos primarios específico para el receptor 5-HT1A y Akt respectivamente; se incubaron por 48 y 24 h a 4°C, el anticuerpo secundario se incubó por 1 h a temperatura ambiente después de adicionar Biotina. Para revelar la reacción colorimétrica se utilizó di amino bencidina (DAB) durante 1 minuto. Se enjuagó y contra tiñó con hematoxilina durante 1 minuto. Se montaron las laminillas y se dejó secar la resina por 48 horas antes de observar al microscopio [Kindt y cols., 2007].

6.6 Determinación de AMP cíclico

Debido a que una de las enzimas sobre las que ejerce acción el receptor 5-HT1A es la adenilato ciclasa se realizó la determinación de los niveles de cAMP en las muestras de hipocampo para evaluar si existen diferencias respecto a los controles. Una vez extraído el tejido permaneció en congelación (-70°C) para evitar que el AMP cíclico fuera metabolizado. Se pesaron 30 mg de tejido que fueron pulverizados en nitrógeno líquido, se adicionó 1 ml de diluyente por cada 100 mg de tejido e incubó durante 10 minutos en hielo. Se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm y obtuvo el sobrenadante, se conservó la muestra en congelación hasta su procesamiento. El ensayo se realizó con base a las especificaciones del protocolo comercial del kit “Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay” de Arbor Assays (ANEXO 6).

6.7 Tinción de Nissl

Se seccionaron los cerebros para ser almacenados en una solución de formalina al 10% en PBS para fijar el tejido, el cuál posteriormente fue cortado en secciones coronales de 25 micras recolectadas en laminillas gelatinizadas. Se procedió a la tinción de Nissl (ANEXO 7) para evaluar por microscopía si existe

cambios en la densidad celular en el área del hipocampo [Chaparro y cols., 2013], pues al realizar la bulbectomía olfatoria se ven afectadas áreas como corteza frontal, amígdala, corteza entorrinal e hipocampo, que forman parte de la comisura anterior como las principales proyecciones intracorticales del sistema olfatorio [De Castro, 2009].

7.- RESULTADOS

7.1 Bulbectomía olfatoria bilateral en ratas de la cepa Wistar

Las coordenadas para la zona de lesión fueron optimizadas para ratas de la cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso. En la tabla 4 se presenta un resumen de las coordenadas propuestas y el resultado obtenido. En todos los casos se realizaron trepanaciones de 2 mm de diámetro. Las coordenadas exitosas corresponden al experimento 4.

Tabla 4.- Optimización de las coordenadas para la zona de lesión en ratas de la cepa Wistar.

Estandarización	AP	L	P	Observaciones
1	6 mm (anterior a Bregma)	±2.5 mm	1 mm	Se lesionó la corteza frontal.
2	7 mm (anterior a Bregma)	±2.5 mm	1 mm	Se lesionó el epitelio olfatorio.
3	6.4 mm (anterior a Bregma)	±2.5 mm	1 mm	Faltó profundidad.
4	6.4 mm (anterior a Bregma)	±2.5 mm	1.9 mm	Lesión de bulbos olfatorios exitosa.

7.2 Peso

Los grupos fueron pesados constantemente y el registro se encuentra en la figura 14. Los animales a los que se les realizó la ablación de los bulbos olfatorios presentaron una disminución de peso respecto del grupo control (C) de $15.24 \pm 1.27\%$ para el grupo OBX, $14.66 \pm 1.03\%$ para el grupo OBX+V y $10.51 \pm 1.81\%$ para el grupo OBX+A; en comparación con el grupo cirugía sin extracción (S) se encontraron disminuciones de $12.28 \pm 1.3\%$, $11.68 \pm 1.06\%$ y $7.37 \pm 1.87\%$ respectivamente. La máxima diferencia se encontró en el día 15

posterior a la cirugía con una disminución global de los animales bulbectomizados de $18.06 \pm 1.24\%$ respecto al grupo C y $14.19 \pm 1.3\%$ respecto al grupo S.

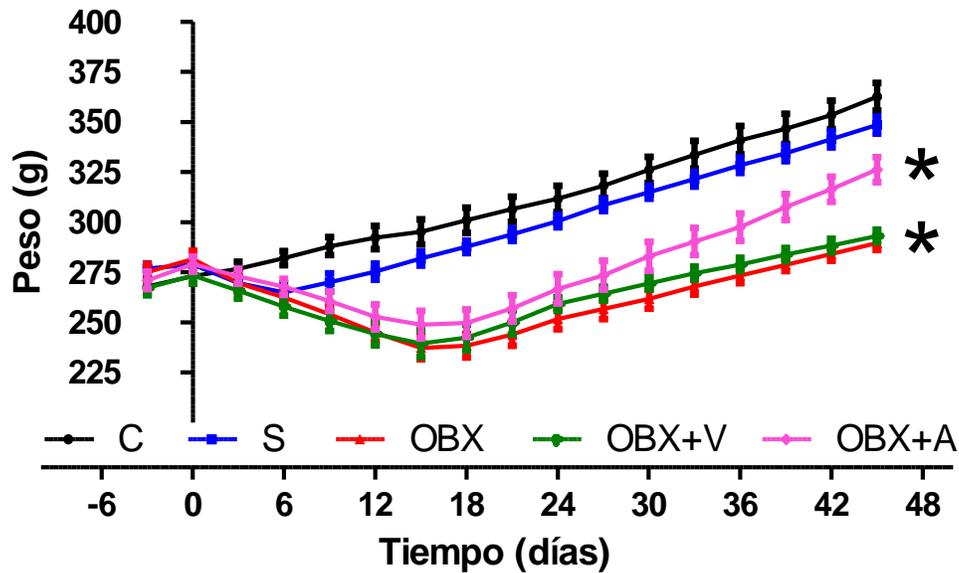


Figura 14.- Efecto de la bulbectomía olfatoria bilateral sobre el peso en ratas de la cepa Wistar. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=10 por grupo. ANOVA de una vía, *p<0.001.

7.3 Temperatura

La temperatura corporal fue medida cada dos días a lo largo de todo el trabajo. En la figura 15 se muestra el registro de las temperaturas a lo largo del proyecto. No se encontraron cambios estadísticamente significativos en la medición de la temperatura corporal en los distintos grupos analizados.

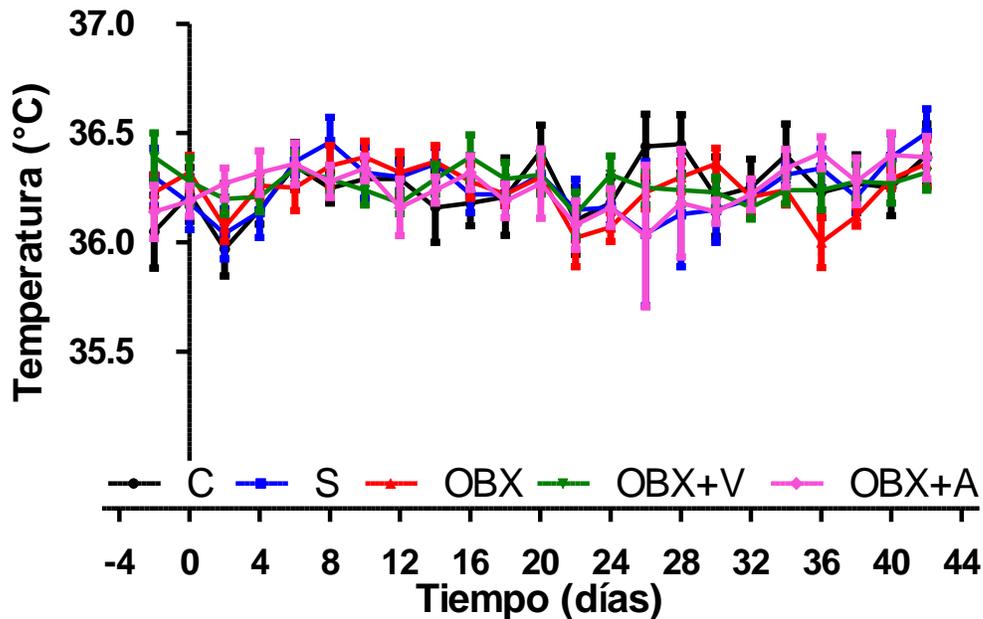


Figura 15.- Efecto de la bulbectomía olfatoria bilateral sobre la temperatura corporal en ratas de la cepa Wistar. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=10 por grupo.

7.4 Discriminación olfatoria

En la figura 16 se observan las dos fases de evaluación de la prueba de discriminación olfatoria preliminar, en la cual se incluyen los datos de los animales que fueron incluidos tras la verificación por craneotomía (ANEXO 8). La primera fase de prueba (figura 16 A), llevada a cabo 21 días posteriores a la cirugía mostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos C y S, también que los animales del grupo OBX presentan un incremento en el tiempo de reconocimiento del estímulo oloroso de $471.76 \pm 73.95\%$ en comparación con el grupo C y $451.39 \pm 71.39\%$ con el grupo S; el grupo que fue seleccionado para ser posteriormente OBX+V presentó un incremento de $427.44 \pm 61.89\%$ y $408.65 \pm 59.69\%$ respecto a los mismos grupos, mientras que el grupo que sería OBX+A presentó un incremento de $468.88 \pm 61.5\%$ y $448.6 \pm 59.31\%$. Después de la administración con fluoxetina (figura 16 B) esta diferencia se mantuvo, mostrando

un incremento del tiempo de reconocimiento al estímulo oloroso de $451.88 \pm 49.54\%$ en el grupo OBX, $387.65 \pm 66.14\%$ en el grupo OBX+V y $382.61 \pm 61.91\%$ en el grupo OBX+A con respecto al C; en comparación con el grupo S el incremento fue de $438.32 \pm 48.32\%$ para el grupo OBX, $375.67 \pm 64.52\%$ para el grupo OBX+V y $370.76 \pm 60.39\%$ para el grupo OBX+A.

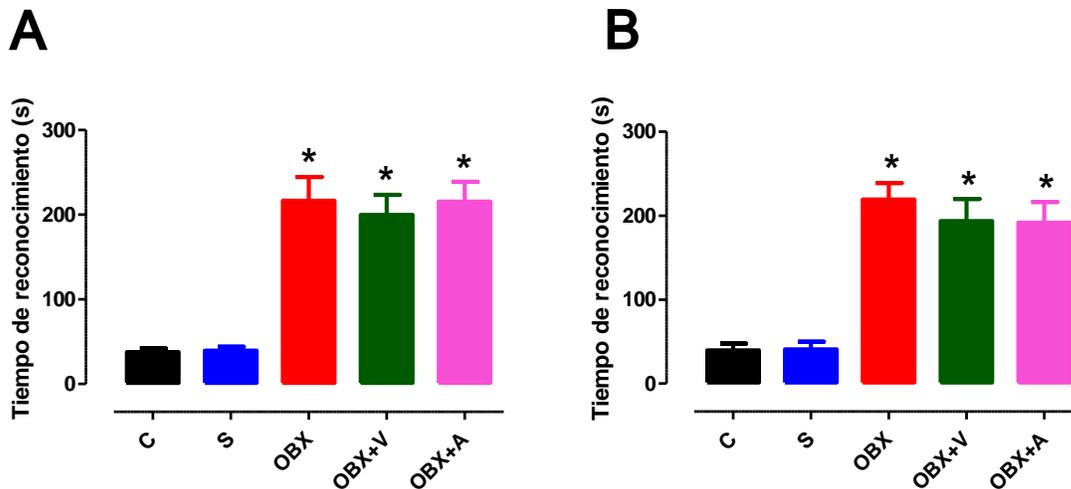


Figura 16.- Prueba de discriminación olfatoria. A) Fase uno de selección. B) Fase dos, posterior al tratamiento con fluoxetina. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=10 por grupo.

7.5 Evitación a la luz

En esta prueba se evaluó el tiempo de latencia para escapar o evadir un estímulo adverso moderado. En la primera fase pos grupos C y S tuvieron un tiempo promedio de 11.6 y 10 segundos respectivamente, lo que no representó diferencia estadísticamente significativa. El grupo OBX incrementó el tiempo de latencia en esta prueba con un aumento de $500.86 \pm 111.2\%$ en comparación con el grupo C y de $597 \pm 129\%$ con el grupo S; el grupo OBX+V presentó un incremento de $690.51 \pm 124.48\%$ y $817 \pm 144.4\%$ respectivamente; por su parte el grupo OBX+A un incremento de $501.72 \pm 91.63\%$ y $598 \pm 106.3\%$ en comparación con los mismos grupos; estos datos se muestran en la figura 17 A.

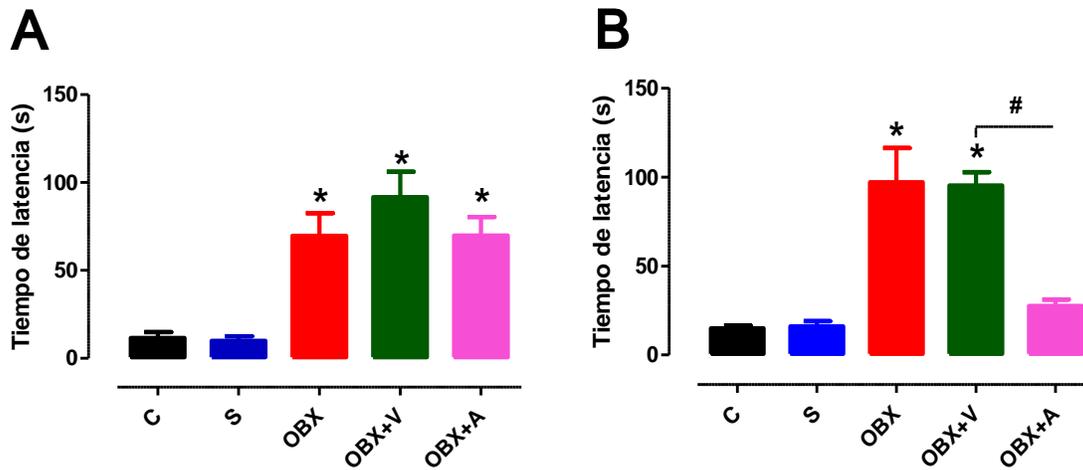


Figura 17.- Prueba de evitación a la luz. A) Fase uno 21 días post quirúrgicos. B) Fase dos, posterior al tratamiento con fluoxetina. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. t-Student OBX+V y OBX+A, # $p < 0.05$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. $n=10$ por grupo.

En la segunda fase de la prueba, después de la administración con fluoxetina (figura 17 B) el grupo OBX+A no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos C y S, en cambio se observó una disminución de $71.55 \pm 3.68\%$ en comparación con el grupo OBX y $71 \pm 3.75\%$ con el grupo OBX+V; por su parte el grupo OBX mantuvo un incremento de $551 \pm 130\%$ respecto a C y $506 \pm 121.06\%$ respecto a S; el grupo OBX+V tuvo un incremento de $538.92 \pm 50.82\%$ y $495 \pm 47.33\%$ en comparación con los grupos C y S respectivamente. Estos resultados se muestran en la figura 16 B.

7.6 Actividad motora en el modelo de campo abierto

7.6.1 Actividad horizontal

La actividad horizontal se cuantificó por el número de cuadros visitados en el aparato de trabajo durante cinco minutos. En la primera fase de la prueba (figura 18 A) se observó un incremento del número de cuadros visitados por todos los animales que fueron bulbectomizados respecto del control y cirugía. El grupo OBX incrementó $83.6 \pm 10.68\%$ respecto al grupo C y $79.48 \pm 10.44\%$ del grupo S; el grupo OBX+V incrementó en número de cuadros visitados $99.01 \pm 8.89\%$ y $94.55 \pm 8.69\%$ mientras que el grupo OBX+A presentó un incremento de $89.83 \pm 10.69\%$ y $85.57 \pm 10.45\%$ en comparación con los mismos grupos.

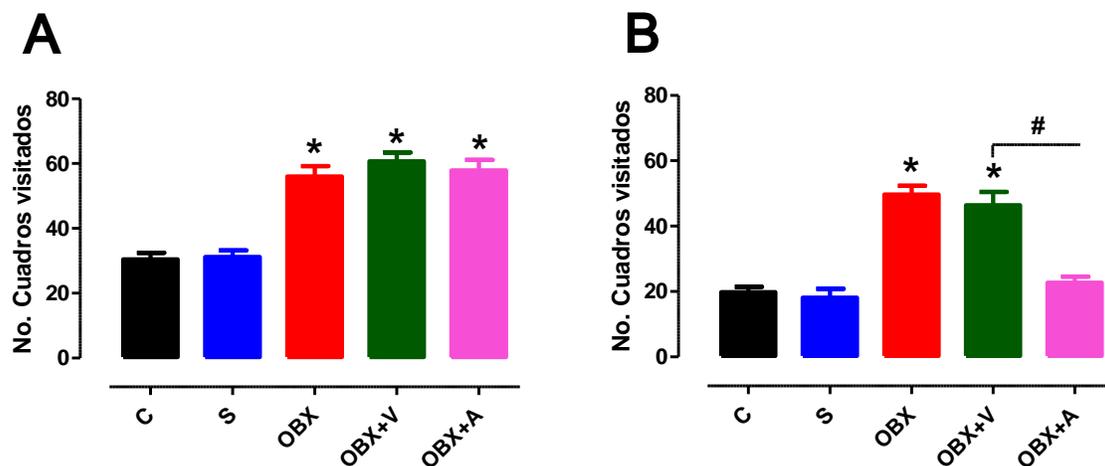


Figura 18.- Actividad horizontal en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepressivos. Representada por el número de cuadros visitados en un periodo de tiempo. A) Fase 1. B) Fase 2. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. t-student OBX+V y OBX+A, # $p < 0.05$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. $n=10$ por grupo.

Después del tratamiento con antidepressivos (figura 18 B) el grupo OBX+A disminuyó $51.07 \pm 4.03\%$ con respecto al grupo OBX+V y $54.33 \pm 3.77\%$ con respecto al OBX; por otro lado no presentó diferencias estadísticamente significativas con los grupos C y S. Los grupos OBX y OBX+V mantuvieron la

diferencia encontrando un incremento de $151.01 \pm 13.23\%$ y $134.34 \pm 20.77\%$ respecto al grupo C y $174.58 \pm 14.48\%$ y $156.35 \pm 22.72\%$ con respecto al grupo S.

7.6 2 Conducta estática

La conducta estática está inversamente relacionada a la actividad horizontal. En la primera fase se encontró un incremento en las ratas con bulbectomía. El grupo OBX presentó una reducción de $45.31 \pm 4.68\%$ en comparación con el grupo C y $41.66 \pm 5\%$ en comparación con el grupo S; el grupo OBX+V tuvo una reducción de $50 \pm 4.68\%$ y $45 \pm 5\%$ respecto a los mismos grupos, por su parte, el grupo OBX+A observó una reducción de $46.87 \pm 4.68\%$ en comparación con C y $43.33 \pm 5\%$ con S. Estos resultados se muestran en la figura 19 A.

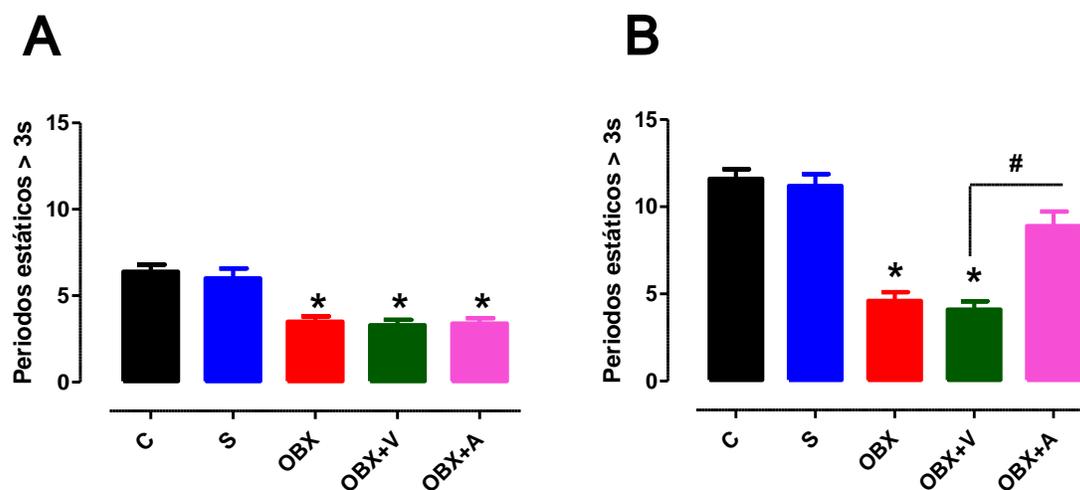


Figura 19.- Actividad estática en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepressivos. Representada por el número de periodos estáticos mayores a 3 segundos. A) Fase 1. B) Fase 2. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. t-Student OBX+V y OBX+A, # $p < 0.05$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=10 por grupo.

En la segunda fase de la prueba, tras el tratamiento con fluoxetina (figura 19 B) el grupo OBX+A no presentó diferencias estadísticamente significativas con

los grupos C y S, y presentó un aumento de $93.47 \pm 18.07\%$ en comparación con el grupo OBX y $117.07 \pm 20.24\%$ en comparación con el grupo OBX+V. Por su parte los grupos OBX y OBX+V mantuvieron la diferencia encontrando una reducción de $60.34 \pm 4.22\%$ y $64.65 \pm 4.13\%$ respecto al grupo C y $58.92 \pm 4.37\%$ y $63.39 \pm 4.28\%$ con respecto al grupo S.

7.6.3 Número de erguidos

En este rubro de la prueba de campo abierto no se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante la primera fase de esta prueba, sin embargo se observó una ligera tendencia al incremento en los animales bulbectomizados. En la segunda fase de la prueba el grupo OBX+V tiene diferencia significativa con un aumento de $54.38 \pm 9.8\%$ en comparación con el grupo control; por su parte el grupo OBX+A, después del tratamiento con fluoxetina, mostró una disminución respecto al grupo OBX+V de $36.93 \pm 6.64\%$, mientras que con el grupo OBX se observa una disminución que no es significativa estadísticamente. Los resultados de esta prueba se muestran en la figura 20.

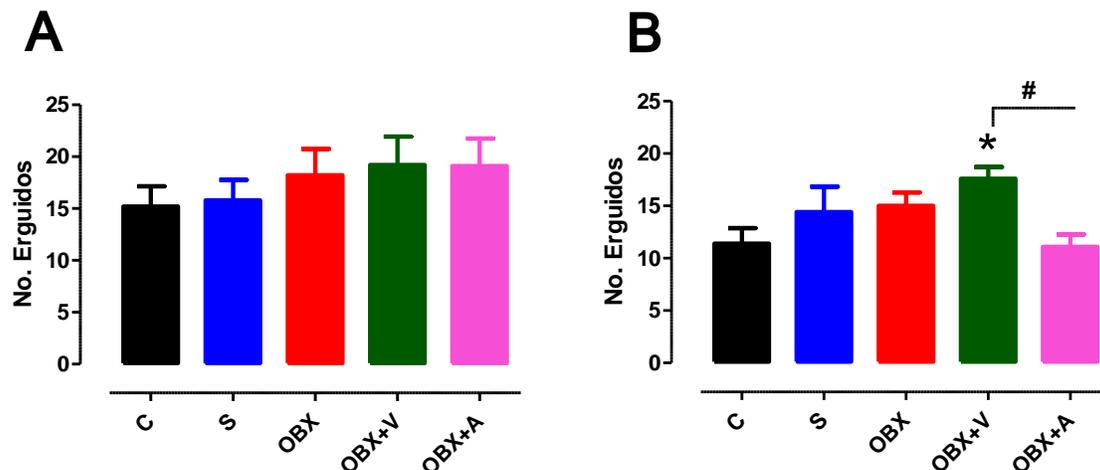


Figura 20.- Número de erguidos en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepressivos. Representada por el número de erguidos en un periodo de tiempo. A) Fase 1. B) Fase 2. ANOVA de una vía, post-hoc Dunnett, * $p < 0.05$. t-student OBX+V y OBX+A, # $p < 0.05$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=10 por grupo.

7.6.4 Acicalamiento

En el modelo de campo abierto se evalúa el desempeño conductual de los animales durante un periodo de tiempo determinado, éstas conductas pueden alterarse y mostrar patrones específicos en alguna patología, como es el caso del acicalamiento. En la figura 21 se encuentran los resultado de esta prueba.

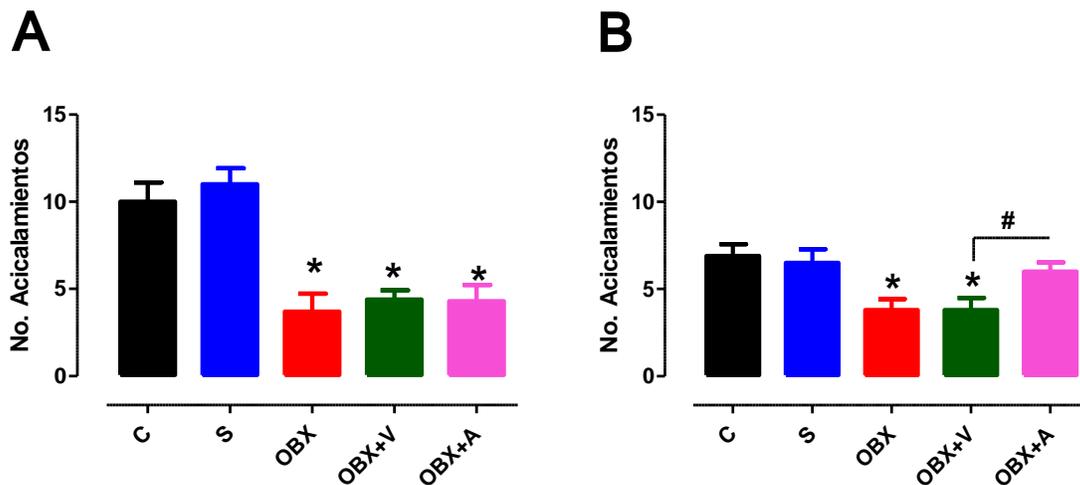


Figura 21.- Acicalamiento en el modelo OBX antes y después del tratamiento con antidepresivos. A) Fase 1. B) Fase 2. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. t-Student, OBX+V y OBX+A, # $p < 0.05$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=10 por grupo.

En la primera fase de pruebas (figura 21 A) se encontró una disminución en el número de acicalamientos del grupo OBX de $63 \pm 10.2\%$ y $66.36 \pm 9.27\%$ respecto de los grupos C y S; el grupo OBX+V presentó una reducción de $56 \pm 5.2\%$ y $60 \pm 4.72\%$, mientras que el grupo OBX+A una disminución de $57 \pm 9.3\%$ y $60.9 \pm 8.45\%$ respecto a los mismos grupos.

Posterior a la administración de fluoxetina (figura 21 B), el grupo OBX+A no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto de los grupos C y S, en cambio mostró un aumento con los grupos OBX y OBX+V de $57.89\% \pm 13.94\%$. Los grupos OBX y OBX+V mantuvieron las diferencias con una disminución de $60.34 \pm 4.22\%$ y $64.65 \pm 4.13\%$ respecto al grupo C y $58.92 \pm 4.37\%$ y $63.39 \pm 4.28\%$ respecto al grupo S.

7.7 Niveles de RNA mensajero del receptor 5-HT1A

Una vez que recolectaron las muestras de hipocampo en tubos eppendorff estériles y con RNAsa ZAP se mantuvieron en congelación a -70°C hasta que se aisló el RNA total de las muestras. Se procedió a realizar el análisis de los niveles de mensajero del receptor 5-HT1A por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). Para determinar la eficiencia de los oligonucleótidos y la concentración adecuada de RNA total a utilizar se realizó primero una curva de eficiencia.

7.7.1 Curva de eficiencia de los genes β -actina y 5-HT1A

Uno de los métodos más empleados para el análisis de expresión de un gen es mediante la expresión relativa de su mensajero; para éste análisis se utilizan los ciclos umbrales Ct que por características del equipo utilizado en este trabajo se denomina Cq. Se probó la eficiencia de los oligonucleótidos utilizando las siguientes concentraciones de RNA total: 50, 100, 200 y 400 ng; se utilizó la metodología iTaq Universal SYBR Green One-Step y el diseño de oligonucleótidos proporcionado por T4nanoDX. En la figura 22 se muestran los resultados de la curva, observando una eficiencia del 96% para ambos genes (figura 22 A) y una pendiente en la curva ΔCq de -0.001 (figura 22 B).

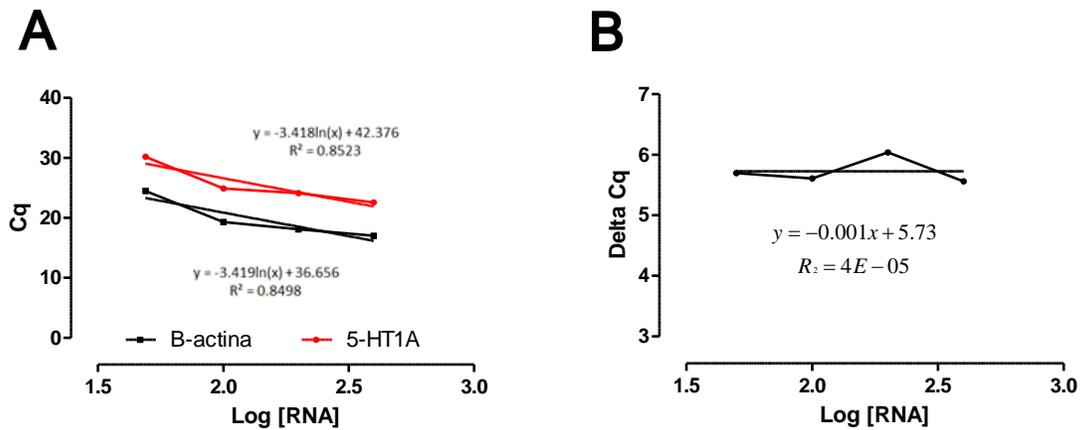


Figura 22.- Curva de eficiencia de oligonucleótidos y [RNA]. A) Curva de eficiencia de los oligonucleótidos diseñados que muestra los ciclos umbrales (Cq) de cada uno de los productos de PCR a diferentes concentraciones de RNA total. B) Curva de eficiencia de amplificación que muestra el ΔCq de los genes analizados a diferentes concentraciones de RNA total.

7.9.2 Expresión relativa del receptor 5-HT1A

Se realizaron 5 réplicas biológicas y tres técnicas de cada grupo por cada gen a analizar obteniendo un total de 150 reacciones de PCR. No se encontró diferencia estadísticamente significativa.

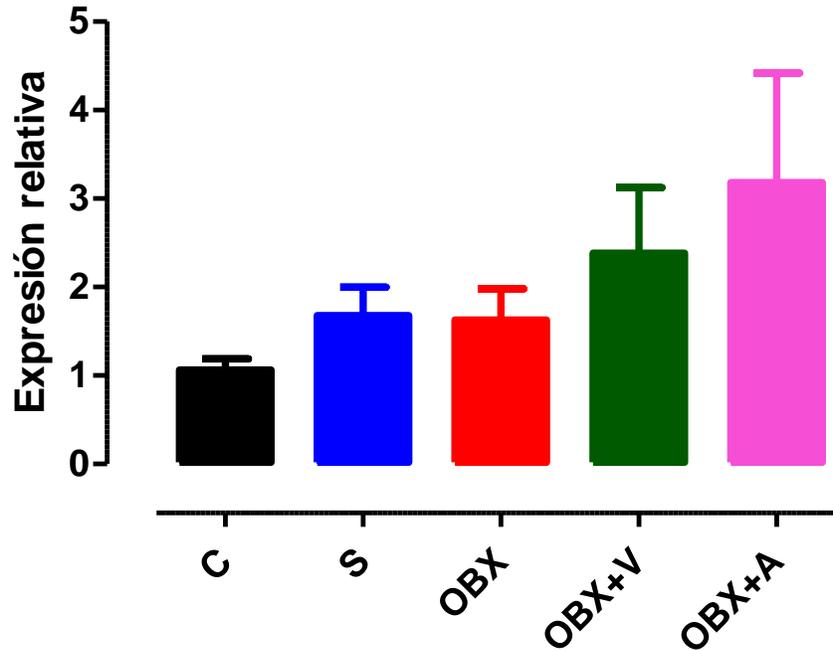


Figura 23.- Expresión relativa del receptor 5-HT1A. Análisis por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=5 por grupo.

7.8 Inmunohistoquímicas

Se sabe que el receptor 5-HT1A se encuentra abundantemente en el sistema límbico; se corroboró su presencia en el hipocampo mediante una inmunohistoquímica utilizando anticuerpos para el receptor; para comparar los resultados obtenidos se analizó el factor Akt que se incrementa por la activación del receptor.

7.8.1 Receptor 5-HT1A en el hipocampo

El análisis a la marca del receptor 5-HT1A mostró que el 100% de las células en la zona CA1, CA3 y giro dentado son positivas a esta marca (figura23).

Se realizó un análisis densitométrico de cada zona encontrando diferencias estadísticamente significativas en los grupos OBX y OBX+V sólo en la zona CA1.

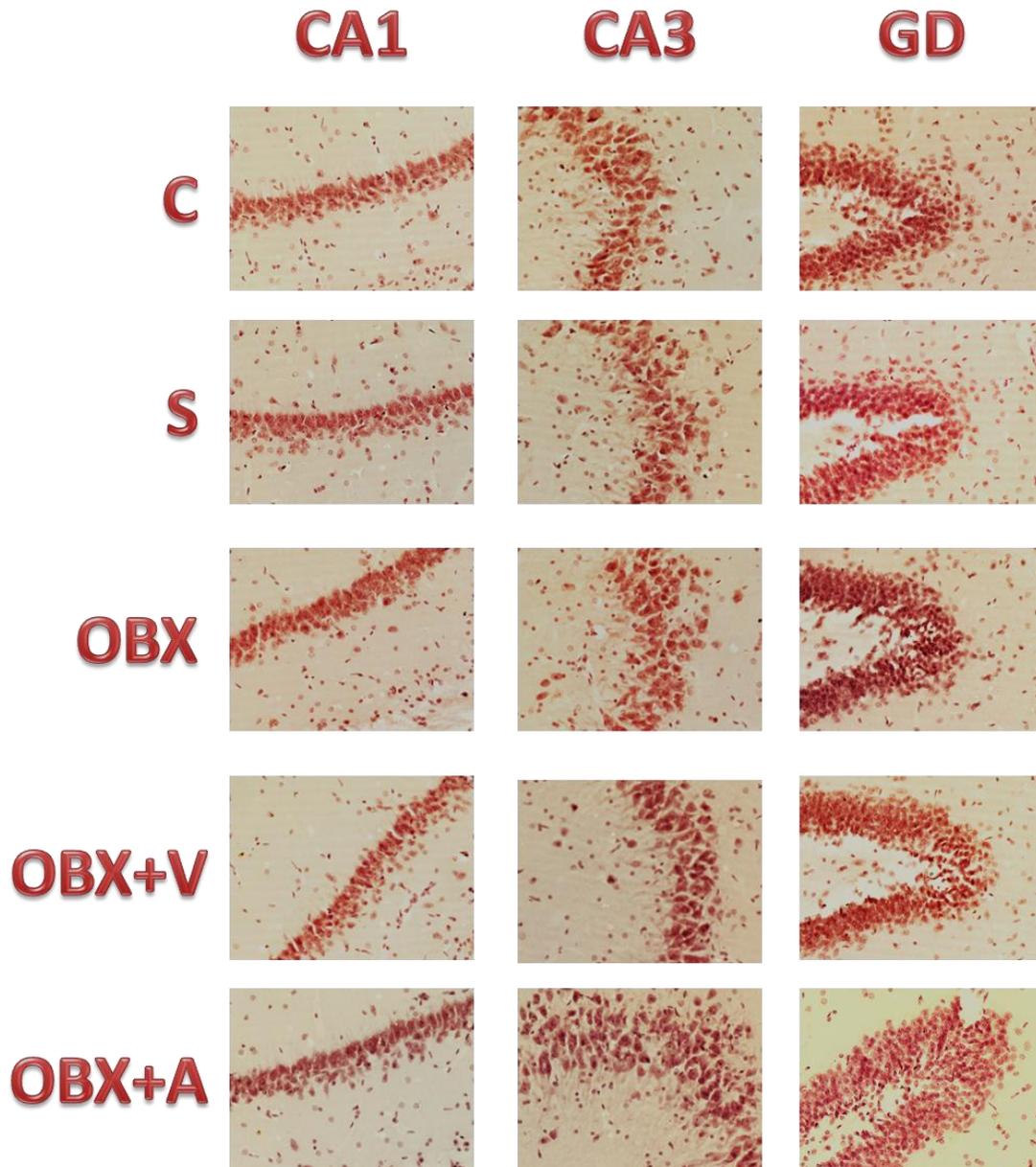


Figura 24.- Inmunohistoquímica del receptor 5-HT1A en el hipocampo. De izquierda a derecha, zonas CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo de rata.

En la zona CA1 se observó un aumento del número de píxeles/mm² respecto al C de $67.3 \pm 14.5\%$ para el grupo OBX y $65.3 \pm 13.29\%$ para el grupo OBX+V; con respecto al grupo S el incremento fue de $43.5 \pm 12.48\%$ por parte del

grupo OBX y $41.79 \pm 11.4\%$ por parte del grupo OBX+V. El grupo OBX+A no tiene diferencias estadísticamente significativas; éstos resultados se observan en la figura 24.

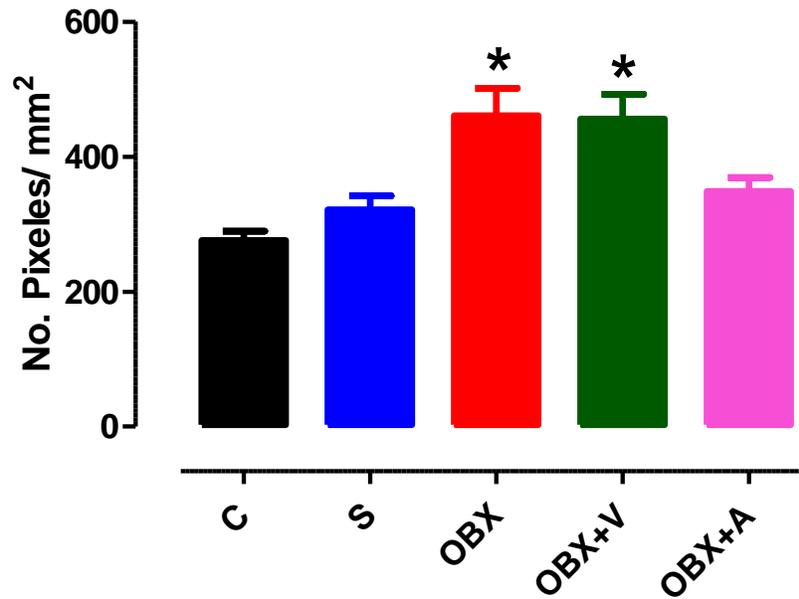


Figura 25.- Porcentaje de reactividad del receptor 5-HT1A en la zona CA1 de hipocampo. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, $*p < 0.001$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=5 por grupo.

7.8.2 Factor Akt en el hipocampo

Se sabe que las fracciones β y γ de la proteína G unida al receptor 5-HT1A pueden incidir en la activación del factor Akt. En la figura 25 se observan las fotomicrografías a 20x de la reactividad a la marca del factor Akt, encontrándose en la mayoría de las células observadas (figura 25).

El análisis de Inmunohistoquímica arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa en los grupos OBX y OBX+V con un incremento de $4.13 \pm 0.73\%$ y $6.29 \pm 0.58\%$ con respecto al control en la zona CA1. No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas en las zonas CA3 y giro dentado. Éstos resultados se muestran en la figura 26.

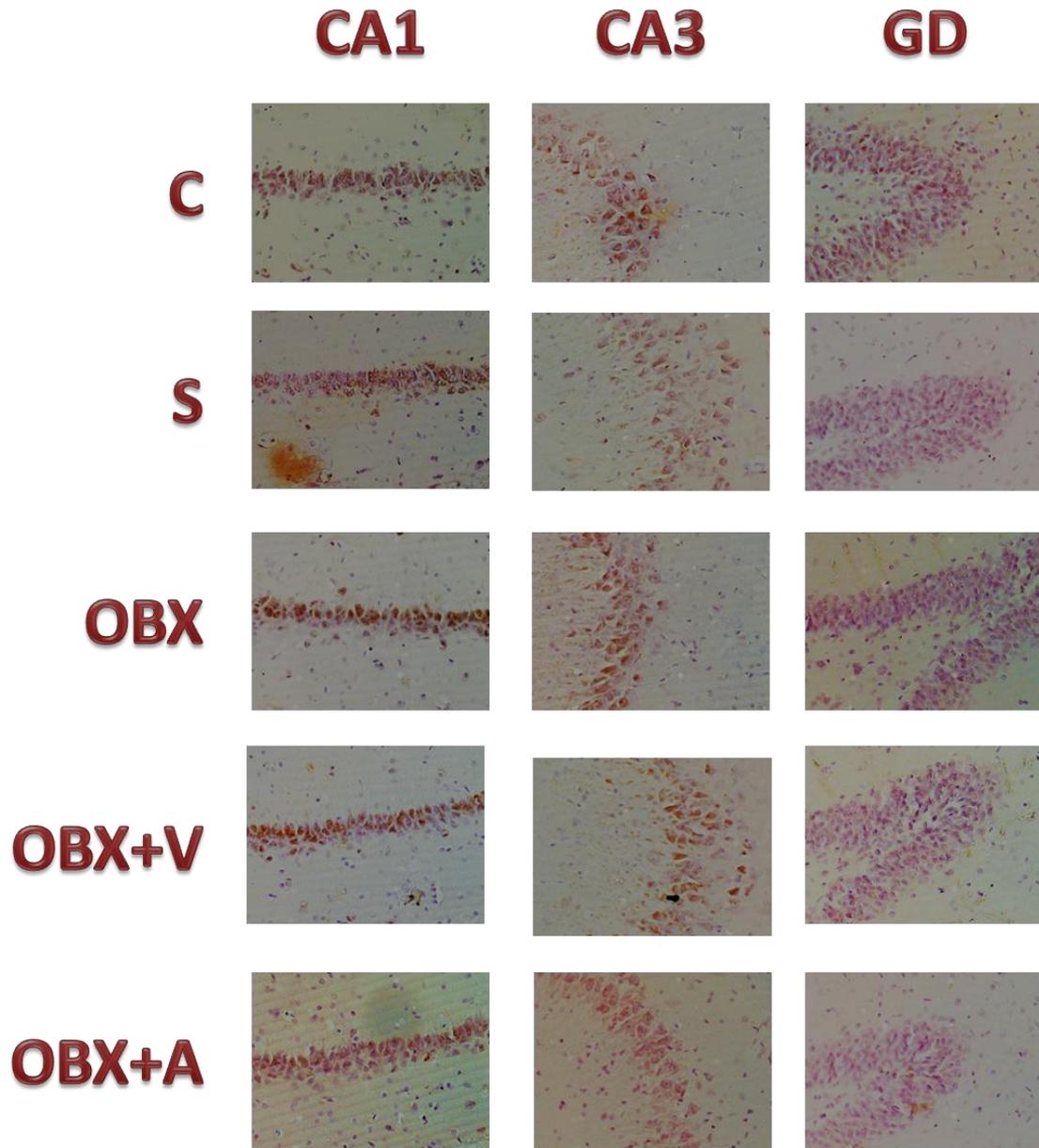


Figura 26.- Inmunohistoquímica factor Akt en hipocampo. De izquierda a derecha, zonas CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo de rata. C= control, S= cirugía, OBX= bulbetomizado, OBX+V= bulbetomizado más vehículo, OBX+A= bulbetomizado más fluoxetina.

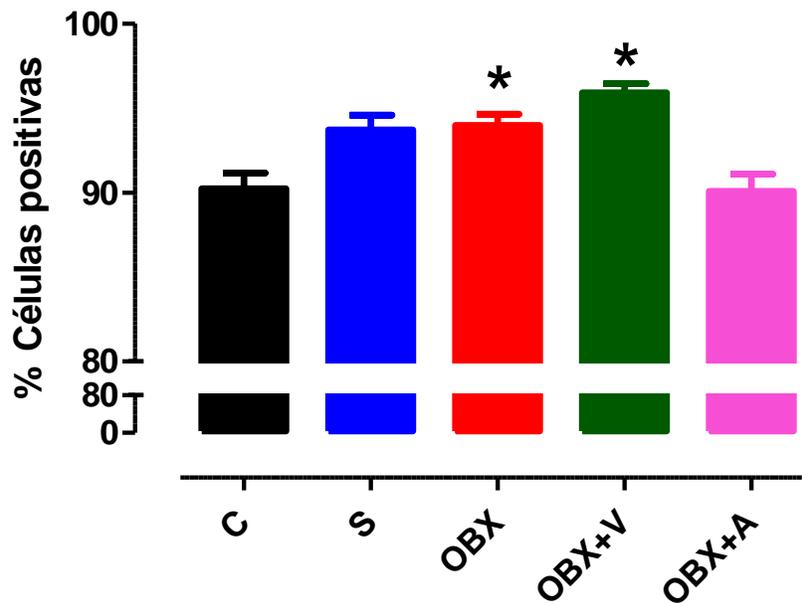


Figura 27.- Porcentaje de células positivas a reactividad del factor Akt en la zona CA1 de hipocampo. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=5 por grupo.

7.8 Niveles cAMP en el hipocampo

La principal molécula sobre la que tiene efecto el receptor 5-HT1A es el AMP cíclico. La determinación por el método de ELISA de este segundo mensajero mostró en el grupo OBX una reducción de $89.38 \pm 2.32\%$, en el OBX+V $78.54 \pm 1.47\%$ y en el OBX+A $87.17 \pm 3.76\%$ con respecto al grupo C; no se encontró diferencia estadísticamente significativa con el grupo S. Estos datos encuentran en la figura 27.

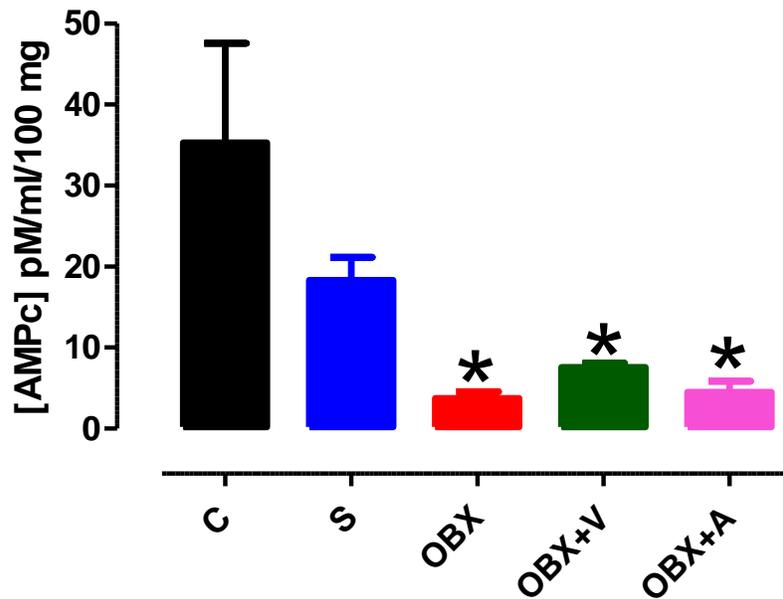


Figura 28.- Niveles de cAMP en la zona de hipocampo. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.001$. C= control, S= cirugía, OBX= bulbectomizado, OBX+V= bulbectomizado más vehículo, OBX+A= bulbectomizado más fluoxetina. n=5 por grupo.

7.9 Confluencia neuronal en el hipocampo

Debido a que se ha relacionado al hipocampo con procesos no solo de memoria-aprendizaje, sino también en la regulación de los estados de ánimo, y tiene estrecha relación con áreas afectadas después de la bulbectomía olfatoria, se decidió estudiar utilizando la tinción de Nissl para evidenciar la posibilidad de cambios en la cito arquitectura de éste núcleo.

Se tomaron fotomicrografías a 20x de la zona hipocampal de los grupos, en la figura 22 se muestran los resultados obtenidos, encontrando que la cito arquitectura característica de las neuronas piramidales de las zonas CA1 y CA3, así como de las células granulares en el giro dentado no muestra diferencias significativas entre grupos.

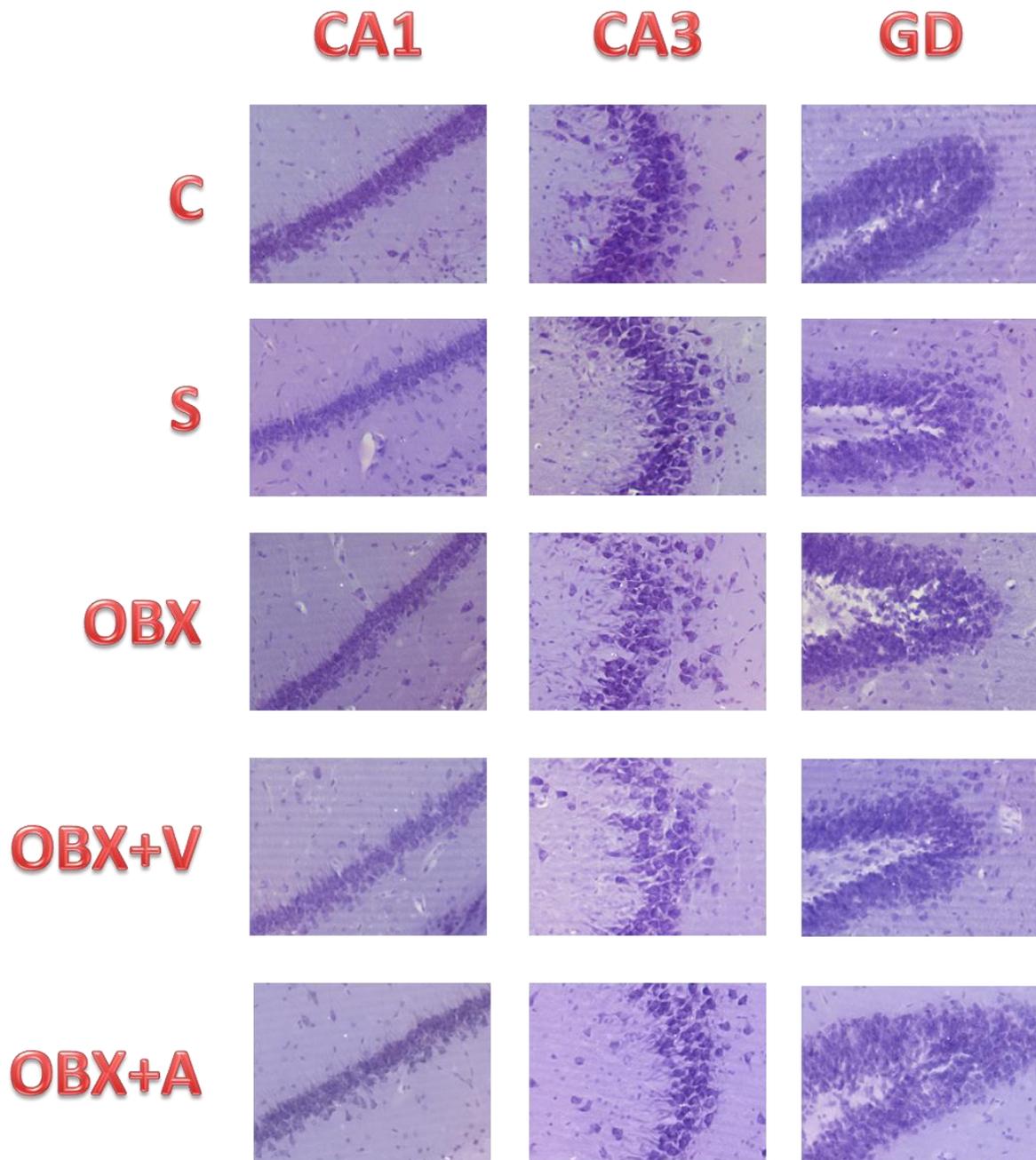


Figura 29.- Tinción de Nissl del hipocampo. De izquierda a derecha, zonas CA1, CA3 y giro dentado (GD) del hipocampo de rata. C= control, S= cirugía, OBX= bullectomizado, OBX+V= bullectomizado más vehículo, OBX+A= bullectomizado más fluoxetina.

8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 Características físicas de la bulbectomía olfatoria

La técnica de bulbectomía olfatoria bilateral en rata descrita por Kelly y colaboradores (1997) fue modificada para ratas de la cepa Wistar con las siguientes coordenadas: 6.4 mm hacia la parte anterior de Bregma con una lateralidad de 2.5 mm para cada bulbo olfatorio [Paxinos y Watson, 1998], debido a que en ese protocolo se utilizaban ratas de la cepa Sprague Dawley (SD) y al realizar la cirugía en coordenadas anteriores se encontró lesión en la corteza frontal, por otro lado coordenadas posteriores dañan el epitelio y conducto olfatorio, que compromete la respiración adecuada del animal y puede morir por bronco-aspiración. A pesar de los cuidados profilácticos algunos animales con cirugía adquirieron infección ótica que se propagó hacia núcleos cerebrales; dichos animales presentaron una conducta típica de giros y fueron descartados del experimento, quedando una n=10 animales por grupo.

Para valorar la evolución a la cirugía los animales fueron pesados constantemente. En la figura 14 se observa una disminución de peso durante los primeros días post operatorios tanto para el grupo cirugía como para el grupo OBX, esto debido a que el daño físico que reciben les impide alimentarse de manera adecuada. A partir del día seis el grupo cirugía comenzó a ganar peso y recuperarse rápidamente, sin embargo el grupo OBX continuó disminuyendo de peso hasta el día 15 posterior a la cirugía, lo que indica que le cuesta más trabajo conseguir su alimento; por esto mismo su recuperación fue mucho más lenta que la del grupo S.

El análisis de varianza de los datos obtenidos arrojó que los grupos C y S no tienen diferencia significativa entre sí, en cambio se encontró diferencia estadísticamente significativa con una disminución marcada en los grupos OBX y OBX+V. Estos resultados eran esperados y concuerdan con lo reportado por Kelly y colaboradores (1997) y Slotkin y colaboradores (1999) donde mencionan que los animales bulbectomizados tienen un peso menor respecto al sham (cirugía) y la

mayor diferencia se encuentra en las primeras dos semanas posterior a la cirugía; sin embargo existe discrepancia con lo reportado por Aswar y colaboradores (2012) pues ellos expresan que las ratas que fueron bulbectomizadas tienden a aumentar de peso en mayor medida que las ratas sham, una probable causa de esta discrepancia tiene que ver con el acceso al alimento (que dejan al alcance de los animales en lugar de colocarlo en la rejilla) y otra con la generación del modelo depresivo que se aborda en la prueba de discriminación olfatoria.

Otro parámetro físico que se tomó en cuenta es la temperatura corporal. En la figura 15 se muestran los datos de la temperatura corporal de los diferentes grupos en este trabajo, los animales sometidos a cirugía presentaron una disminución de la temperatura durante las primeras horas post operatorias que fue contrarrestada con el colchón cálido, en días posteriores no se encontraron diferencias estadísticamente significativas aunque se nota una ligera fluctuación de las temperaturas entre cada uno de los grupos; se puede inferir que a nivel periférico de manera general no existen otros problemas fisiológicos que repercutan en el análisis de este modelo. Hasta el momento no se han reportado suficientes datos que contengan análisis sobre la temperatura corporal de ratas en este modelo; ha sido descrito, sin embargo, que la temperatura disminuye durante el proceso quirúrgico y se mantiene baja durante las primeras horas post cirugía como parte de una respuesta normal en otros procesos quirúrgicos [Lee y cols., 2014] y en la bulbectomía olfatoria [Vinkers y cols., 2009], en ese mismo estudio encuentran un incremento de la temperatura corporal persistente a partir del segundo día post cirugía y lo asocian con el incremento del ritmo cardíaco, cabe mencionar que la hiperactividad de las ratas y las variaciones climáticas pueden influir en este fenómeno, por lo que se requieren más datos para confirmar la presencia de cambios significativos en este parámetro.

8.2 La extracción de los bulbos olfatorios reproduce conductas depresivas

Tres semanas después del día de la cirugía se evaluaron a los animales en diferentes pruebas conductuales, éstas consistieron en: prueba de discriminación

olfatoria (o prueba de anosmia), prueba de evitación a la luz y análisis de la conducta motora en el modelo de campo abierto. Se escogió ese tiempo debido a que se ha reportado que existen cambios conductuales significativos a partir del día 10 [Kelly y cols., 1997; Song y Leonard, 2005] y se ha evaluado a los animales OBX en periodos cercanos a tres semanas.

El sistema olfatorio de los mamíferos tiene la habilidad de detectar tanto moléculas volátiles como algunas no volátiles; en los roedores este sentido es vital pues participa en múltiples procesos de reconocimiento destacando: reconocimiento materno, búsqueda de alimento y conducta social [Sanchez-Andrade y Kendrick, 2009]. Slotkin y colaboradores (1999) así como Slotnick y colaboradores (2004) realizan el test de anosmia utilizando técnicas en las que se incentiva a los animales con sustancias olorosas; en el primer caso se expone a los grupos a consumir leche con chocolate mostrando que las ratas OBX no tienen predilección entre agua y leche con chocolate a diferencia de las ratas control; en el segundo caso se ponen a prueba a los animales con sensidiscos impregnados con diferentes aromas y se valora la cantidad de aciertos que tienen las ratas para hallar cada sensidisco y se encontró una menor cantidad de aciertos en ratas bulbectomizadas respecto a su control. El estudio de la funcionalidad olfatoria fue necesario para discernir una cirugía que llevada a cabo de manera exitosa y continuar con los análisis posteriores, por ello se realizó la prueba de discriminación olfatoria, pues sin los bulbos olfatorios se espera que los animales bulbectomizados no perciban olores. En la figura 16 A se observan los resultados de dicha prueba; como era esperado el grupo OBX tuvo un periodo más largo para encontrar la primera galleta respecto a los grupos C y S. Esta diferencia de tiempo propone que los animales han sido bulbectomizados exitosamente al día 21.

El cerebro adulto contiene al menos tres zonas de regeneración celular, una de ellas es el bulbo olfatorio [Sui y cols., 2012], por esta razón era importante corroborar que no existiera una reconexión que ayudara a los animales a oler. Se encontró en el día 45 (figura 16 B) que los animales siguen sin reconocer los estímulos olorosos, y que esto se observa aún con el tratamiento con fluoxetina.

En el análisis de la craneotomía se confirmó la extracción de los bulbos olfatorios, descartando ablaciones parciales.

Como parte de la caracterización del modelo de bulbectomía olfatoria se propuso evaluar la conducta de evasión a la luz de tipo pasiva. Para esta prueba se realizó el protocolo tomado de Masuda y colaboradores (2013) que fue utilizado para ratas normales y que en este experimento fue implementado para todos los grupos (C, S, OBX, OBX+V y OBX+A). En la figura 17 A se observa que las ratas bulbectomizadas mostraron un mayor tiempo de latencia para entrar en la zona de oscuridad incrementando $377.4\% \pm 124\%$ respecto al grupo control y $732\% \pm 216\%$ respecto del grupo cirugía, además de que pasaban de una zona a otra aleatoriamente, incrementando el tiempo de permanencia en la zona de luz. Este resultado coincide con lo observado por Slotkin y colaboradores (1999); este dato se asocia a la conducta depresiva que provoca alteraciones en el aprendizaje propias del modelo. Después de la administración con fluoxetina el periodo de latencia para pasar a la zona de oscuridad disminuye drásticamente y de igual modo el paso de una zona a otra en el aparato de prueba, lo que se correlaciona con la disminución de la movilidad del animal, y que es un efecto notorio en los animales OBX administrados con fluoxetina.

En el análisis de la conducta motora en el modelo de campo abierto se evaluaron los siguientes rubros: 1) actividad horizontal, 2) conducta inmóvil, 3) número de erguidos y 4) acicalamiento [Slotkin y cols., 1999; Wang y cols., 2010]. En la figura 18 A se observa que los grupos OBX, OBX+V y OBX+A en la primer fase de estudio presentan hiperactividad, esto se denota con el aumento de número de cuadros visitados [Aswar y cols., 2012; Breuer y cols., 2007; Kelly y cols., 1997; Morales-Medina y cols., 2013; Slotkin y cols., 1999; Song y Leonard, 2005; Rinwa y cols., 2013; Vinkers y cols., 2009; Wang y cols., 2010], éste cambio conductual ha sido reportado desde los 14 días después de realizada la cirugía [Burke y cols., 2013]; en la figura 18 B se observó que el tratamiento con fluoxetina disminuye esa hiperactividad y el grupo OBX+A no presenta diferencias estadísticamente con los grupos C y S; en contra parte a este incremento de la

actividad ambulatoria se encontró disminuida la conducta inmóvil (figura 19 A), sin embargo tras el tratamiento con el antidepresivo el grupo OBX+A, al disminuir su conducta ambulatoria, incrementó en los periodos estáticos (figura 19 B). El número de erguidos no arrojó diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las fases (figura 20), este dato no corresponde a ninguno de los reportes existentes sobre el modelo de bulbectomía olfatoria, en los que se menciona el incremento del número de erguidos [Morales-Medina y cols., 2013; Rinwa y cols., 2013; Slotkin y cols., 1999; Song y Leonard, 2005; Yang y cols., 2014], ésto probablemente tenga relación con el tipo de cepa que se trabaja.

Una de las características de los pacientes con depresión mayor es la falta de aseo y cuidado personal; los roedores, de manera normal, tienden a acicalarse constantemente; en este trabajo se encontró cierto nivel de desinterés en el acicalamiento, al disminuir este parámetro notablemente en la primera fase de la prueba (figura 21 A). Los datos encontrados coinciden con lo reportado por Rinwa y colaboradores en 2013, pero difieren con otros autores [Aswar y cols., 2012; Kelly y cols., 1997].

Se sugiere que el estado depresivo promueva desinterés en el acicalamiento y por ello esta conducta se vea disminuida. A pesar de que los resultados de la prueba en campo abierto no se han asociado directamente a la remoción de los bulbos olfatorios [Song y Leonard, 2005], se han asociado en si al proceso depresivo y se reafirma a éste como modelo para estudiar el trastorno depresivo mayor. Un aspecto importante es que, a pesar de que como parte de la caracterización del modelo incluye la reversión de la hiperactividad tras la administración de antidepresivos [Song y Leonard, 2005], lo que se mide con esas pruebas es la actividad motora [Sugimoto y cols., 2010], dato que se ha corroborado en otros estudios utilizando fluoxetina [Marquez-Romero y cols., 2013] y no otros parámetros que puedan equipararse con síntomas de la depresión.

8.3 Participación del receptor 5-HT1A como heterorreceptor en el TDM en rata

El análisis de la PCR en tiempo real no indica diferencias estadísticamente significativas en el mensajero del receptor. Esto indicaría que en TDM no hay diferencias en los niveles de mensajero del receptor en la zona de hipocampo antes o después de un tratamiento con fluoxetina como antidepresivo, aunque existe una tendencia al incremento en el grupo OBX+A, lo cual sin embargo, requiere de un nuevo análisis para corroborar lo observado en este trabajo.

Dado que no se encontraron diferencias en el mensajero, se procedió a realizar el análisis de la proteína. La Inmunohistoquímica (figura 23) demostró que efectivamente el receptor se encuentra abundantemente en el hipocampo [Berumen y cols., 2012] y de manera particular las neuronas piramidales. En el análisis densitométrico se encontraron diferencias estadísticamente significativas sólo en la zona CA1 (figura 24) y no así en las zonas CA3 y giro dentado; Morales-Medina y colaboradores (2013) encuentran que existe una disminución de la arborización dendrítica en esta misma zona en el modelo OBX, probablemente esta alteración esté formando parte del incremento del receptor, no obstante se requieren de otros ensayos para corroborarlo. Por otro lado, estudios en roedores jóvenes tratados con fluoxetina no muestran la existencia de proliferación celular en el giro dentado [Oh y cols., 2009] en comparación con lo observado en el cerebro adulto [Kohl y cols., 2012] lo que corroboraría la hipótesis de que las variaciones en los niveles del receptor son debidas al proceso depresivo y no al incremento celular y explicaría en parte las diferencias encontradas en la eficiencia del tratamiento antidepresivo, sin embargo existe controversia con lo reportado por otros autores [Klomp y cols., 2014], diferencias que pueden atribuirse al tipo de cepa, dosis y tiempo de administración del antidepresivo. Cabe mencionar que el tiempo de acción de la fluoxetina (y otros antidepresivos IRSS) para observar cambios conductuales notables es a partir de la tercera semana, razón por la que se eligió ese tiempo. En ese periodo de tiempo se sugiere que existe un

incremento de los autorreceptores 5-HT1A y posteriormente una desensibilización de los mismos [Castro y cols., 2003].

La disminución en el AMP cíclico (figura 26) encontrada, así como el incremento del factor Akt en la zona CA1, se relaciona con el incremento del receptor al ser moléculas implicadas en su vía de señalización [Polter y Li, 2010]; sin embargo se requieren realizar análisis de la actividad del receptor en éste núcleo, pues la notable disminución de cAMP puede deberse también a un incremento en la actividad del receptor. Un análisis del receptor 5-HT1A en ratas tratadas con fluoxetina (que no tienen ablación de los bulbos olfatorios) mostró que no existen cambios estadísticamente significativos en la densidad de los receptores a nivel pre sináptico ni post sináptico y que, contradictoriamente, parece existir una mayor actividad del receptor a nivel post sináptico [Castro y cols., 2003].

Éste experimento se llevó a cabo en ratas consideradas adultas jóvenes al momento de realizar la lesión de bulbos olfatorios; para discernir de mejor manera la presencia o ausencia de proliferación y/o muerte neuronal en la zona subgranular del GD se sugiere la marca con BrdU en estudios posteriores a este trabajo.

8.4 Citoarquitectura del hipocampo en el modelo OBX

Debido a la importancia del hipocampo en el TDM y reportes existentes en los que se menciona alteraciones de volumen [Hercher y cols., 2009; Serafini, 2012] o de la arborización dendrítica en esta zona [Morales-Medina y cols., 2013] se realizó la tinción de Nissl. Los resultados (figura 22) muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en la densidad celular así como en la citoarquitectura de las células en las zonas CA1, CA3 y GD; esto puede ser consistente con lo reportado por Morales-Medina y colaboradores en 2013, donde mencionan que existe una disminución de la arborización así como las espinas

dendríticas en la zona CA1 a causa de alteraciones equivalentes en la corteza entorrinal y no necesariamente una alteración por muerte neuronal. Por otro lado no se descarta la posibilidad de la existencia de neurogénesis en el GD pues existen estudios en ratas jóvenes tratadas con fluoxetina durante tres semanas en las que se ha encontrado un incremento considerable en la neurogénesis tanto en ratas OBX como Sham [Klomp y cols., 2014].

8.5 Diagrama hipotético

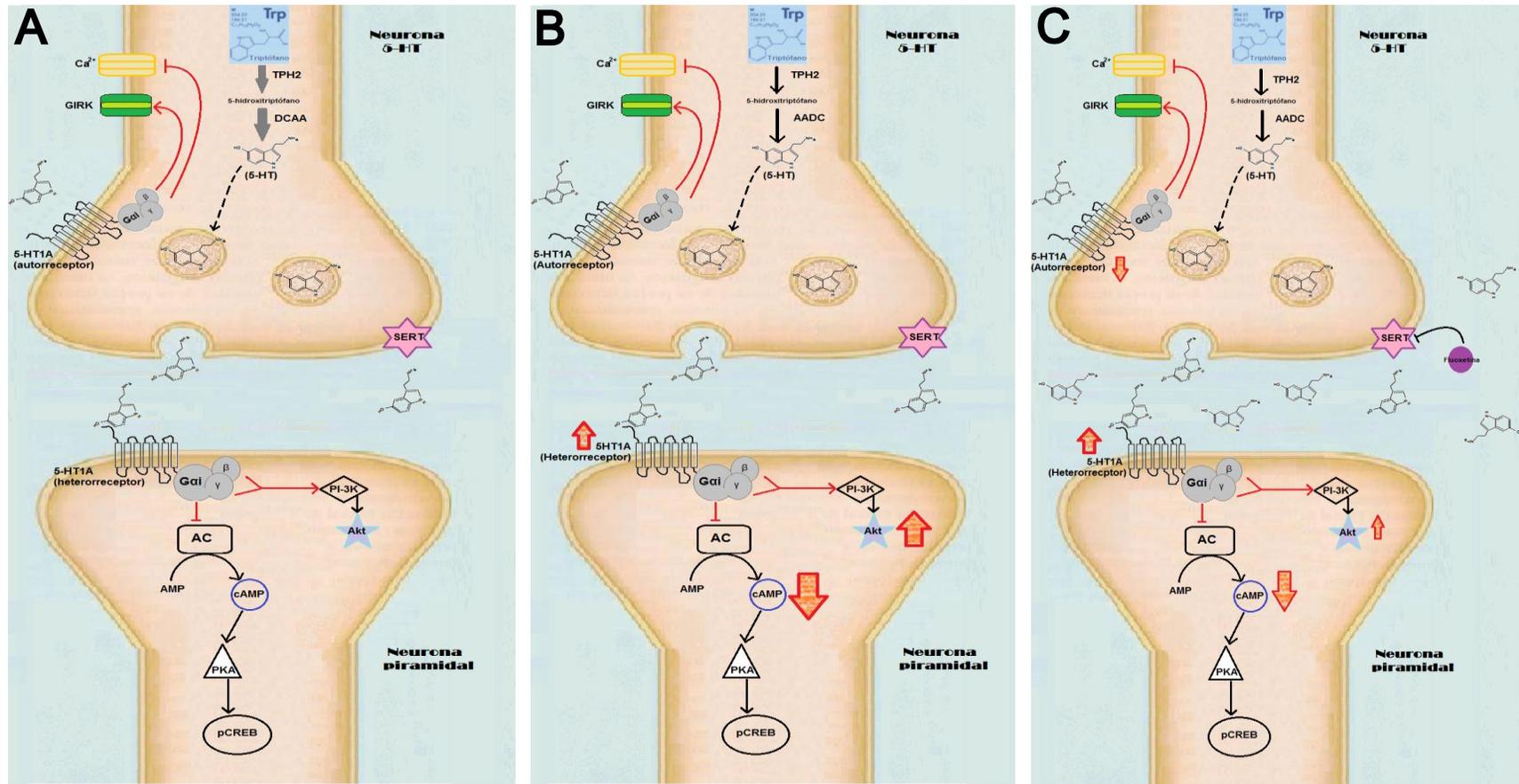


Figura 30.-Diagrama hipotético del receptor 5-HT1A post sináptico. A) Representación esquemática de la neurotransmisión serotoninérgica y niveles del receptor en ratas C y S. B) Representación esquemática del incremento del receptor 5-HT1A en neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo en ratas OBX de 45 días. C) Representación esquemática de la acción de la fluoxetina en ratas OBX, en la presinapsis se postula una disminución y posterior regulación del autorreceptor.

9 CONCLUSIONES

Las ratas OBX tienen un peso menor, hiperactividad y reducción en el número de acicalamientos respecto a sus controles. Estas características se presentan a los 21 días y se mantienen hasta los 45 días posteriores a la cirugía.

El tratamiento con Fluoxetina en dosis de 0.8 mg/Kg/día durante tres semanas mejora las conductas motoras (disminuyendo la hiperactividad) y el peso de ratas OBX.

La cirugía OBX no causa modificaciones en la cito arquitectura del hipocampo en las zonas CA1, CA3 y giro dentado a los 21 y 45 días posteriores a la ablación.

El receptor 5-HT1A no aumenta los niveles de mensajero pero a nivel proteico se ve incrementado en la zona CA1 del hipocampo, causando la disminución de cAMP y el incremento del factor Akt.

Estos resultados sugieren que el modelo OBX es adecuado para simular el TDM y que el tratamiento sólo con fluoxetina en dosis 0.8 mg/Kg/día durante tres semanas no mejora todos los mecanismos depresivos.

10 PERSPECTIVAS

Proponer nuevas pruebas experimentales para analizar otras conductas en el modelo OBX que sean equiparables con síntomas de depresión en humanos.

Realizar tinción con BrdU para evaluar la posibilidad de neurogénesis en el giro dentado y la zona suventricular.

Realizar cuantificación proteica del receptor por método de ELISA o Western Blot para confirmar el incremento observado en la Inmunohistoquímica.

Realizar análisis de actividad del receptor para descartar un mal funcionamiento de la proteína, y en su defecto corroborar con análisis de modificaciones post traduccionales.

Analizar moléculas que formen parte de la cascada de señalización de AMP cíclico para visualizar el impacto de la disminución de éste segundo mensajero.

Correlacionar los resultados de este trabajo con desregulaciones de otros núcleos como amígdala o hipotálamo.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Adell A, Castro E, Celada P, Bortolozzi A, Pazos A, Artigas F. **2005**. Strategies for producing faster acting antidepressants. *Drug Discov Today*. (8):578-85.
- [2] Albert PR, François BL, Millar AM. **2011**. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Mol Brain*. 4:21.
- [3] Albert PR, François BL. **2010**. Modifying 5-HT1A Receptor Gene Expression as a New Target for Antidepressant Therapy. *Front Neurosci*. 4:35.
- [4] Albert PR. **2012**. Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. (1601):2402-15.
- [5] Allen F, Harold AP, Michael BF, Thomas AW. **2000a**. Diagnostic criteria from DSM-IV-TR. Major depressive episode. Washington, DC: American Psychiatric Association: pp- 326-33.
- [6] Allen F, Harold AP, Michael BF, Thomas AW. **2000b**. Diagnostic criteria from DSM-IV-TR. Major depressive disorder. Washington, DC: American Psychiatric Association: pp- 345-352.
- [7] Andrus BM, Blizinsky K, Vedell PT, Dennis K, Shukla PK, Schaffer DJ, Radulovic J, Churchill GA, Redei EE. **2012**. Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. *Mol Psychiatry*. (1):49-61.
- [8] Anisman H. **2009**. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 34(1):4-20.
- [9] Arias-Carrión O, Olivares-Buñuelos T, Drucker-Colín R. **2007**. Neurogenesis in the adult brain. *Rev Neurol*. May 1-15;44(9):541-50. Review. Spanish
- [10] Aswar UM, Kalshetti PP, Shelke SM, Bhosale SH, Bodhankar SL, Murumkar P. **2012**. Effect of newly synthesized 1,2,4-triazino[5,6-b]indole-3-thione derivatives on olfactory bulbectomy induced depression in rats. *Asian Pac J Trop Biomed*; 2(12): pp- 92-8.

- [11] Bale TL. **2006**. Stress sensitivity and the development of affective disorders. *Horm Behav. Nov*; 50(4):529-33.
- [12] Banerjee R, Ghosh AK, Ghosh B, Bhattacharyya S, Mondal AC. **2013**. Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF, and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. *Clin Med Insights Pathol*; 6:1-11.
- [13] Berg KA, Clarke WP. **2001**. Regulation of 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptor systems by phospholipid signaling cascades. *Brain Res Bull. 56(5)*:471-7
- [14] Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G. **2012**. Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal. 823493*
- [15] Bockaert J, Claeysen S, Bécamel C, Dumuis A, Marin P. **2006**. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res. (2)*:553-72.
- [16] Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. **2009**. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev (2)*:63-7.
- [17] Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. **2014**. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT_{1A} receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Front Mol Neurosci. 10*;7:24.
- [18] Breuer ME, Groenink L, Oosting RS, Westenberg HG, Olivier B. **2007**. Long-term behavioral changes after cessation of chronic antidepressant treatment in olfactory bulbectomized rats. *Biol Psychiatry. 61(8)*: pp-990-5
- [19] Burke NN, Geoghegan E, Kerr DM, Moriarty O, Finn DP, Roche M. **2013**. Altered neuropathic pain behaviour in a rat model of depression is associated with changes in inflammatory gene expression in the amygdala. *Genes Brain Behav. 12(7)*. pp- 705-13.
- [20] Carabelli B, Delattre AM, Pudell C, Mori MA, Suchecki D, Machado RB, Venancio DP, Piazzetta SR, Hammerschmidt I, Zanata SM, Lima MM, Zanolini JM, Ferraz AC. **2014**. The Antidepressant-Like Effect of Fish Oil: Possible Role of Ventral Hippocampal 5-HT(1A) Post-synaptic Receptor. *Mol Neurobiol*.

[21] Carr GV, Lucki I. **2011**. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl)*. Feb;213(2-3):265-87.

[22] Castro M, Diaz A, del Olmo E, Pazos A. **2003**. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT1A receptors in rat brain. *Neuropharmacology*. 44(1):93-101.

[23] Chaparro RE, Quiroga C, Bosco G, Erasso D, Rubini A, Mangar D, Parmagnani A, Camporesi EM. **2013**. Hippocampal cellular loss after brief hypotension. *Springerplus*. Jan 25;2(1):23.

[24] Chung CP, Schmidt D, Stein CM, Morrow JD, Salomon RM. **2013**. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. *Psychiatry Res*. (2-3):213-6.

[25] Dass JF, Sudandiradoss C. **2012**. The function and structural influence of selective relaxed constraint at functional intracellular loop3 of 5-HT(1A) serotonin-1 receptor family. *Gene*.;508(2):211-20

[26] De Castro F. **2009**. Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. *Front Neurosci*. Dec 4;3:52.

[27] Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. **1999**. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry*. 46(10):1375-87

[28] Dupre KB, Ostock CY, George JA, Eskow Jaunarajs KL, Hueston CM, Bishop C. **2013**. Effects of 5-HT1A receptor stimulation on D1 receptor agonist-induced striatonigral activity and dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *ACS Chem Neurosci*. 4(5):747-60.

[29] Ekinci O, Albayrak Y, Asli, Ekinci AE. **2012**. Temperament and Character in Euthymic Major Depressive Disorder Patients: The Effect of Previous Suicide Attempts and Psychotic Mood Episodes. *Psychiatry Investig*. Jun;9(2):119-26.

[30] El-Hage W, Leman S, Camus V, Belzung C. **2013**. Mechanisms of antidepressant resistance. *Front Pharmacol*. 4:146.

[31] Feierstein CE. 2012. Linking adult olfactory neurogenesis to social behavior. *Front Neurosci.* 6:173.

[32] Gałecki P, Maes M, Florkowski A, Lewiński A, Gałecka E, Bieńkiewicz M, Szemraj J. **2010**. An inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the risk of recurrent depressive disorder. *Neurosci Lett.* 486(3):184-7.

[33] Ganz D, Braquehais MD, Sher L. **2010**. Secondary prevention of suicide. *PLoS Med.* 1;7(6):1-4.

[34] Gurevich I, Englander MT, Adlersberg M, Siegal NB, Schmauss C. **2002**. Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J Neurosci.* 22(24):10529-32.

[35] Haleem DJ. **2011**. Raphe-hippocampal serotonin neurotransmission in the sex related differences of adaptation stress: focus on serotonin 1A receptor. *Current Neuropharmacology*, 9, 512-521.

[36] Hercher C, Turecki G, Mechawar N. **2009**. Through the looking glass: examining neuroanatomical evidence for cellular alterations in major depression. *J Psychiatr Res* 43:947–961.

[37] Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. **1994**. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 46(2):157-203

[38] Imai T, Sakano H. **2011**. Axon–axon interactions in neuronal circuit assembly: lessons from olfactory map formation. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 34, pp. 1647–1654.

[39] Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI). **2012**. Estadística de los suicidios de los Estados Unidos Mexicanos, pp.- 11, 32.

[40] Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI). Portal de internet. [Consulta: septiembre, **2014**]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=mvio38&s=est&c=22653>

[41] Jabbi M, Korf J, Ormel J, Kema IP, Boer JA. **2008**. Investigating the molecular basis of major depressive disorder etiology. A functional convergent

genetic approach. *Stress, Neurotransmitters, and Hormones: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1148: 42–56.

[42] Jakobsen JC, Hansen JL, Storebø OJ, Simonsen E, Gluud C. **2011**. The effects of cognitive therapy versus 'no intervention' for major depressive disorder. *PLoS One.* 6(12):e28299.

[43] Jovanovic H, Perski A, Berglund H, Savic I. **2011**. Chronic stress is linked to 5-HT(1A) receptor changes and functional disintegration of the limbic networks. *Neuroimage.* 1;55(3):1178-88

[44] Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. **1997**. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther.;*74(3):299-316

[45] Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. **2007**. Interacciones antígeno-anticuerpo: principios y aplicaciones. En: *Inmunología de Kubly*. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Pp.-156-158

[46] Klomp A, Va'clavu L, Meerhoff GF, Reneman L, Lucassen PJ. **2014**. Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Neurogenesis and Tryptophan Hydroxylase Expression in Adolescent and Adult Rats. *PLoS ONE* 9(5): e97603.

[47] Kohl Z, Winner B, Ubhi K, Rockenstein E, Mante M, Münch M, Barlow C, Carter T, Masliah E, Winkler J. **2012**. Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. *Eur J Neurosci.* 35(1):10-9.

[48] Kupfer DJ, Frank E, Phillips ML. **2012**. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet.* 379(9820):1045-55.

[49] Lee JH, Ko E, Kim YE, Min JY, Liu J, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H. **2010**. Gene expression profile analysis of genes in rat hippocampus from antidepressants treated rats using DNA microarray. *Neuroscience,* 11:152.

[50] Lee S, Hong Y, Lee SR, Chang KT, Hong Y. **2014**. Comparison of Surgical Methods of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion between Rats and Mice. *J Vet Med Sci.*

[51] Leinwand SG, Chalasani SH. **2011**. Olfactory networks: from sensation to perception. *Curr Opin Genet Dev.* (6):806-11.

[52] Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR. **2003**. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci.*;23(25):8788-99

[53] Li YC, Wang FM, Pan Y, Qiang LQ, Cheng G, Zhang WY, Kong LD. **2009**. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*;33(3):435-49

[54] Livak KJ, Schmittgen TD. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* (4):402-8.

[55] López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. Bennett Research Award. **1998**. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry.* 43(8):547-73.

[56] Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L. **2006**. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol.* 70(3):1013-21.

[57] Marquez-Romero JM, Arauz A, Ruiz-Sandoval JL, Cruz-Estrada Ede L, Huerta-Franco MR, Aguayo-Leyte G, Ruiz-Franco A, Silos H. **2013**. Fluoxetine for motor recovery after acute intracerebral hemorrhage (FMRICH): study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Trials*; 14:77.

[58] Masuda A, Narikiyo K, Someya N, Aou S. **2013**. Multisensory interaction mediates the social transmission of avoidance in rats: dissociation from social transmission of fear. *Behav Brain Res*; 252: pp- 334-8.

[59] McDevitt RA, Neumaier JF. **2011**. Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective. *J Chem Neuroanat.* 41(4):234-46.

[60] Møller M, Andersen G, Gjedde A. **2007**. Serotonin 5HT_{1A} receptor availability and pathological crying after stroke. *Acta Neurol Scand*; 116(2):83-90.

[61] Morales-Medina JC, Juarez I, Venancio-García E, Cabrera SN, Menard C, Yu W, Flores G, Mechawar N, Quirion R. **2013**. Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience*. 236(43): pp- 233-43.

[62] Na KS, Chang HS, Won E, Han KM, Choi S, Tae WS, Yoon HK, Kim YK, Joe SH, Jung IK, Lee MS, Ham BJ. **2014**. Association between glucocorticoid receptor methylation and hippocampal subfields in major depressive disorder. *PLoS One*. 9(1):e85425.

[63] Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. **2013**. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation*. 10:43.

[64] Nosedá AC, Rodrigues LS, Targa AD, Aurich MF, Vital MA, Da Cunha C, Lima MM. **2014**. Putative role of monoamines in the antidepressant-like mechanism induced by striatal MT2 blockade. *Behav Brain Res*. 275C:136-145.

[65] Oba A, Nakagawasai O, Onogi H, Nemoto W, Yaoita F, Arai Y, Tanno K, Tadano T. **2013**. Chronic fluvoxamine treatment changes 5-HT2A/2C receptor-mediated behavior in olfactory bulbectomized mice. *Tokyo. Life Sciences* 92 119–124.

[66] Oh JE, Zupan B, Gross S, Toth M. **2009**. Paradoxical anxiogenic response of juvenile mice to fluoxetine. *Neuropsychopharmacology*. 34(10):2197-207.

[67] Ongür D, Price JL. **2000**. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex*. 10(3):206-19.

[68] Pajer K, Andrus BM, Gardner W, Lourie A, Strange B, Campo J, Bridge J, Blizinsky K, Dennis K, Vedell P, Churchill GA, Redei EE. **2012**. Discovery of blood transcriptomic markers for depression in animal models and pilot validation in subjects with early-onset major depression. *Transl Psychiatry*.; 2:e101.

[69] Paxinos G, Watson C. **1998**. The rat brain in the stereotaxic coordinates. Editorial Academic Press; pp 1, 2, 121

[70] Pierz KA, Thase ME. **2014**. A review of vilazodone, serotonin, and major depressive disorder. *Prim Care Companion CNS Disord.* 16(1).

[71] Pollak DD, Monje FJ, Zuckerman L, Denny CA, Drew MR, Kandel ER. **2008**. An animal model of a behavioral intervention for depression. *Neuron*; 60(1): 149–161.

[72] Polter AM, Li X. **2010**. 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal.* 22(10):1406-12.

[73] Primeaux SD, Barnes MJ, Bray GA. **2007**. Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behav Brain Res.* 180(2):190-6.

[74] Pytliak M, Vargová M, Michirova V, Felsöci M. **2011**. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. *Physiol. Res.* 60: 15-25.

[75] Real Academia de la Lengua (RAL). **2001**. Diccionario de la Lengua Española. Vigésima segunda edición. Portal en línea. [Consulta Julio 2013]. Disponible en: <http://lema.rae.es/drae/?val=depresi%C3%B3n>

[76] Riezen HV, Schnieden H, Wren AF. **1977**. Olfactory bulb ablation in the rat: behavioural changes and their reversal by antidepressant drugs. *Br. J. Pharmacol.* 60, 521-528.

[77] Rinwa P, Kumar A, Garg S. **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): pp- 1-10.

[78] 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* (2007) 32, 1312–1320.

[79] Sanchez-Andrade G, Kendrick KM. **2009**. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav Brain Res.* Jun 25;200(2):323-35.

[80] Savitz J, Lucki I, Drevets WC. **2009**. 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol.*;88(1):17-3

[81] Savitz JB, Drevets WC. **2009**. Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience*. 164(1):300-30.

[82] Schmidt HD, Shelton RC, Duman RS. **2011**. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology*. 36(12):2375-94.

[83] Selvaraj S, Arnone D, Cappai A, Howes O. **2014**. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neurosci Biobehav* 45:233-45.

[84] Serafini G. **2012**. Neuroplasticity and major depression, the role of modern antidepressant drugs. *World J Psychiatry*. 22;2(3):49-57.

[85] Sheline YI, Barch DM, Donnelly JM, Ollinger JM, Snyder AZ, Mintun MA. **2001**. Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry*; 50(9):651-8.

[86] Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Styczeń K, Szewczyk B, Kotarska K, Misztak P, Pilc A, Wolak M, Nowak G. **2013**. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep*. 65(6):1558-71.

[87] Slotkin TA, Miller DB, Fumagalli F, McCook EC, Zhang J, Bissette G, Seidler FJ. **1999**. Modeling geriatric depression in animals: biochemical and behavioral effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Apr;289(1):334-45.

[88] Slotnick B, Cockerham R, Pickett E. **2004**. Olfaction in olfactory bulbectomized rats. *J Neurosci*; 24(41): pp- 9195-200.

[89] Smith DF. **2013**. Quest for biomarkers of treatment-resistant depression: shifting the paradigm toward risk. *Front. Psychiatry* 4:57.

[90] Song C, Leonard BE. **2005**. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*; 29(4-5):627-47

[91] Sugimoto Y, Furutani S, Kajiwara Y, Hirano K, Yamada S, Tagawa N, Kobayashi Y, Hotta Y, Yamada J. **2010**. Involvement of the 5-HT_{1A} receptor in the anti-immobility effects of fluvoxamine in the forced swimming test and mouse strain differences in 5-HT_{1A} receptor binding. *Eur J Pharmacol*. 629(1-3):53-7

[92] Sui Y, Horne MK, Stanic´ D. **2012**. Reduced Proliferation in the Adult Mouse Subventricular Zone Increases Survival of Olfactory Bulb Interneurons. PLoS ONE 7(2): e31549.

[93] Talarowska M, Bobińska K, Zajączkowska M, Su KP, Maes M, Gałecki P. **2014**. Impact of oxidative/nitrosative stress and inflammation on cognitive functions in patients with recurrent depressive disorders. Med Sci Monit; 20:110-5.

[94] Tobe EH. **2013**. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and major depressive disorder. Neuropsychiatr Dis Treat. 9:567-73.

[95] van der Werf-Eldering MJ, Riemersma-van der Lek RF, Burger H, Holthausen EA, Aleman A, Nolen WA. **2012**. Can variation in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-axis activity explain the relationship between depression and cognition in bipolar patients? PLoS One. 7(5):e37119.

[96] Villanueva R. **2013**. Neurobiology of major depressive disorder. Neural Plast. 2013:873278.

[97] Vinkers CH, Breuer ME, Westphal KG, Korte SM, Oosting RS, Olivier B, Groenink L. **2009**. Olfactory bulbectomy induces rapid and stable changes in basal and stress-induced locomotor activity, heart rate and body temperature responses in the home cage. Neuroscience; 159(1): pp- 39-46

[98] Wang W, Qi WJ, Xu Yang, Wang JY, Lou F. **2010**. The differential effects of depression on evoked and spontaneous pain behaviors in olfactory bulbectomized rats. Neurosci Lett. 2010 March 19; 472(2): 143–147.

[99] Wann BP, D'Anjou B, Bah TM, Webster HH, Godbout R, Rousseau G. **2009**. Effect of olfactory bulbectomy on adenylyl cyclase activity in the limbic system. Brain Res Bull. Apr 6; 79(1):32-6.

[100] Yang SJ, Yu HY, Kang DY, Ma ZQ, Qu R, Fu Q, Ma SP. **2014**. Antidepressant-like effects of salidroside on olfactory bulbectomy-induced pro-inflammatory cytokine production and hyperactivity of HPA axis in rats. Pharmacol Biochem Behav. 124:451-7.

ANEXOS

1.- Materiales

2.- Reactivos

3.- Metodologías

3.1 Protocolos de Pruebas conductuales

3.1.1.- Prueba de discriminación olfatoria

3.1.2- Prueba de evitación a la luz

3.1.3.- Conducta motora en el modelo de campo abierto

3.2.- Ensayos moleculares

3.3.- Pruebas bioquímicas

3.4.- Inmunohistoquímicas

3.5.- Tinción

ANEXO 1

MATERIALES UTILIZADOS

Determinación	Material/Aparato	Marca	Observaciones
Mediciones zoometricas	Termómetro digital	Sejoy	Rango 30-42°C
	Balanza	Royal	Rango 1-1500g
Reactivos y soluciones de trabajo	Material de vidrio de uso en el laboratorio	Pyrex	Necesario para cada determinación
	Balanza analítica	Precisa	Modelo XT220A
	Parrilla magnética y de calentamiento	Kika Werker	Modelo RCT basic
	Potenciómetro	Conductronic	Modelo 100H
Cirugía OBX	Estereotáxico		
	Mini taladro	Dremel	Modelo 7700
	Brocas con fresa	Comercial	Acero
	Esponja quirúrgica	Gelfoam	10x8x0.8 cm
	Material desechable (jeringas, bisturí, cánula, algodón, toallas de papel, guantes)	Variable	Necesario para cada determinación
	Pinzas y porta agujas	Guttek	Acero inoxidable
	Sutura de seda	American Suture	Seda negra

			33BI1
Pruebas conductuales	Caja Campo Ambierto	Tecnología MEX	Material de Triplay 6 mm
	Caja PA	Tecnología MEX	Diseño y fabricación EAA
	Cajas individuales	Material de acrílico	Medidas 35X25X14 cm
	Aserrín estéril	Comercial	Proporcionado por el bioterio Claude Bernal
ELISA	Micropipetas	Gilson/Eppendorff	20, 100, 200, 1000 µl
	Placa 96 pozos p/ELISA	Arbor Assays	Catálogo K019-H1
Tinción e Inmunohistoquímicas	Portaobjetos de vidrio	Madesa	Borde esperilado
	Vibratomo	Leica	VT 1000 S
	Microtomo	Microm	HM 310
	Cuba de tinción	Comercial	Vicrio y acrílico
	Películas adheribles	Parafilm	
qPCR	Termociclador	Thermo Scietific	Modelo PikReal Real-Time PCR System

ANEXO 2

REACTIVOS UTILIZADOS

Determinación	Reactivos	Observaciones
Mediciones zoometricas	Clorhexidina	Proporcionada por el bioterio Claude Bernard
	Alcohol	Etanol 75% Productos Mena
Reactivos y soluciones de trabajo	PBS	Stock 10x, Solución de trabajo 1x
	Formalina 4% en PBS	OxiDIAL
	Jabón neutro	DEXTRAN
	Agua destilada	
Cirugía OBX	Anestésico (Xilazina/Ketamina)	Proporcionado por el Bioterio Claude Bernard
	Analgésico (Ketoprofeno)	Proporcionado por el Bioterio Claude Bernard
	Benzal 20%	DermoCleen
	SSI	
	Solución glucosada 1%	Preparada al momento
	Solución inyectable	
	Penicilina 1000000 U	
Pruebas conductuales	Galletas con chispas de chocolate	Deliciosas® con chocochispas LARA
ELISA	Kit de detección de cAMP	Marca Arbor Assays
Tinción e Inmunohistoquímicas	Violeta de cresilo 2%	
	Alcoholes (70, 80, 90, 96, 100%)	
	Xilol-Alcohol 50-50%	

	Xilol (1 y 2)	
	Parafina	
	H₂O₂ 3%	
	Anticuerpo primario 5-HT1A	Santa Cruz
	Anticuerpo primario Akt	Santa Cruz
	Biotina	
	DAB	
qPCR	Kit iTaq Sybr Green One-Step	BIORAD

ANEXO 3

PRUEBAS CONDUCTUALES

A) DISCRIMINACIÓN OLFATORIA

Se utilizaron cajas individuales (35 x 25 x 14 cm); en la base de la caja se colocaron 2 galletas con chispas de chocolate (4 g c/u) en contra esquina; y se agregó una capa aserrín (20 g de aserrín para cubrir el espacio de la base y las galletas). Los animales se dejaron en ayuno previo de 15 horas para estimular el apetito e interés en la prueba; se colocó a cada animal en la caja durante 5 minutos y se cronometró el tiempo que tardaban en encontrar la primera galleta. Los ensayos fueron llevados a cabo de 7 a 8 de la mañana.

B) EVITACIÓN A LA LUZ

Se tomó en consideración el protocolo de Masuda y colaboradores (2013) en el diseño del aparato de prueba, el cual consistió en una cámara con dos cuadrantes iguales (uno oscuro y uno con luz) conectados entre sí. Se aplicó una luz incandescente de 60 watts a la zona de luz y se introdujo al animal 4 periodos de 4 minutos cada uno separados por un lapso de 2 horas, cronometrando el tiempo de permanencia en la zona de luz. Los experimentos fueron llevados a cabo entre las 9 y 14 horas, en el ciclo diurno de los animales.

C) MODELO DE CAMPO ABIERTO

El aparato de prueba es una caja con medidas 60 x 60 x 60 cm de lado que en su base está dividido en cuadros de 20 cm de lado. Se limpió la caja, previo a cada análisis, con etanol (70%) para eliminar olores y residuos biológicos. Se colocó a cada animal en el centro de la caja y se filmó durante 5 minutos.

Una vez recolectados los videos, se analizó cada rubro (actividad horizontal, conducta estática, número de erguidos y número de acicalamientos) por separado y se recolectaron los datos en tablas individuales para realizar la estadística.

ANEXO 4

AISLAMIENTO DE RNA



ZR RNA MiniPrep™
Catalog Nos. R1064 & R1065

Preparación del Buffer:

Antes de empezar, agregar 96 ml 100% etanol (104 ml de etanol 95%) a 24 ml RNA Wash Buffer concentrado.

Protocol 1

1. Cell homogenization/sample preparation²:

Muestras de tejidos: Agregar 400 µl RNA Lysis Buffer directamente a la muestra y homogenizar mecánicamente al menos 25 mg de tejido fresco o congelado.

2. Centrifugar a $\geq 12,000 \times g$ por 1 minuto.

3. Transferir el sobrenadante del paso 2 a una columna Zymo-Spin™ IIC acoplada a un tubo colector. Centrifugar a $8,000 \times g$ por 30 s. Guardar el filtrado.

4. Agregar 0.8 de volumen etanol (95-100%) y mezclar.

5. Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIC 4 conectada a un tubo colector. Centrifugar a $\geq 12,000 \times g$ por 1 minuto. Descartar el filtrado.

6. Agregar 400 µl RNA Prep Buffer a la columna. Centrifugar a $\geq 12,000 \times g$ por 1 minuto.

7. Agregar 800 µl RNA Wash Buffer to the column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ por 30 s. Descartar el filtrado y colocar la columna Zymo-Spin™ IIC nuevamente en el tubo colector. Repetir el paso de lavado con 400 µl RNA Wash Buffer.

8. Centrifugar la columna Zymo-Spin™ a $\geq 12,000 \times g$ por 2 minutos en un tubo colector vacío para asegurar la salida completa del buffer de lavado.

9. Colocar la columna Zymo-Spin™ IIC en un tubo libre de RNasas. Adicionar ≥ 25 μ l de agua libre de nucleasas directamente a la matriz de la columna y dejarlo reposar durante un minuto a temperatura ambiente.
10. Centrifuga a $10,000 \times g$ for 30 segundos para eluir el RNA de la columna. El RNA puede ser utilizado inmediatamente o almacenado a $\leq -70^{\circ}\text{C}$

ANEXO 5

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

A) DESPARAFINACIÓN

- 1.- Xilol 5'
- 2.- Xilol 5'
- 3.- Xilol-Alcohol (50-50%) 5'
- 4.- Alcohol etílico (100%) 5'
- 5.- Alcohol etílico (90%) 5'
- 6.- Alcohol etílico (80%) 5'
- 7.- H₂O destilada 1'

B) PREPARACIÓN ANTICUERPO PRIMARIO

- 8.- PBS (1x) 5'
- 9.- H₂O₂ (4%) 30'
- 10.- PBS (1x) 10' (dos lavados 5')
- 11.- Albúmina Sérica de Bovino (ABS 1% en PBS) 1 hora
- 12.- PBS (1x) dos lavados 5'
- 13.- Tritón (0.1%) 10'
- 14.- PBS (1x) dos lavados 5'
- 15.- Anticuerpo primario (solución en ABS 1%) 18-24 hrs 4°C

C) REVELACIÓN (ANTICUERPO SECUNDARIO)

16.- PBS (1x) dos lavados 5'

17.- Biotina 1 hora 30'

18.- PBS (1x) 5'

19.- Streptavidina HRP 1 hora

20.- PBS (1x) lavado 1'

21.- DAB (solución con su diluyente) 1' a 2' observando que el tejido se torne café.

22.- Colocar en H₂O destilada.

D) CONTRASTE

23.- Hematoxilina de Harris 1'

24.- Agua corriente 1'

25.- H₂O destilada 5'

E) RESINA Y MONTADO

26.- Deshidratar con etanol (80, 90, 100%) 5' c/u

27.- Xilol 5'

28.- Colocar resina sintética y cubre objetos.

29.- Dejar secar en una superficie plana y horizontal 48 h. Limpiar la laminilla y observar al microscopio.

ANEXO 6

DETECCIÓN DE AMP CÍCLICO



DetectX[®]
Direct Cyclic AMP
Enzyme Immunoassay Kit

A) PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

1.- Rotular 6 tubos (perfectamente limpios y secos, descontaminar con mezcla crómica y enjuagar perfectamente con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado sea 7).

2.- Pipetear 270 μ l de diluyente (sample diluent) en el tubo #1 y 200 μ l en los demás.

3.- Pipetear 30 μ l de cAMP stock en el tubo #1 y mezclarlo en el vortex por cinco segundos.

4.- Pipetear 100 μ l del tubo #1 al tubo #2 y homogenizar 5 segundos en el vortex. Tomar sucesivamente del tubo #2 al #3 y así hasta terminar los tubos.

	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6
Sample diluent (μ l)	270	200	200	200	200	200
Adición de	Stock	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
Volumen (μ l)	30	100	100	100	100	100
Concentración [pM/ml]	150	50	16.67	5.56	1.85	0.617

B) PROTOCOLO REGULAR (MUESTRAS CON NIVELES ALTOS DE AMP CÍCLICO)

1.- Usar el plato de pozos incluido en el Kit (que debe estar almacenado a 4°C. Hacer un esquema de las muestras y los estándares para marcar los pozos a utilizar.

2.- Adicionar 25 µl de Plate Primer a los pozos a utilizar. Es muy importante o falla todo el ensayo.

3.- Pipetear 75 µl de Sample Diluent en el pozo NBS (unión no específica/blanco).

4.-Pipetear 50 µl de Sample Diluent en pozo B0 (concentración cero).

5.- Pipetear 50 µl de muestra o estándar en los pozos marcados para ello (el diluyente debe virar de naranja a rosa si se agregó previamente el Plate Primer).

6.- Agregar 25 µl de Detect X cAMP Conjugate a cada pozo (todos los pozos a utilizar).

7.- Agregar 25 µl de Detect X cAMP Antibody a cada pozo excepto al NBS (debe haber 100 µl en cada pozo).

8.- Darle un delicado golpe para eliminar cualquier burbuja, cubrir con la película y mezclar a temperatura ambiente por 2 horas (si se desea en oscuridad). Nota: la falta de mezcla puede impactar en un 25% menos de eficacia en las lecturas.

9.- Aspirar la placa y lavar cada pozo 4 veces con 300 µl de Wash Buffer. Tapar con toallas absorbentes.

Trabajar en oscuridad a partir de este punto.

10.- Agregar 100 µl de TMB substrate a cada pozo.

11.- Incubar sin agitación por 30 minutos.

12.- Adicionar 50 µl de Stop Solution a cada pozo.

13.- Leer la densidad óptica generada en un lector de placas a 450 nm.

14.- Usar un software para graficar los datos obtenidos y el cálculo de la concentración de la muestra.

ANEXO 7

TINCIÓN DE NISSL

Preparación del tejido:

Los cerebros deben fijarse en una solución de formalina 10% en PBS durante al menos 48 horas. Se cortan secciones (coronales o sagitales) de 25-30 μm que se recolectan en laminillas previamente gelatinizadas (solución de gelatina 2%).

Protocolo de tinción:

- 1.- Colocar las laminillas bien secas en una solución de Violeta de cresilo 2% durante 45 minutos.
- 2.- Lavar con agua corriente.
- 3.- Dar un pase rápido por alcohol etílico 75%.
- 4.- Dar un pase rápido por alcohol etílico 90%.
- 5.- Dar un pase rápido por alcohol etílico 100%.
- 6.- Sumergir en Xileno 40 minutos.
- 7.- Pasar a Xileno limpio 1 hora más o hasta que las laminillas se vean totalmente limpias.
- 8.- Colocar resina sintética y cubreobjetos. Dejar secar, limpiar antes de observar al microscopio.