



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

**Análisis del efecto tipo antidepresivo de un agonista
inverso del H₃R, en ratones adolescentes macho:
Interacción entre histamina y los sistemas
monoaminérgicos**

Tesis que presenta

Med. Cir. Héctor Miguel Mancha Gutiérrez

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de la Tesis: Dra. Carolina López Rubalcava

Este trabajo se realizó en el laboratorio 17 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Carolina López Rubalcava. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca número 421354, para estudios a nivel nacional.

Clama a mí, y yo te responderé, y te enseñare cosas grandes y ocultas que tú no conoces.

Jeremías 33:3

A mi madre María de Lourdes Gutiérrez Cisneros

Por ser el mejor ejemplo de amor, de valor y de esfuerzo
Por ser invencible ante la vida y luchar siempre por sus hijos
Por hacerme crecer, por confiar en mí y apoyarme siempre

A mi padre Martin Mancha Rivera

Por ser mi mayor ejemplo de responsabilidad, trabajo y lealtad
Por su apoyo incondicional

A mi esposa Dalia Gabriela Fuentes Hidalgo

Por ser el amor de mi vida y la mujer de mis sueños
Por ayudarme a crecer y ser mejor persona todos los días
Por sujetar mi mano y levantarme
Porque simplemente eres el regalo más grande del cielo, TE AMO

A mis hermanos Julio Cesar, Irving Arturo y Omar, a mis sobrinos Santiago, León y Leví. Porque trato de ser un ejemplo para aquellos que siguen mis pasos.

Porque sin ustedes nada de esto sería posible, gracias por todo. Este trabajo es de ustedes y para ustedes, los amo.

Agradecimientos:

Dra. Carolina López Rubalcava, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por apoyar mis ideas y opiniones, por enriquecer mi trabajo y ayudarme a ser mejor, en verdad mil gracias.

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, gracias porque su crítica siempre constructiva me hace ser mejor, por ayudarme a organizar mis ideas y por su aportación a este trabajo, muchas gracias.

Dr. Ofir Picazo Picazo, gracias por ser parte de este proyecto, por sus comentarios acertados y por la retroalimentación recibida, gracias.

A todos los Doctores del Departamento de Farmacobiología, gracias porque con sus clases y enseñanzas contribuyeron a este trabajo.

Isabel y José Juan, mis nuevos muy mejores amigos, muchas gracias por su amistad y por su apoyo incondicional, gracias hacer que este tiempo en el laboratorio 17 haya sido increíble.

Al resto de la banda del laboratorio 17, las que ya no están Caro y Candy, los que aún siguen por acá Meli, Brenda, Helena, Jessy, Elena, Saúl, Kari, Dona y Dany, gracias por su ayuda, sus comentarios, su compañerismo y su amistad.

Al “Dream Team” Brenda, Nash, Vale y Felipe gracias por su amistad, por los buenos momentos, por hacer amena la maestría, por sus pláticas enriquecedoras, porque siempre se aprende algo estando con ustedes, sigan luchando por todo lo que desean.

Índice de contenidos

Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introducción.....	1
1.1. La histamina.....	1
1.2. La histamina dentro del sistema nervioso central.....	2
1.2.1. El sistemas histaminérgico.....	3
1.2.2. Funciones de la histamina dentro del sistema nervioso central.....	4
1.2.3. Receptores a histamina.....	5
1.2.4. El receptor H ₃ de histamina.....	6
1.2.5. Clobenpropit.....	10
1.3. Depresión.....	11
1.3.1. Depresión en la adolescencia.....	11
1.4. Neurobiología de la depresión.....	13
1.4.1. Hipótesis de las monoaminas.....	13
1.4.2. Hipótesis del estrés y el sistema neuroendocrino.....	15
1.5. Histamina, Estrés y Depresión.....	18
1.6. Modelos animales de depresión.....	20
1.6.1. Modelo de nado forzado.....	21
1.6.2. Modelo de estrés crónico por derrota social.....	22
1.7. Justificación.....	23
1.8. Hipótesis.....	23
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo general.....	23
2.2. Objetivos particulares.....	24
3. Material y métodos.....	24
3.1. Animales.....	24
3.2. Fármacos.....	24
3.2.1. Administración intracerebroventricular.....	25
3.2.2. Uso de neurotoxinas 5,7-DHT, DSP4 y 6-OHDA para dañar los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, respectivamente.....	25
3.3. Modelos animales de depresión.....	26
3.3.1. Modelo de nado forzado.....	27
3.3.2. Modelo de estrés crónico por derrota social.....	28
3.3.2.1. Selección de ratones agresores.....	28
3.3.2.2. Protocolo de estrés crónico por derrota social.....	29
3.3.2.3. Prueba de interacción social.....	31
3.4. Actividad locomotora y rota rod.....	33
3.5. Obtención de muestras para determinar la concentración tisular de monoaminas por cromatografía líquida de alta resolución.....	33
3.6. Diseño experimental.....	34

3.6.1. Experimento 1.....	34
3.6.2. Experimento 2.....	34
3.6.3. Experimento 3.....	36
3.6.4. Experimento 4.....	37
3.6.5. Experimento 5.....	37
4. Análisis estadístico.....	37
5. Resultados.....	38
5.1. Comparar la conducta tipo depresión en ratones adolescentes macho de la cepa SW durante las etapas pre puberal, puberal y pos puberal en el modelo de nado forzado.....	38
5.2. Analizar el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H ₃ R en ratones adolescentes macho de la cepa SW en el modelo de nado forzado y determinar su efecto sobre las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la PFC y la amígdala.....	39
5.3. Determinar la participación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H ₃ R, con el uso de las neurotoxinas 5,7-DHT, DSP4 y 6-OHDA, respectivamente.....	42
5.4. Montar el modelo de estrés crónico por derrota social en ratones adolescentes macho de la cepa SW.....	49
5.5. Analizar los posibles efectos antidepresivos del agonista inverso del H ₃ R en el modelo de ECDS.....	51
6. Discusión.....	53
6.1. Conducta tipo depresión en ratones adolescentes macho.....	53
6.2. Efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H ₃ R en el modelo de nado forzado.....	55
6.3. Los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico participan en la mediación del efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H ₃ R.....	57
6.4. El modelo de estrés crónico por derrota social en ratones adolescentes macho de la cepa SW, induce comportamientos tipo depresión.....	62
6.5. En un tratamiento agudo, el agonista inverso de H ₃ R no revierte la conducta de aislamiento social, pero si logro revertir la conducta de desesperanza, en ratones expuestos al ECDS.....	65
7. Conclusiones.....	66
8. Perspectivas.....	67
9. Bibliografía.....	68

Índice de figuras

Figura 1. Estructura molecular de la histamina.....	1
Figura 2. Biosíntesis, liberación y metabolismo de la histamina en el SNC.....	2
Figura 3. El sistema histaminérgico en el cerebro humano: origen y proyecciones...3	
Figura 4. Estructura del H ₃ R humano.....	6
Figura 5. Organización genómica del H ₃ R humano.....	7
Figura 6. Vías de señalización del H ₃ R.....	8
Figura 7. El modelo de los dos estados para el H ₃ R.....	9
Figura 8. Estructura molecular de clobenpropit.....	10
Figura 9. Hipótesis de las monoaminas.....	13
Figura 10. Eje hipotálamo – hipófisis – adrenal y curso temporal de los cambios en respuesta a las hormonas del estrés.....	15
Figura 11. Referencias externas para localizar el sitio de la inyección i.c.v.....	25
Figura 12. Estructura química de las neurotoxinas.....	26
Figura 13. Modelo de nado forzado.....	27
Figura 14. Caja hogar para el modelo de ECDS.....	29
Figura 15. Fases del modelo de ECDS.....	30
Figura 16. Arena de interacción social.....	31
Figura 17. Fases de la prueba de interacción social.....	32
Figura 18. Generalización del tiempo aproximado y eventos del desarrollo puberal y la adolescencia, en roedores macho.....	34
Figura 19. Conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado.....	38
Figura 20. Efecto de clobenpropit sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado.....	39
Figura 21. Efecto de clobenpropit sobre las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la corteza prefrontal y la amígdala.....	40
Figura 22. Efecto de clobenpropit sobre los movimientos, distancia total recorrida y velocidad media, dentro de la arena del actímetro.....	41
Figura 23. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 5,7-DHT.....	42
Figura 24. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de nado en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 5,7-DHT.....	43
Figura 25. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 5,7-DHT.....	44

Figura 26. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con DSP4.....	45
Figura 27. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de nado en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con DSP4.....	45
Figura 28. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con DSP4.....	46
Figura 29. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 6-OHDA.....	47
Figura 30. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de nado en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 6-OHDA.....	47
Figura 31. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 6-OHDA.....	48
Figura 32. Registro de peso de los ratones adolescentes durante el protocolo de ECDS.....	49
Figura 33. Prueba de interacción social en los ratones adolescentes expuestos al ECDS.....	50
Figura 34. Desarrollo de la conducta de aislamiento social con base en la tasa de interacción presentada en los ratones adolescentes expuestos al ECDS.....	50
Figura 35. Efectos del ECDS sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en los ratones que desarrollaron la conducta de aislamiento social...51	
Figura 36. Efecto de clobenpropit sobre la prueba de interacción social en ratones adolescentes con la conducta de aislamiento social.....	52
Figura 37. Efecto de clobenpropit sobre la TI.....	52
Figura 38. Efecto de clobenpropit sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en ratones adolescentes con conducta de aislamiento social.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones en las que participa el sistema histaminérgico.....	4
Tabla 2. Principales características de los receptores a histamina.....	5
Tabla 3. Evidencias sobre el efecto tipo antidepressivo de algunos compuestos con actividad sobre los H ₃ R's.....	19
Tabla 4. Grupos tratados con las neurotoxinas (DP38).....	36
Tabla 5. Numero de caídas durante la prueba de rota rod.....	41

Abreviaturas

5,7-DHT.....	5,7-dihidroxitriptamina
5-HT.....	Serotonina
6-OHDA.....	6-hidroxidopamina
AC.....	Adenilato ciclasa
ACTH.....	Hormona adrenocorticotrópica
AMPK.....	Proteína cinasa activada por AMP
ATV.....	Área tegmental ventral
AVP.....	Arginina vasopresina
cAMP.....	AMP cíclico
CCa.....	Corteza cingulada anterior
CREB.....	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CRH.....	Hormona liberadora de corticotropina
DA.....	Dopamina
DAG.....	Diacilglicerol
DP.....	Día posnatal
DRN.....	Núcleo dorsal del rafe
DS.....	Derrota social
DSP4.....	N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina
ECDS.....	Estrés crónico por derrota social
GABA.....	Ácido γ amino butírico
GIRK.....	Canal de K ⁺ acoplado a proteínas G
GPRCs.....	Receptores acoplados a proteínas G
H1R.....	Receptor H ₁ de histamina
H2R.....	Receptor H ₂ de histamina
H3R.....	Receptor H ₃ de histamina
H4R.....	Receptor H ₄ de histamina
HDC.....	Histamina descarboxilasa
HHA.....	Hipotálamo – hipófisis – adrenal
HNMT.....	Histamina N metiltransferasa
HPLC.....	Cromatografía líquida de alta resolución
hTPH2.....	Triptófano hidroxilasa humana 2

i.c.v.....	Intra cerebro ventricular
i.p.....	Intra peritoneal
IP3.....	Inositol trifosfato
ISRS.....	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
IUPHAR.....	Unión internacional de farmacología
LC.....	Locus coeruleus
MAO-A.....	Monoamino oxidasa A
MAPK.....	Proteína cinasas activadas por mitógenos
PFC.....	Corteza prefrontal
mRNA.....	RNA mensajero
NA.....	Noradrenalina
NAc.....	Núcleo accumbens
NF- κ B.....	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NTM.....	Núcleos tuberomamilares
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
PFC.....	Corteza prefrontal
PIK3.....	Fosfatidil inositol 3 cinasa
pK _i	Constante de inhibición
PKA.....	Proteína cinasa A
PKC.....	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC.....	Fosfolipasa C
PVN.....	Núcleo paraventricular
SNC.....	Sistema nervioso central
SW.....	Swiss Webster
TI.....	Tasa de interacción
TVM.....	Transportador vesicular de monoaminas

Resumen

La depresión en adolescentes, se asocia con el suicidio y la tendencia a la cronicidad; la falta de tratamientos efectivos contribuye a este pronóstico. En animales adultos algunos antagonistas/agonistas inversos del H₃R han mostrado un efecto tipo antidepresivo; el mecanismo a través del cual estos compuestos ejercen este efecto no es del todo claro, además no existe evidencia de su efectividad en animales adolescentes. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto tipo antidepresivo de un agonista inverso del H₃R (clobenpropit), en dos modelos animales de depresión, en ratones adolescentes macho y estudiar la participación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, en la mediación de dicho. Ratones adolescentes macho (día posnatal 45, DP45), fueron administrados vía i.p con clobenpropit (5 mg/kg) y posteriormente fueron sometidos al modelo de nado forzado, se evaluó también el efecto de clobenpropit sobre la concentración extracelular de 5-HT, NA y DA, en la corteza pre frontal y la amígdala. En otro experimento, ratones adolescentes macho (DP38), fueron tratados con las neurotoxinas serotoninérgica (5,7-DHT), o noradrenérgica (DSP4), o dopaminérgica (6-OHDA). En el DP45 estos mismos ratones fueron administrados vía i.p con clobenpropit (5 mg/kg) y posteriormente fueron sometidos al modelo de nado forzado. Otro grupo experimental de ratones adolescentes macho, fue sometido al modelo de estrés crónico por derrota social (ECDS) del DP28 al DP43; posteriormente se realizaron las pruebas conductuales de interacción social y nado forzado. Por último, un grupo independiente de ratones adolescentes macho sometidos al ECDS (DP28-43) y que desarrollaron la conducta de aislamiento social, fueron administrados vía i.p con clobenpropit (5 mg/kg) y posteriormente se les realizaron las pruebas conductuales de interacción social y nado forzado (DP46). Nuestros resultados demuestran que clobenpropit, tiene un efecto tipo antidepresivo en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado, este efecto se acompañó de un incremento significativo en la concentración tisular de 5-HT, NA y DA en la corteza prefrontal; además presentamos evidencia de que los sistemas monoaminérgicos, participan en la mediación de dicho efecto. Demostramos también que en ratones adolescentes macho, el ECDS es útil para inducir las conductas de aislamiento social y desesperanza, además de cambios en el peso corporal; clobenpropit en dosis única presentó un efecto tipo antidepresivo parcial en estos ratones, ya que no fue suficiente para revertir la conducta de aislamiento social, pero si fue útil para revertir la conducta de desesperanza.

Abstract

Depression in adolescence is associated with suicide and to its chronic development and the lack of effective treatments has contributed to this prognosis. In adult animals, some H₃R antagonists/inverse agonists have shown an antidepressant-like effects; the mechanism by which these compounds exert their antidepressant-like effects it is not at all clear. Furthermore, there is no evidence of whether these compounds are useful in adolescent animals. The objective of this work was to evaluate the antidepressant-like effect of an H₃R inverse agonist (clobenpropit), in two animal models of depression, using male adolescent mice and to study the participation of the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in the mediation of this effect. Male adolescent mice (postnatal day 45, PD45), were administered via i.p with clobenpropit (5 mg/kg) and were subsequently subjected to forced swim test, the effect of clobenpropit on extracellular concentration of 5-HT, NA y DA in the prefrontal cortex and amygdala was evaluated also. Furthermore, male adolescent mice were treated with either the serotonergic (5,7-DHT), or noradrenergic (DSP4), or dopaminergic (6-OHDA) neurotoxins. On PD45 these same animals were administered via i.p with clobenpropit (5 mg/kg) and were subsequently subjected to the forced swim test. Another experimental group of male adolescent mice was submitted to the model of chronic social defeat stress (CSDS, from PD28 to PD43), and subsequently behavioral test of social interaction and forced swim were performed. Finally, an independent group of male adolescent mice that previously underwent to CSDS (PD28-43) and who developed the social isolation behavior, were administered via i.p with clobenpropit (5 mg/kg) and subsequently they were tested for social interaction and immediately after forced swim test (PD46). Our results show that clobenpropit, has an antidepressant-like effect in male adolescent mice in forced swim test; this effect was accompanied by a significant increase in tissue concentration of 5-HT, NA y DA in prefrontal cortex; we also present evidence that the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems, participate in mediation of this effect. We also show that in male adolescent mice, the CSDS is a useful model for the induction of social isolation and behavioral despair, as well as changes in body weight; a single dose of clobenpropit displayed a partial antidepressant-like effect in these mice, since it was not enough to reverse social isolation behavior, but it was useful to reverse despair behavior.

1. Introducción

1.1. La histamina

La histamina (2-{imidazol-4} etilamina) es una amina biogénica endógena, que se localiza en casi todos los tejidos del organismo (Fig. 1). Su nombre deriva de la palabra griega *histos*, que significa tejido. Las mayores concentraciones de histamina han sido reportadas en pulmones, piel y tracto gastrointestinal (Panula et al. 2015).

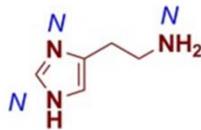


Fig. 1. Estructura molecular de la histamina (Tomado de Sadek et al. 2016).

La histamina participa y regula un gran número de actividades, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Estas actividades incluyen proliferación y diferenciación celular, hematopoyesis, homeostasis, desarrollo embrionario, regeneración y cicatrización, neurotransmisión y funciones cerebrales, secreción de hormonas hipofisarias y funciones endócrinas, regulación de la función gastrointestinal y cardiovascular, reacción inflamatoria y modulación de la respuesta inmune (Shahid et al. 2010).

La histamina fue sintetizada por primera vez en 1907 por Windaus y Vogt; sus efectos biológicos fueron caracterizados hasta 1910 por Henry Dale y Patrick Laidlaw, quienes describieron su capacidad para contraer el músculo liso intestinal y su potente actividad vasodilatadora (Mahdy and Webster 2017; Shahid et al. 2009). La relación entre la histamina y las reacciones anafilácticas fue observada por primera vez en 1929, tres años más tarde se identificó a la histamina como el principal mediador de esta reacción; en 1952 se asoció a la histamina con las células cebadas y se le reconoció como el principal mediador en las reacciones alérgicas (Shahid et al. 2009). El primer compuesto antihistamínico, reportado por Ungar, Parrot y Bovet en 1937, fue el piperoxan que bloqueó el efecto de la histamina sobre el músculo liso intestinal; desafortunadamente su elevada toxicidad no le permitió el posterior desarrollo clínico. En 1942, la fenoxibenzamina fue el primer compuesto antihistamínico utilizado en humanos, con el objetivo de contrarrestar

la urticaria (Shahid et al. 2009). A partir de entonces, los antihistamínicos se han utilizado ampliamente en el tratamiento de diversas enfermedades.

1.2. La histamina dentro del sistema nervioso central

El interés en la histamina como neurotransmisor surge al observar la sedación inducida por los fármacos con acción antihistamínica. El hecho de que estos compuestos cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica, sugirió la presencia de histamina y de sus receptores dentro del sistema nervioso central (SNC). La presencia de histamina en el SNC, fue confirmada en 1941 por Kwiatkowski y fue hasta 1959 que White demostró, *in vitro*, su síntesis y catabolismo en tejido cerebral de rata (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). La histamina se sintetiza a partir del aminoácido L-histidina, mediante una descarboxilación oxidativa llevada a cabo por la histidina descarboxilasa (HDC), que es la enzima limitante en la síntesis y es dependiente de fosfato de piridoxal (Shan, Bao, and Swaab 2015). A diferencia de otras aminas biogénicas, la tasa de síntesis de la histamina está determinada por la biodisponibilidad de su precursor, por lo que el transportador de L-aminoácidos en la membrana de las neuronas histaminérgicas, es esencial para asegurar la disponibilidad de L-histidina al interior de estas neuronas (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). Una vez sintetizada, la histamina es transportada y almacenada dentro de vesículas en la terminal sináptica por acción del transportador vesicular de monoaminas (TVM) y es liberada ante la llegada de un potencial de acción (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). La regulación de la síntesis y liberación de histamina está determinada por la activación de autorreceptores presinápticos H₃, que en condiciones fisiológicas presentan actividad constitutiva y mantienen un tono inhibitorio sobre estos procesos (Arrang, Garbarg, and Schwartz 1983) (Fig. 2).

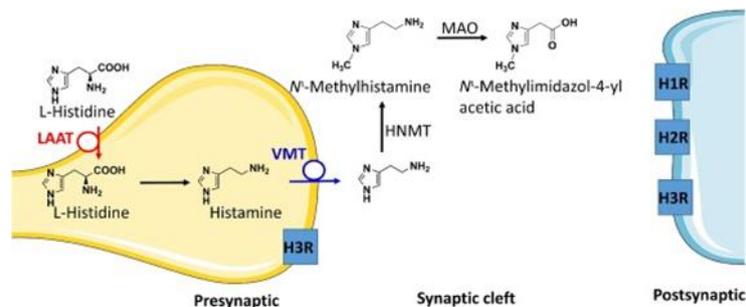


Fig. 2. Biosíntesis, liberación y metabolismo de la histamina en el SNC (Tomado de Sadek et al. 2016).

Una vez que la histamina es liberada a la hendidura sináptica, la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT) es la responsable de su metabolismo e inactivación en el espacio extracelular. Es importante resaltar que, a diferencia de otros sistemas monaminérgicos, las neuronas histaminérgicas carecen de un transportador o mecanismo específico de recaptura (Ellenbroek and Ghiabi 2014; Nieto-Alamilla et al. 2016; Sadek et al. 2016), por lo tanto, la histamina permanece más tiempo en el espacio extracelular y se ha propuesto que sus acciones que pueden ir más allá de la comunicación sináptica tradicional (Ellenbroek and Ghiabi 2014).

1.2.1. El sistema histaminérgico

Las neuronas histaminérgicas dentro del SNC se encuentran confinadas a los núcleos tuberomamilares (NTM) localizados en el hipotálamo posterior (Dere et al. 2010; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula and Nuutinen 2013; E. H. Schneider, Neumann, and Seifert 2014; Shan, Bao, and Swaab 2015) (Fig. 3). La actividad de las neuronas histaminérgicas es mayor durante los periodos de actividad (vigilia) en distintas especies. Estudios *postmortem* en humanos, han demostrado que existe una mayor expresión del mRNA de la enzima HDC en los NTM durante el día y una menor expresión durante la noche (Shan, Bao, and Swaab 2015).

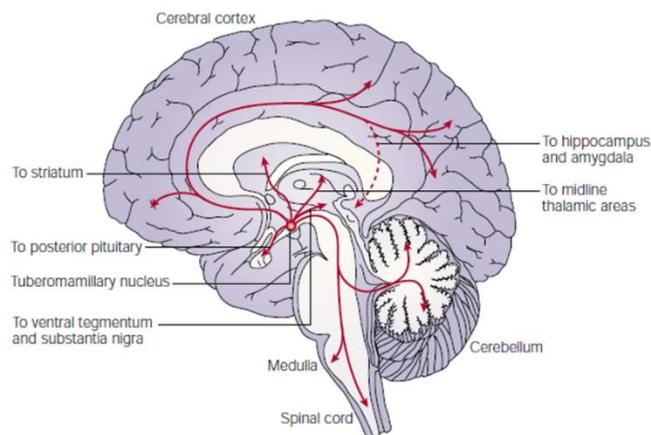


Fig. 3. El sistema histaminérgico en el cerebro humano: origen y proyecciones (Tomado de Haas y Panula 2013).

Los TMN reciben proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza y el hipocampo, GABAérgicas del hipotálamo, noradrenérgicas del locus coeruleus (LC) y serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafé (DRN) (H. L. Haas, Sergeeva,

and Selbach 2008). Al igual que otros núcleos monoaminérgicos, los NTM envían proyecciones a las múltiples regiones del SNC, entre las que destacan la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo, el tálamo, la amígdala, los ganglios basales, el bulbo olfatorio, el tallo cerebral y la médula espinal (Dere et al. 2010; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula and Nuutinen 2013). Es a través de estas proyecciones que la histamina regula distintas funciones dentro del SNC.

1.2.2. Funciones de la histamina dentro del sistema nervioso central

El sistema histaminérgico está involucrado en funciones como la regulación del ciclo sueño/vigilia, la homeostasis energética y endócrina, la cognición y la atención, así como en funciones sensoriales y motoras.

Tabla 1. Funciones en las que participa el sistema histaminérgico

FUNCIÓN	AUTOR Y AÑO
Regulación del ciclo sueño vigilia	(Dere et al. 2010; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula and Nuutinen 2013; Shan, Bao, and Swaab 2015)
Estado de alerta Ritmos biológicos	
Homeostasis energética	(Aquino-Miranda and Arias-Montaña 2012; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula and Nuutinen 2013; Shan, Bao, and Swaab 2015)
Saciedad alimentaria Ingesta y retención de líquidos Termorregulación	
Regulación endócrina	(H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Shan, Bao, and Swaab 2015)
Eje tiroideo Eje somatotropo Reproducción	
Funciones cognitivas	(Dere et al. 2010; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula and Nuutinen 2013; Shan, Bao, and Swaab 2015)
Aprendizaje y memoria Plasticidad sináptica	
Respuesta al estrés y ansiedad	(Dere et al. 2010; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008)
Sistema de recompensa	(Dere et al. 2010)
Funciones sensoriales y motoras	(H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Shan, Bao, and Swaab 2015)
Funciones autónomas y vestibulares	(Aquino-Miranda and Arias-Montaña 2012)

Es importante resaltar que algunas de estas funciones suelen presentar diversos grados de afección en distintos trastornos neuropsiquiátricos como la depresión, la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer (Shan, Bao, and Swaab 2015).

1.2.3. Receptores a histamina

Se conocen cuatro diferentes receptores a histamina, todos ellos metabotrópicos y acoplados a proteínas G (Tabla 2).

Tabla 2. Principales características de los receptores a histamina

RECEPTOR	VIAS DE SEÑALIZACIÓN	FUNCIÓN CELULAR	LOCALIZACIÓN
H₁R Acoplado a proteína G_{q/11} Actividad constitutiva +	1. Fosfolipasa C (PLC). 2. Inositol trifosfato (IP3), Diacilglicerol (DAG) 3. Liberación de calcio a partir de reservas intracelulares. 4. Proteín cinasa C (PKC). 5. Cinasa de AMP (AMPK/NF-κβ).	Excitabilidad postsináptica y plasticidad sináptica.	Tallo cerebral, hipotálamo, tálamo, amígdala, septum, hipocampo, bulbo olfatorio y corteza cerebral.
H₂R Acoplado a proteína G_s Actividad constitutiva +	1. Adenilato ciclasa (AC). 2. AMP cíclico (cAMP) 3. Proteín cinasa A (PKA). 4. Activa el factor de transcripción CREB.	Excitabilidad postsináptica y plasticidad sináptica.	Ganglios basales, amígdala, hipocampo y corteza cerebral.
H₃R Acoplado a proteína G_{i/0} Actividad constitutiva +++	1. Inhibe la adenilato ciclasa (AC). 2. ↓ AMP cíclico (cAMP). 3. Activa las proteín cinasas activadas por mitógenos (MAPK). 4. Activa la vía Akt/GSK3.	Inhibe la síntesis y liberación de histamina (autorreceptores) e inhibe la liberación de otros neurotransmisores (heterorreceptores). Plasticidad sináptica.	Corteza cerebral, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens, estriado, bulbos olfatorios, sustancia nigra, tallo cerebral y cerebelo.
H₄R Acoplado a proteína G_{i/0} Actividad constitutiva ?	1. Inhibe la adenilato ciclasa (AC). 2. ↓ AMP cíclico (cAMP). 3. Activa proteín cinasas activadas por mitógenos (MAPK).	???	Células y vasos sanguíneos, pulmones, hígado e intestino

(H. L. Haas, Sergeeva, And Selbach 2008)

Los receptores a histamina H₁ (H₁R), H₂ (H₂R) y H₃ (H₃R) se expresan ampliamente dentro del SNC, mientras que los receptores H₄ (H₄R) se localizan principalmente en tejidos periféricos, y actualmente existe controversia respecto a su expresión dentro del SNC (Panula et al. 2015). Cada receptor se compone de siete dominios transmembranales, que presentan regiones prototípicas que determinan la especificidad de unión a sus respectivos agonistas y la subsecuente activación del receptor, así como el acoplamiento a proteínas G y el grado de actividad constitutiva del receptor, ya que al menos los H₁R's, H₂R's y H₃R's comparten esta

característica. Modificaciones covalentes en estas regiones prototípicas, como la fosforilación por proteínas cinasas, pueden favorecer la formación de homó y heterodímeros. Estas modificaciones también afectan el anclaje del receptor a la membrana neuronal, así como la sensibilización y desensibilización del receptor (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Leurs et al. 2005; Schlicker and Kathmann 2016).

1.2.4. El receptor H₃ de histamina

El H₃R fue descubierto en 1983 (Arrang, Garbarg, and Schwartz 1983), el cDNA del H₃R humano fue clonado hasta 1999, y se demostró que codificaba para una proteína de 445 aminoácidos (Lovenberg et al. 1999). Como un receptor acoplado a proteína G, el H₃R consta de siete dominios transmembranales, un amino terminal extracelular, un carboxilo terminal intracelular, tres asas extracelulares y tres asas intracelulares (Nieto-Alamilla et al. 2016) (Fig. 4).

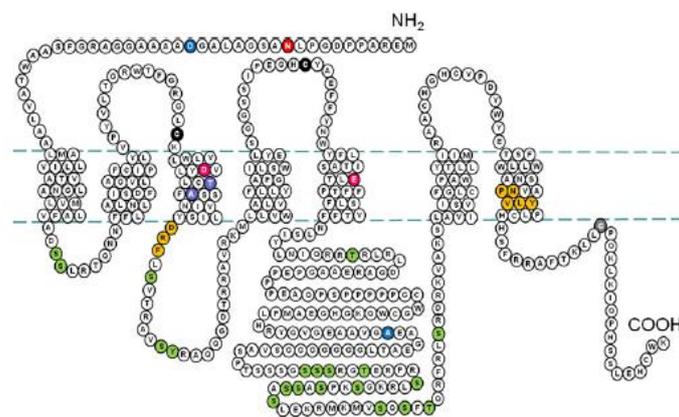


Fig. 4. Estructura del H₃R humano (Tomado de Nieto-Alamilla et al. 2016).

En el humano, el gen que codifica para el H₃R se localiza en el cromosoma 20q13.33 (Bongers, Bakker, and Leurs 2007); este gen consta de tres exones/dos intrones o cuatro exones/tres intrones, que mediante procesamiento alternativo dan lugar a múltiples isoformas del receptor (Bongers, Bakker, and Leurs 2007; Panula et al. 2015). Es importante mencionar que estas isoformas pueden presentar diferentes perfiles farmacológicos (Leurs et al. 2005) (Fig. 5).

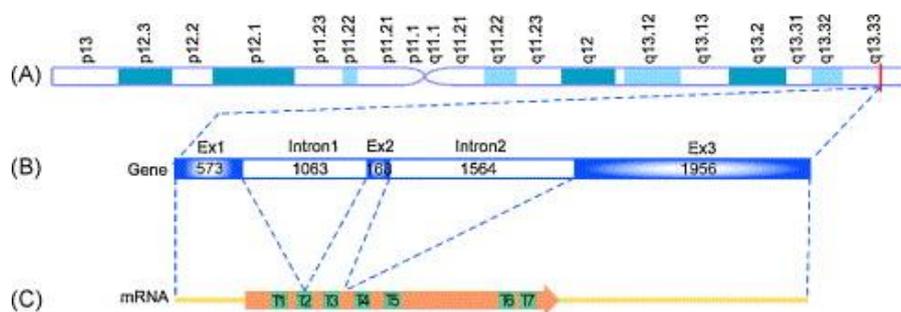


Fig. 5. Organización genómica del H₃R humano. (A) Representación esquemática del cromosoma humano 20 y la localización del gen hH₃R en la región q13.33. (B) Representación esquemática del gen hH₃R, sus exones e intrones. (C) Representación esquemática del mRNA del H₃R humano mostrando la región no traducida, la región codificante y los dominios transmembrana (Tomado de Bongers, Bakker y Leurs 2007).

El H₃R se localiza fuera del SNC en neuronas autonómicas y sensoriales, células endócrinas y el endotelio vascular; pero la mayor cantidad de estos receptores se encuentra en neuronas dentro del SNC (Panula et al. 2015). En el SNC la mayoría de los H₃R's se presenta como receptores presinápticos en los axones terminales de las propias neuronas histaminérgicas (autorreceptor), aunque también se localizan sobre neuronas no histaminérgicas (heterorreceptor), una menor cantidad de H₃R's se presenta como receptores somatodendríticos, únicamente en neuronas histaminérgicas (Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016). Autorradiografías de cerebro de rata con ³H-R- α -metilhistamina, un radioligando altamente selectivo para el H₃R, muestran una gran densidad de H₃R's en el área perimamilar del hipotálamo, región en donde se localizan los NTM, en la corteza cerebral, donde la densidad de H₃R's disminuye en sentido rostral a caudal y es mayor en las capas profundas que en las superficiales, en el estriado y el hipocampo; hay una densidad moderada en el LC y en los núcleos del rafé y una densidad más baja en el tallo cerebral, en el cerebelo y en la médula espinal (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Schlicker and Kathmann 2016).

El H₃R pertenece a la súperfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), específicamente G_{i/o} (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015). Por lo tanto, la activación del H₃R produce una inhibición de la adenilato ciclasa (AC) (Bongers, Bakker, and Leurs 2007; Leurs et al. 2005; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016) y por lo tanto la formación de AMP cíclico (AMPC), lo que genera niveles bajos de AMPC y reduce los subsecuentes procesos de señalización, como la transcripción de genes dependiente de CREB (Lovenberg et al. 1999). La activación de otras vías efectoras como la de las cinasas de proteínas

activadas por mitógenos (MAPK) (Aquino-Miranda and Arias-Montaño 2012; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016), la activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Leurs et al. 2005; Panula et al. 2015), vías que tienen un papel importante en la plasticidad axonal y sináptica (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). Induce el bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje (Aquino-Miranda and Arias-Montaño 2012; Schlicker and Kathmann 2016) y por lo tanto interfiere con la liberación de neurotransmisor; además, favorece la activación de canales de K⁺ modulados por proteínas G (GIRK) (Aquino-Miranda and Arias-Montaño 2012), favoreciendo la salida de K⁺ intracelular que produce una hiperpolarización de la membrana, inhibiendo la propagación de los potenciales de acción (Fig. 6).

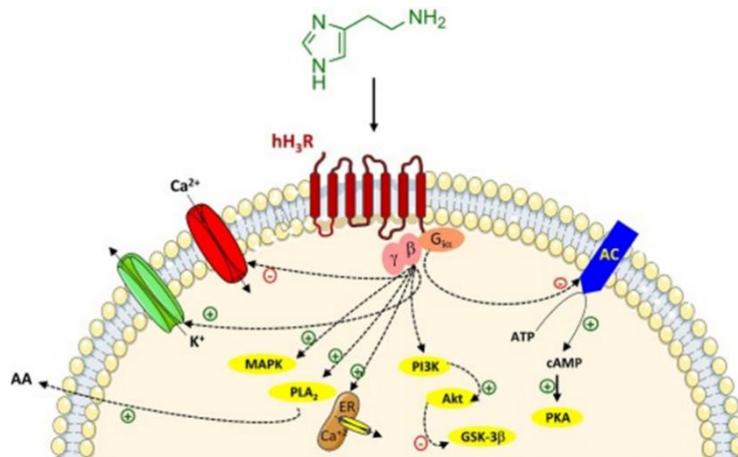


Fig. 6. Vías de señalización del H₃R (Tomado de Sadek et al. 2016).

Con todo lo anterior, podemos decir que el H₃R tiene al menos las siguientes tres funciones. La primera, es funcionar como un receptor presináptico inhibitorio (Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016), ya sea como autorreceptor inhibiendo la liberación de histamina, o como heterorreceptor inhibiendo la liberación de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), dopamina (DA), ácido gamma-amino butírico (GABA), glutamato y acetilcolina (Aquino-Miranda and Arias-Montaño 2012; Esbenshade et al. 2008; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015; Shan, Bao, and Swaab 2015). La segunda, es funcionar como autorreceptor somatodendrítico (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016) en neuronas histaminérgicas, inhibiendo la frecuencia de disparo de estas neuronas (H. Haas and Panula 2003;

Morisset et al. 2000), así como la síntesis de histamina (Moreno-Delgado et al. 2006; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016).

Una propiedad sobresaliente del H₃R, es su elevado nivel de actividad constitutiva (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Leurs et al. 2005; Morisset et al. 2000; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016). La actividad constitutiva, se define como la capacidad de activación y por lo tanto de señalización que presenta un receptor, en ausencia de unión a su agonista o ligando (Arrang, Morisset, and Gbahou 2007; Ellenbroek and Ghiabi 2014; Mahdy and Webster 2017). Esta actividad constitutiva es una propiedad intrínseca de algunos de los GPRCs (Leurs et al. 2005). En el modelo simplificado de los dos estados (Leff 1995; Mahdy and Webster 2017), se postula que los GPRC mediante un proceso de isomerización, transitan de una conformación inactiva a una conformación activa sin necesidad de la unión del ligando; haciendo posible la existencia, en condiciones fisiológicas, de una mayor proporción de GPRCs con una conformación activa (Fig. 7).

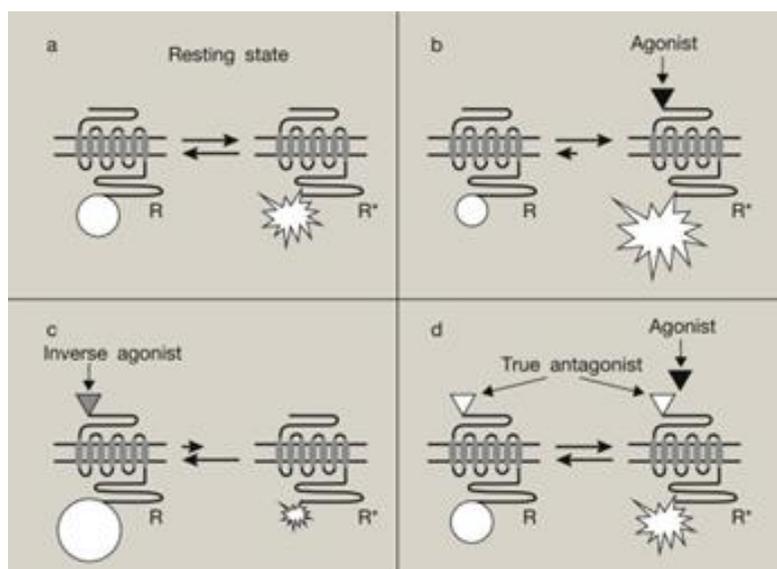


Fig. 7. El modelo de los dos estados para el H₃R. a) En el estado de reposo, existe un balance entre los receptores activos R* y los receptores inactivos R. b) La unión de un agonista cambia el equilibrio hacia un estado activo R*. c) La unión de un agonista inverso cambia el equilibrio hacia un estado inactivo R. d) Los antagonistas verdaderos se unen tanto a receptores activos como inactivos, interfiriendo con la unión del agonista pero sin ningún efecto sobre el equilibrio R/R* (Tomado de Mahdy and Webster 2017).

La actividad constitutiva del H₃R es inhibida por un conjunto de compuestos, que tienen una eficacia negativa y han sido denominados agonistas inversos (Leurs et al. 2005), como el clobenpropit.

1.2.5. Clobenpropit

Clobenpropit es un derivado imidazólico (Panula et al. 2015), inicialmente descrito como un antagonista del H₃R, pero que al evidenciarse el elevado grado de actividad constitutiva de este receptor, fue clasificado como agonista inverso (Schlicker and Kathmann 2016) (Fig. 8).

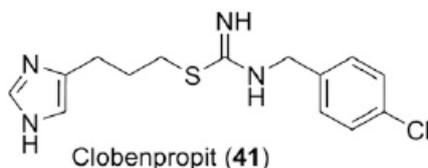


Fig. 8. Estructura molecular de clobenpropit (Tomado de Panula et al. 2015).

Los agonistas inversos, revierten la actividad constitutiva del H₃R y por lo tanto, pueden aumentar la liberación de neurotransmisor de las terminales sinápticas; mientras que los antagonistas sólo bloquean el efecto del agonista, pero no modifican la actividad constitutiva del H₃R (Schwartz 2009). La Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) indica que en humanos clobenpropit actúa como un antagonista/agonista inverso del H₃R (pK_i 8.4-9.4), como un agonista parcial del H₄R (pK_i 7.4-8.3) y como un antagonista del H₁R y H₂R (pK_i 5.6 y 5.2, respectivamente), mientras que en rata y ratón, el clobenpropit actúa únicamente como antagonista/agonista inverso del H₃R (pK_i 8.9-9.8, rata; pK_i 9.5, ratón) y como agonista parcial del H₄R (pK_i 7.2, rata; pK_i 7.8, ratón) (Southan et al. 2016). Por otro lado, evidencia experimental señala que en ratones el clobenpropit es capaz de incrementar la liberación de histamina en el hipotálamo (Ishizuka et al. 2008) y la tasa de recambio de NA en mesencéfalo (Miyazakia et al. 1997). Otros autores sugieren que la mayor liberación de histamina, secundaria a la administración de clobenpropit, es la responsable del efecto tipo antidepresivo (Femenía et al. 2015) y del efecto pro cognitivo (Y. Huang et al. 2004), presentados por este compuesto. En esos trabajos, el clobenpropit fue capaz de revertir la actividad constitutiva de H₃R y por ello es considerado un agonista inverso; las dosis a las cuales clobenpropit funcionó como un agonista inverso, estuvieron entre los 5 – 20 mg/kg administrado vía i.p o vía s.c, y entre los 5 – 10 µg administrado vía intra hipocampal.

1.3. Depresión

La depresión es el más común de los trastornos afectivos, es un trastorno complejo y heterogéneo caracterizado por un estado de ánimo deprimido, anhedonia, disminución de la energía, sentimientos de culpa, baja autoestima, trastornos del sueño, falta de concentración, alteraciones del apetito y del peso corporal (American Psychiatric Association 2013). En 2012 se estimó que afectaba a cerca de 350 millones de personas en todo el mundo (Marcus et al. 2012). A menudo la depresión inicia en etapas tempranas de la vida, durante la pubertad y la adolescencia (Paus, Keshavan, and Giedd 2008) y tiende a ser un trastorno crónico, recurrente y con grandes repercusiones dentro del entorno familiar, social, económico y laboral de las personas que la padecen (Thapar et al. 2012). Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS), la considera como la principal causa de discapacidad a nivel mundial en términos de años perdidos.

1.3.1. Depresión en la adolescencia

La adolescencia es la etapa de transición entre la niñez y la vida adulta, está caracterizada por grandes cambios hormonales, somáticos y un continuo proceso de neurodesarrollo (Kloet, Joëls, and Holsboer 2005; Lupien et al. 2009) que conducen al completo desarrollo del individuo. Los términos pubertad y adolescencia, son utilizados a menudo de forma indiscriminada, sin embargo, la pubertad se refiere a la etapa en la que ocurre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y culmina con la maduración gonadal, mientras que la adolescencia se refiere a un periodo más amplio en el que tiene lugar la maduración del comportamiento social y cognitivo característico del adulto (Sisk and Foster 2004). Después del nacimiento, la adolescencia representa el periodo más importante de neurodesarrollo, cuyos procesos se traslapan e interactúan con los procesos de desarrollo puberal (M. Schneider 2013). Por lo tanto, la adolescencia es considerada una ventana de vulnerabilidad psicológica y fisiológica. Durante esta etapa de gran neuroplasticidad, la exposición a factores de riesgo como el estrés, favorecen el desarrollo de psicopatologías como depresión, ansiedad, trastorno bipolar y el desarrollo de adicciones (Andersen 2003; Holder and Blaustein 2014; McCormick and Green 2013).

La prevalencia mundial de la depresión en la población adolescente es de 4 a 8% (Birmaher and Brent 2007; Richardson and Katzenellenbogen 2005), alcanzando prevalencias de 15 a 20% durante la adolescencia tardía (Costello, Erkanli, and Angold 2006; Cullen et al. 2009; Thapar et al. 2012). Clínicamente, en los adolescentes la irritabilidad puede presentarse como un síntoma central de la depresión en lugar de un estado de ánimo deprimido; el aislamiento social, la labilidad emocional y la baja tolerancia a la frustración, también son características comunes (McCormick and Green 2013; Thapar et al. 2012). En los adolescentes, la depresión es considerada el principal factor de riesgo para el suicidio, que es la tercera causa de muerte entre las personas de 10 a 24 años. La depresión en la adolescencia se asocia con una mayor severidad de los síntomas, deterioro en el desempeño académico, predice una serie de trastornos mentales como ansiedad, abuso de sustancias, trastorno bipolar y comportamiento suicida, así como con complicaciones en el funcionamiento social, con un mayor índice de problemas legales, embarazos a temprana edad, desempleo y menores tasas de matrimonio (Cullen et al. 2009; Lewinsohn et al. 2000).

La depresión tiende a ser un trastorno crónico y recurrente; entre el 50 y 75% de los pacientes con un primer episodio depresivo presentan recaídas en un lapso no mayor de cinco años (Cullen et al. 2009; Richardson and Katzenellenbogen 2005). Respecto a las opciones terapéuticas actualmente disponibles para tratar la depresión en adolescentes, se ha demostrado que los antidepresivos tricíclicos no son útiles en su tratamiento (Heathcote, Robertson, and Henry 1995); sólo algunos inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) como fluoxetina y escitalopram, han mostrado ser moderadamente eficaces en el tratamiento de adolescentes con depresión (Thapar et al. 2012). La evidencia actualmente disponible respecto a la efectividad de los tratamientos antidepresivos, se basa en estudios de corto plazo y no existen datos clínicos de largo plazo que apoyen un tratamiento estandarizado para adolescentes (Thapar et al. 2012). Algunos estudios reportan que hasta la mitad de los pacientes con depresión no responden adecuadamente al tratamiento farmacológico (Duman 2014; Ferrari and Villa 2016; Jeon and Kim 2016; McClintock et al. 2011; Ménard, Hodes, and Russo 2016). Por ello, la mayor severidad de la depresión en adolescentes, su elevada asociación con el suicidio, su tendencia a la cronicidad y recurrencia, así como la falta de respuesta

a los tratamientos antidepresivos actualmente disponibles hacen que la presencia de depresión durante la adolescencia se traduzca en un trastorno crónico y recurrente que, independientemente del tratamiento utilizado, se relacionará con un mal pronóstico a corto y largo plazos, así como con una amplia gama de dificultades biopsicosociales.

1.4. Neurobiología de la depresión

Actualmente se acepta que la depresión es causada por la interacción de factores genéticos, ambientales y ciertas características personales, que son capaces de alterar la bioquímica, la fisiología neuronal y el funcionamiento de áreas específicas dentro del SNC (Hernández et al. 2016). A continuación se describen dos hipótesis importantes en el desarrollo de la depresión, la hipótesis de las monoaminas y la hipótesis del estrés y el sistema neuroendocrino, que son relevantes para nuestro trabajo.

1.4.1. Hipótesis de las monoaminas

Fue la primera hipótesis formulada, y una de las más aceptadas respecto a la fisiopatología de la depresión. Surge a partir del descubrimiento de que los fármacos antidepresivos incrementan los niveles de 5-HT, NA y DA en las hendiduras sinápticas, ya sea mediante la inhibición de su recaptura o evitando su degradación enzimática. Esta hipótesis postula que la depresión se origina a partir de un desequilibrio o una deficiencia de monoaminas dentro del SNC (Fig. 9), principalmente 5-HT, NA y DA (Hernández et al. 2016; Jeon and Kim 2016; Krishnan and Nestler 2008).

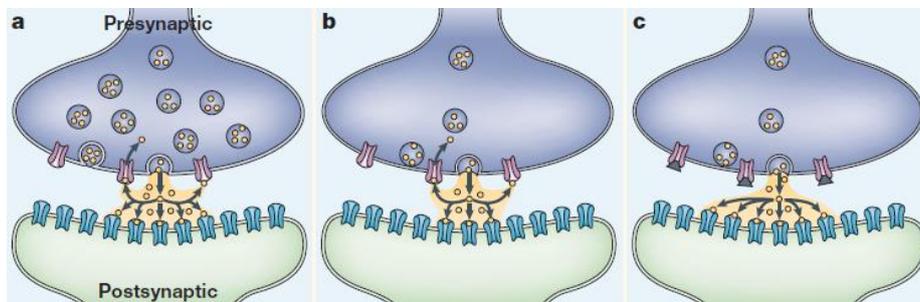


Fig. 9. Hipótesis de las monoaminas. a) En el cerebro normal, las monoaminas (círculos amarillos) son liberadas y se unen a sus receptores en la neurona postsináptica. b) En la depresión, la disminución en la concentración de monoaminas en los sitios sinápticos produce un trastorno del estado de ánimo. c) El bloqueo de los sitios de recaptura (triángulos grises), incrementa la concentración de monoaminas disponibles en la hendidura sináptica y restaura el estado de ánimo (Tomado de Castrén 2005).

Estudios en humanos y modelos animales indican que la depleción de NA y 5-HT induce conductas depresivas (Mason and Schene 2007). Se ha reportado mayor actividad de la enzima responsable de degradar a las monoaminas, la monoamino oxidasa A (MAO-A), en la corteza prefrontal (PFC), la corteza cingulada anterior y posterior, el núcleo caudado y el putamen, el tálamo, la corteza temporal anterior, el mesencéfalo, el hipocampo y el giro parahipocampal de pacientes con depresión (Meyer et al. 2006). Estudios *post mortem*, que analizaron las neuronas del LC de pacientes con depresión encontraron una menor densidad del transportador de NA (Klimek et al. 1997) y un aumento en la densidad del autorreceptor presináptico α_2 (Ordway et al. 2003). Estudios de neuroimagen han reportado una menor densidad de receptores postsinápticos 5-HT_{1A} en el DRN, PFC e hipocampo de pacientes con depresión (Bhagwagar et al. 2004). El polimorfismo G1463A en el gen de la triptófano hidroxilasa (hTPH2), enzima limitante para la síntesis neuronal de serotonina y el polimorfismo C(-1019)G en el promotor del gen del autorreceptor presináptico 5-HT_{1A}, acoplado a proteínas G_{i/o}, que inhibe la liberación de serotonina dentro del SNC. En pacientes con depresión estos dos polimorfismos, inducen un déficit serotoninérgico por una reducción de hasta el 80% en la función enzimática (Zhang et al. 2005), así como una menor liberación de serotonina debido a la mayor densidad de autorreceptores 5-HT_{1A} en las neuronas serotoninérgicas del DRN (Lemondé et al. 2003). Recientemente se ha propuesto que el circuito mesolímbico dopaminérgico, formado por neuronas dopaminérgicas que proyectan del área tegmental ventral (ATV) al núcleo accumbens (NAc), podría estar implicado en la fisiopatología, sintomatología e incluso en la etiología de la depresión (Nestler and Carlezon 2005). La elevada comorbilidad de síntomas depresivos en personas con enfermedad de Parkinson (Santiago et al. 2014, 2015), apoya esta última propuesta. Todas estas evidencias resaltan la importancia de las monoaminas, en el desarrollo y probablemente en el mantenimiento de la depresión.

A pesar de que el tratamiento con antidepresivos incrementa los niveles de monoaminas en la hendidura sináptica de forma inmediata, la mejoría clínica sólo es evidente después de 2 a 4 semanas de iniciado el tratamiento. Además, una proporción de los pacientes con depresión no responde adecuadamente a los fármacos que aumentan la transmisión monoaminérgica. Debido a esto, se ha postulado que además de la alteración en los niveles de monoaminas, existen otros

cambios dentro del SNC que interactúan con la deficiencia de monoaminas para favorecer el inicio y/o la persistencia de la enfermedad. Esto ha dado origen a otras hipótesis, tal es el caso de la hipótesis del estrés y el sistema neuroendócrino.

1.4.2. Hipótesis del estrés y el sistema neuroendócrino

El estrés puede ser definido como cualquier desafío a la homeostasis de un organismo, que requiere una respuesta de adaptación del propio organismo. Un estresor es un cambio en el ambiente que es censado por un organismo, capaz de provocar una respuesta que puede ser aguda o crónica. Esta respuesta se integra por un complejo patrón de componentes fisiológicos, conductuales, cognitivos y emocionales, que tienen como objetivo restaurar la homeostasis del organismo (Steckler 2005).

El componente anatómico del sistema de respuesta al estrés está conformado por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), cuya activación en respuesta a un estresor tiene como resultado final la síntesis y liberación de glucocorticoides a partir de las glándulas adrenales (Fig. 10).

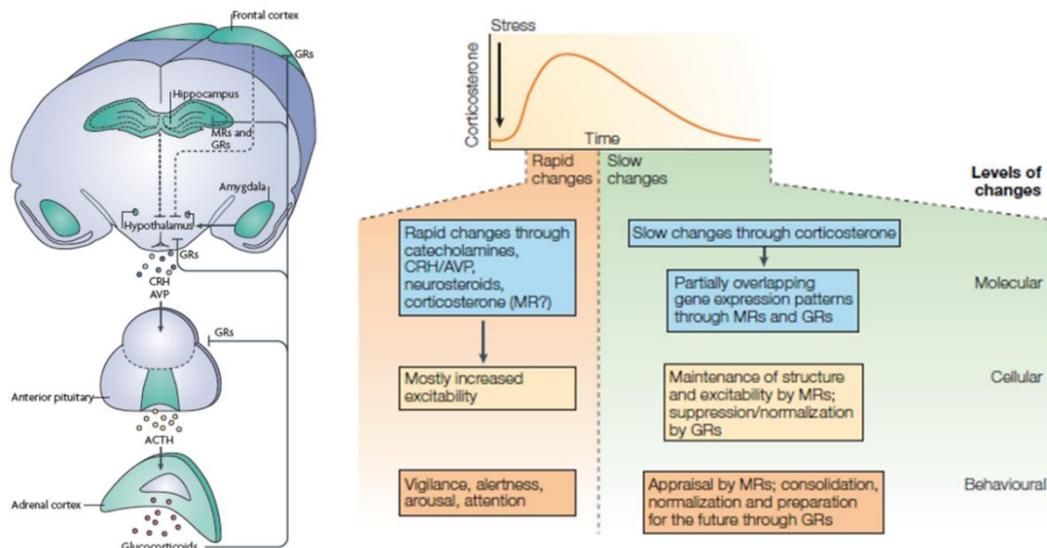


Fig. 10. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y curso temporal de los cambios (a nivel molecular, celular y en el comportamiento) en respuesta a las hormonas del estrés (Tomado de Lupien et al. 2009 y Kloet, Joëls y Holsboer 2005).

El objetivo de los glucocorticoides liberados es promover la adaptación homeostática del organismo al estrés (Ferrari and Villa 2016; Páez-Pereda and Stalla 2005). Un estresor, dependiendo de su intensidad y duración, iniciará o no

una respuesta al estrés con la subsecuente liberación de hormonas y mediadores celulares. Estos mediadores pueden promover la adaptación, cuando la respuesta de estrés se activa y desactiva de manera eficiente, pero también pueden promover procesos fisiopatológicos, cuando la respuesta no se activa y desactiva de manera eficiente o cuando es activada en exceso (Ferrari and Villa 2016), por lo que un adecuado funcionamiento de este sistema es esencial para la supervivencia de un organismo (Fig. 10).

De los pacientes con depresión alrededor del 50% tiene una activación excesiva del eje HHA (Jeon and Kim 2016), además presentan elevados niveles de cortisol en saliva, plasma y orina, altos niveles de hormona liberadora de corticotropina (CRH) en líquido cefalorraquídeo, así como como un mayor tamaño y funcionalidad aumentada de la hipófisis y las glándulas adrenales (Ferrari and Villa 2016). También se ha reportado un menor volumen del hipocampo en estos pacientes (Bremner et al. 2000), que se asocia directamente con la duración de la depresión e inversamente con el tiempo de tratamiento (Duman 2014). Estudios en animales reportan que diferentes tipos de estrés crónico disminuyen la neurogénesis hipocampal (Samuels and Hen 2011) e inducen atrofia en las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo y en las capas II,III y V de la PFC, estructuras implicadas en la regulación inhibitoria del eje HHA y la amígdala, respectivamente (McEwen 2011). Un hecho importante es que los antidepresivos revierten estos efectos (Duman 2014; Jeon and Kim 2016). En las neuronas piramidales del hipocampo se ha observado que la hipercortisolemia induce atrofia dendrítica (reducción del número de espinas), favorece la apoptosis y disminuye la neurogénesis (Jeon and Kim 2016). El eje HHA es uno de los sistemas que continúa su desarrollo y maduración durante la adolescencia (McCormick and Mathews 2007; Walker, Sabuwalla, and Huot 2004). Los adolescentes presentan una mayor reactividad al estrés, caracterizada por una mayor liberación de glucocorticoides y niveles plasmáticos persistentemente elevados en respuesta a una situación de estrés (Rao et al. 2008). Estudios funcionales de neuroimagen en adolescentes con depresión, reportan que estructuras como el tálamo y la amígdala presentan una mayor actividad, mientras que la PFC y el hipocampo presentan el efecto contrario (Ferrari and Villa 2016).

Otro circuito que continúa su desarrollo durante la adolescencia y es susceptible a los efectos del estrés, es el circuito amígdala – corteza prefrontal (Jalbrzikowski et al. 2017; Tottenham and Galván 2016). Estas áreas reciben proyecciones de los núcleos tuberomamilares y se ha reportado la presencia de receptores de histamina en ellas (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015). Estas áreas también forman parte del sistema límbico y están implicadas en la neurobiología de la depresión y de la respuesta al estrés (Price and Drevets 2012). La variabilidad en el circuito amígdala-PFC (mayor volumen de la amígdala y adelgazamiento de la PFC) se asocia con un funcionamiento pobre de los dominios afectivos y sociales, lo que constituye un riesgo para el desarrollo de depresión (Holmes et al. 2013). La amígdala y la PFC son susceptibles a los efectos del estrés crónico, por lo que el desarrollo anómalo de las conexiones funcionales y estructurales entre la amígdala y la PFC puede contribuir a la aparición de síntomas depresivos y de ansiedad, y quizá tengan un rol importante en la aparición de los trastornos psiquiátricos durante la adolescencia (Jalbrzikowski et al. 2017). La exposición a estrés durante la infancia y adolescencia está asociada con alteraciones en el desarrollo de las conexiones entre la amígdala y la PFC (Tottenham and Galván 2016). En adultos jóvenes, sin historial de enfermedad psiquiátrica, se encontró que una mayor experiencia de afecto negativo estaba asociada con un incremento en el volumen de la amígdala y una reducción en el grosor de la PFC medial (mPFC). En los casos más extremos se presentó una relación inversa entre el volumen de la amígdala y el grosor de la mPFC (Holmes et al. 2013). En adolescentes con depresión, ante un estímulo emocional se presenta una hiperreactividad de la amígdala (Connolly et al. 2017; Ferrari and Villa 2016; Tottenham and Galván 2016); de hecho uno de los hallazgos más constantes, secundario a la exposición a estrés en la vida temprana, es la hiperreactividad de la amígdala en respuesta a un estímulo emocional durante la adolescencia (Tottenham and Galván 2016). Se ha propuesto que esta hiperreactividad inducida por el estrés puede favorecer el desarrollo de conexiones atípicas entre la amígdala y la PFC (Tottenham and Galván 2016), ya que en adolescentes con antecedentes de exposición a estrés en la vida temprana, se presentan conexiones funcionales débiles entre estas dos estructuras (Burghy et al. 2012; Tottenham and Galván 2016). De hecho, la normalización de la hiperreactividad de la amígdala se asocia con el tratamiento exitoso de la depresión en adolescentes, tanto farmacológico como psicoterapéutico (Connolly et al. 2017).

Por lo tanto, la hipótesis del estrés y el sistema neuroendócrino propone que el estrés crónico, en etapas tempranas de la vida, induce cambios en la reactividad del eje HHA que favorecen una activación excesiva del mismo, con el consecuente aumento en la síntesis y liberación de glucocorticoides. Estos glucocorticoides inducen atrofia en estructuras como la PFC y el hipocampo que están implicadas en la retroalimentación inhibitoria del eje HHA. La pérdida del control inhibitorio sobre el eje HHA, favorece el desarrollo de una respuesta inadecuada al estrés, generando un círculo vicioso en el que la activación excesiva o la inactivación deficiente de la respuesta al estrés, podría favorecer el inicio y/o la perpetuación de la enfermedad depresiva (Andersen 2003; Duman 2014; Ferrari and Villa 2016; Kloet, Joëls, and Holsboer 2005; Lupien et al. 2009; McCormick and Green 2013; McEwen 2011; Walker, Sabuwalla, and Huot 2004). Con base en estos datos, se ha propuesto que algunos trastornos psiquiátricos, como la depresión, pueden ser el resultado de una desviación de la trayectoria típica del neurodesarrollo durante la adolescencia (Connolly et al. 2017; Jalbrzikowski et al. 2017).

Como ya se mencionó en la hipótesis de las monoaminas, es probable que el estrés *per sé*, no sea suficiente para inducir depresión, pero la gran cantidad de evidencias clínicas y experimentales lo proponen como un factor importante durante la adolescencia en la patogénesis de la enfermedad (Duman 2014; Ferrari and Villa 2016; Hammels et al. 2015).

1.5. Histamina, Estrés y Depresión

La liberación de histamina en el SNC es un indicador de estrés (Ito et al. 1999). Tanto el estrés crónico por restricción como el estrés metabólico son capaces de activar a las neuronas histaminérgicas de los NTM (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). La histamina produce el incremento de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), β endorfina y arginina-vasopresina (AVP) en la hipófisis en respuesta al estrés (Kjaer et al. 1992) y favorece la activación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). La inyección de histamina en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo favorece la liberación de factor liberador de corticotropina (CRH) y la subsecuente activación del eje HHA. Las neuronas histaminérgicas en los NTM responden a algunas de las señales neuroendócrinas implicadas con la depresión,

tales como las monoaminas, péptidos y hormonas esteroideas (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). Por ejemplo, la NA activa receptores α_2 de las interneuronas GABAérgicas de los NTM, disminuyendo la inhibición sobre las neuronas histaminérgicas, lo que favorece su activación (Stevens et al. 2004). La serotonina activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ de las neuronas histaminérgicas de los NTM, favoreciendo la liberación de histamina (Eriksson et al. 2001; Eriksson, Stevens, and Haas 2001). Un estudio de neuroimagen realizado en humanos con depresión, reportó una menor densidad del H_1R en la PFC y el giro cingulado en comparación con pacientes sanos, que se asoció directamente con la severidad de la enfermedad (Kano et al. 2004). Por último, se sabe que la privación de sueño ejerce un efecto antidepresivo rápido, aunque transitorio (Vogel, Buffenstein, and Minter 1990); poco se sabe sobre el mecanismo fisiológico implicado, pero debido a que la histamina regula el estado de vigilia, se cree que pudiera estar implicada en este efecto terapéutico (H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008). Algunos trabajos han evaluado el potencial terapéutico de compuestos con acción sobre los H_3R 's, principalmente antagonistas/agonistas inversos en los modelos animales de depresión, de nado forzado y suspensión de la cola, que implican un estrés agudo.

Tabla 3. Evidencias sobre el efecto tipo antidepresivo de algunos compuestos con actividad sobre los H_3R 's

AUTOR Y AÑO	ANIMALES Y MODELO	RESULTADOS
(Lamberti et al. 1998)	Ratones ♂ SW, (22-28 g). Modelo de nado forzado.	Tioperamida (antagonista del H_3R) y L-histidina (precursor de histamina), presentaron un efecto tipo antidepresivo.
(Pérez-García et al. 1999)	Ratones ♂ OG1, (25-30 g). Modelo de nado forzado.	Tioperamida y clobenpropit (agonista inverso del H_3R), presentaron un efecto tipo antidepresivo. $\text{R}\alpha\text{MH}$ no modificó el tiempo de inmovilidad.
(Akhtar, Pillai, and Vohora 2005)	Ratones ♂ y ♀ SW, (25-35 g). Modelo de nado forzado.	Tioperamida presentó un efecto tipo antidepresivo. Incremento en la conducta de nado. $\text{R}\alpha\text{MH}$ no modifico las conductas
(Gao et al. 2013)	Ratas. Modelo de nado forzado.	3,5-dimetil-isoxazol-4-acido carboxílico [2-metil-4-((2S,3'S)-2-metil-[1,3']bipirrolidinil-1'-yl)fenil]amida (agonista inverso del H_3R), presentó un efecto tipo antidepresivo.
(Bahi, Schwed, and Walter 2014)	Ratones ♂ C57BL/6, 14 semanas (24-30 g). Modelo de nado forzado. Prueba de suspensión de la cola.	ST-1283 (antagonista H_3R) presentó un efecto tipo antidepresivo.
(Femenía et al. 2015)	Ratas ♂ FSL, (280-400 g). Modelo de nado forzado.	Clobenpropit presentó un efecto tipo antidepresivo.

Al revisar estos trabajos, es notorio que los compuestos que interfieren con la actividad constitutiva de los H₃R's tienen un efecto tipo antidepressivo en el modelo de nado forzado y en el de suspensión de la cola, en animales adultos. Únicamente el estudio realizado por Akhtar (Akhtar, Pillai, and Vohora 2005), reportó que este efecto estuvo acompañado de un incremento en la conducta de nado, proponiendo la posible participación del sistema serotoninérgico en la mediación del efecto tipo antidepressivo presentado por tioperamida. El resto de los estudios sólo documenta una disminución de la conducta de inmovilidad. Además en los trabajos de Akhtar y de Pérez – García, la administración del agonista del H₃R (R- α -metilhistamina) careció de efecto en el modelo de nado forzado (Akhtar, Pillai, and Vohora 2005; Pérez-García et al. 1999). A pesar de estas evidencias, actualmente no es claro el mecanismo por el cual los agonistas inversos del H₃R ejercen su efecto tipo antidepressivo,

Como describimos anteriormente, el H₃R funciona como un heterorreceptor presináptico, por lo que planteamos la posibilidad de que la histamina, además de regular su propia liberación a través de autorreceptores H₃, podría también modular la liberación de otros neurotransmisores, como 5-HT, NA y DA, a través de heterorreceptores H₃ localizados en las terminales de estas neuronas (Aquino-Miranda and Arias-Montaña 2012; Esbenshade et al. 2008; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015; Panula and Nuutinen 2013; Schlicker and Kathmann 2016). Estos mecanismos podrían ser responsables y/o contribuir en alguna medida al efecto tipo antidepressivo de los antagonistas/agonistas inversos del H₃R. Entender estos mecanismos abriría la puerta para el desarrollo de nuevos compuestos y el descubrimiento de blancos terapéuticos útiles en el tratamiento de la depresión. Además, no existen evidencias del efecto tipo antidepressivo de agonistas inversos del H₃R en animales adolescentes, ni datos de su efecto en modelos animales de depresión basados en la exposición crónica al estrés.

1.6. Modelos animales de depresión

Los modelos animales son herramientas utilizadas en la investigación para el estudio de algunas enfermedades y para el desarrollo y la selección de nuevos fármacos útiles en su tratamiento (Czéh et al. 2016). Respecto a la depresión, podemos decir que es complicado el desarrollo de modelos que reproduzcan de

manera adecuada los síntomas presentes en pacientes con este trastorno. La depresión, al igual que otros trastornos psiquiátricos, se conforma de endofenotipos que pueden ser reproducidos independientemente y evaluados en modelos animales (Hasler et al. 2004). Se han descrito los siguientes endofenotipos en animales: anhedonia, desesperanza, aislamiento social, cambios en el apetito y alteraciones en el peso corporal, cambios neuroanatómicos, alteraciones neuroendócrinas, alteraciones del sueño y comportamiento tipo ansiedad (Czéh et al. 2016; Hammels et al. 2015; Hasler et al. 2004; Porsolt et al. 1978). Es importante mencionar que los modelos animales de depresión deben cumplir tanto como sea posible, los criterios de validez de apariencia, validez de constructo y validez predictiva (Czéh et al. 2016; Golden et al. 2011; Willner and Mitchell 2002). Actualmente existen modelos animales que pueden simular algunos de los endofenotipos descritos para la depresión. A continuación se describen dos modelos importantes para nuestro trabajo.

1.6.1. Modelo de nado forzado

El modelo de nado forzado fue descrito por Porsolt (Porsolt et al. 1978) como un modelo en roedores para predecir la eficacia clínica de los fármacos antidepresivos (Cryan, Valentino, and Lucki 2005). En este modelo, los roedores son forzados a nadar durante un tiempo determinado, en espacios restringidos de los que no hay salida. Después de un periodo inicial de actividad vigorosa, terminan por adoptar una postura característica de inmovilidad (Porsolt et al. 2001). De manera hipotética, se piensa que cuando los animales adoptan la postura de inmovilidad han aprendido que es imposible escapar y han desarrollado una conducta tipo desesperanza (endofenotipo). El comportamiento y las características bioquímicas de los animales en este estado, inducido por la prueba, ha llevado a creer que esta condición *per se* proporciona un modelo animal de depresión. La postura de inmovilidad se caracteriza por que el animal flota en el agua, realizando únicamente los movimientos necesarios para mantener la nariz por encima de la superficie (Bogdanova et al. 2013). Posteriormente el trabajo de Detke (Detke and Lucki 1996), propuso la evaluación de los comportamientos activos durante la prueba de nado forzado, midiendo las conductas de nado y de escalamiento. Además, demostró que el análisis de estas conductas activas permite diferenciar entre las dos principales clases de antidepresivos, ya que los ISRS incrementan la conducta de

nado, mientras que los inhibidores de la recaptura de NA y/o DA incrementan la conducta de escalamiento (Bogdanova et al. 2013; Cryan, Valentino, and Lucki 2005; Detke and Lucki 1996).

1.6.2. Modelo de estrés crónico por derrota social

El estrés crónico es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos psiquiátricos, como depresión, ansiedad y trastorno de estrés postraumático (Berton et al. 2006; Gilbert et al. 2009; Hammels et al. 2015; Lupien et al. 2009; Qiao et al. 2016; Shu and Xu 2017). El modelo de estrés crónico por derrota social (ECDS) utiliza el conflicto social que se da de manera natural entre individuos de la misma especie para generar estrés (Hollis and Kabbaj 2014) y hace uso del comportamiento natural y predecible de los roedores macho para defender su territorio (Goyens and Notrot 1975). La derrota social puede ser definida como el sometimiento de un individuo durante un enfrentamiento con otro de la misma especie (Hammels et al. 2015; Hollis and Kabbaj 2014), teniendo como resultado un individuo sometido y un individuo vencedor. El modelo de ECDS consiste en colocar a un roedor, dentro del territorio de otro roedor normalmente de mayor tamaño y edad. Permitiendo una primera fase de contacto físico durante un corto periodo de tiempo (minutos), seguida de una fase de contacto sensorial (auditivo, olfatorio y visual) durante un periodo de tiempo más prolongado (horas), este proceso se repite diariamente durante 10 a 15 días (Golden et al. 2011; Hammels et al. 2015; Hollis and Kabbaj 2014; Iñiguez et al. 2014). Los animales sometidos al modelo de ECDS, desarrollan alteraciones conductuales como el aislamiento social, la anhedonia y la desesperanza; alteraciones fisiológicas, como una mayor reactividad del eje HHA en respuesta al estrés y una menor ganancia de peso, y alteraciones neuroquímicas, como cambios en la concentración tisular de 5-HT y NA, que son similares a las alteraciones observadas en humanos con depresión (Hammels et al. 2015; Hollis and Kabbaj 2014; Ménard, Hodes, and Russo 2016). Otra característica de este modelo, y que contribuye a su validez predictiva, es que únicamente los tratamientos crónicos (28 días) con antidepresivos revierten los cambios conductuales presentados por los roedores sometidos a la derrota social (Berton et al. 2006; Golden et al. 2011; Ménard, Hodes, and Russo 2016).

El modelo de ECDS, al igual que el modelo de nado forzado, tiene validez de apariencia, validez de constructo y validez predictiva (Detke and Lucki 1996; Golden et al. 2011; Hollis and Kabbaj 2014; Jianhua et al. 2017; Krishnan et al. 2007; Porsolt et al. 2001). Existe un consenso general de que el modelo de ECDS produce un perfil de comportamientos tipo depresión (Hammels et al. 2015; Jianhua et al. 2017; Krishnan et al. 2007; Zhao et al. 2013), por lo que actualmente es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la depresión. Además, es una herramienta valiosa de investigación, con el potencial de identificar nuevas vías para la terapéutica de los trastornos psicopatológicos asociados eventos o experiencias estresantes en la vida (Hollis and Kabbaj 2014; Qiao et al. 2016).

1.7. Justificación

El desarrollo de fármacos más eficaces para el tratamiento de la depresión en la adolescencia es de vital importancia, ya que la ausencia de los mismos contribuye en gran medida al mal pronóstico de este padecimiento. Las acciones de la histamina dentro del SNC, a través de los H₃R's, representan una alternativa para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de trastornos psiquiátricos. Por lo tanto, es necesario el entendimiento de los mecanismos a través de los cuales los agonistas inversos del H₃R ejercen un efecto tipo antidepresivo.

1.8. Hipótesis

El agonista inverso del H₃R (clobenpropit) tendrá un efecto antidepresivo en ratones adolescentes macho de la cepa Swiss Webster (SW) en el modelo de nado forzado. Además, los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico participarán en la mediación de dicho efecto antidepresivo.

El agonista inverso del H₃R (clobenpropit) tendrá un efecto antidepresivo en ratones adolescentes macho de la cepa SW en el modelo de estrés crónico por derrota social.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antidepresivo del agonista inverso del H₃R en dos modelos animales de depresión en ratones adolescentes y estudiar la participación de los

sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en la mediación de dicho efecto.

2.2. Objetivos particulares

1. Comparar la conducta tipo depresión en ratones adolescentes macho de la cepa SW, durante las etapas pre puberal, puberal y pos puberal, en el modelo de nado forzado.
2. Analizar el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R en ratones adolescentes macho de la cepa SW, en el modelo de nado forzado y determinar sus efectos sobre las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la PFC y amígdala.
3. Determinar la participación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R, por medio del uso de neurotoxinas.
4. Montar el modelo de estrés crónico por derrota social en ratones adolescentes machos de la cepa SW.
5. Analizar los posibles efectos antidepresivos del agonista inverso del H₃R en el modelo de ECDS.

3. Materiales y métodos

3.1. Animales

Se utilizaron ratones adolescentes macho de la cepa SW (CINVESTAV Sede sur). Los animales fueron habituados y alojados en grupo (5 por caja) durante 3 días, hasta el día de inicio del protocolo o hasta la realización de las pruebas conductuales, en condiciones luz/oscuridad 12:12, en ciclo invertido, con agua y comida *ad libitum*.

3.2. Fármacos

Clobenpropit, N-(2-cloroetil)-N-etil-2-clorhidrato de bromobencilamina (DSP4) y desipramina fueron disueltos en solución salina al 0.9%; sertralina fue disuelta en dimetil sulfóxido al 10% y agua destilada; 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) fueron disueltos en ácido ascórbico al 0.1% y solución salina. Clobenpropit, DSP4, desipramina y sertralina se administraron por vía intraperitoneal (i.p), mientras que 5,7-DHT y 6-OHDA se administraron por vía

intracerebroventricular (i.c.v), en un volumen de 4 μ l. Todos los fármacos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Toluca, México).

3.2.1. Administración intracerebroventricular

La administración i.c.v de 5,7-DHT y 6-OHDA se realizó conforme a lo descrito por Haley y McCormick (Haley and McCormick 1957) (Fig. 11). A continuación se describe brevemente que los animales fueron sujetados firmemente por la piel libre detrás de la cabeza. Se apoyó al animal sobre una superficie de la cual pudiera sujetarse, con la suficiente firmeza para impedir que realizara movimientos bruscos, pero permitiéndole respirar adecuadamente. Se utilizó una aguja hipodérmica de calibre 27 y 3 mm de longitud, que fue insertada perpendicularmente a través del cráneo en el cerebro. El sitio de inyección fue a 2 mm a un lado de la línea media sobre una línea trazada a través de la base anterior de las orejas. Al término de la administración, los ratones fueron sacrificados por decapitación sin anestesia, se extrajeron los cerebros y posteriormente se verificó el sitio de administración (ventrículos laterales).

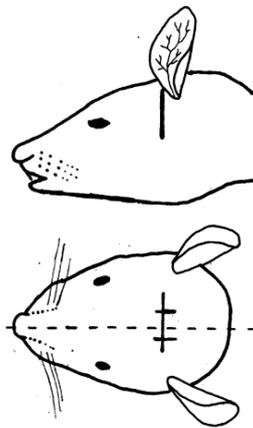


Fig. 11. Referencias externas para localizar el sitio de la inyección i.c.v (Tomado de Halley y McCormick 1957).

3.2.2. Uso de las neurotoxinas DSP4, 5,7-DHT y 6-OHDA, para dañar los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, respectivamente.

Para destruir a la neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas o dopaminérgicas en el SNC de los ratones, utilizamos las neurotoxinas 5,7-DHT (75 μ g por ratón vía i.c.v), DSP4 (50 mg/kg vía i.p) y 6-OHDA (30 μ g por ratón vía i.c.v),

respectivamente (Ross and Stenfors 2014; Santiago et al. 2014; Sinhababu and Borchardt 1988; Vega-Rivera, López-Rubalcava, and Estrada-Camarena 2013) (Fig. 12).

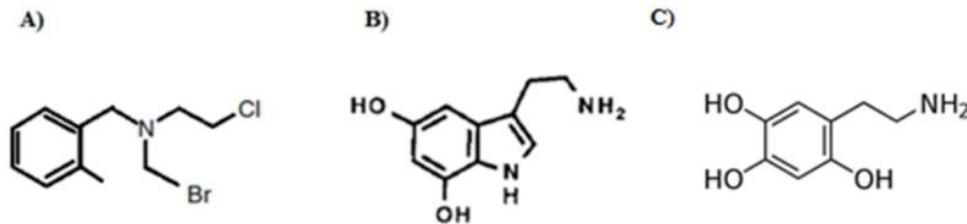


Fig. 12. Estructura química de las neurotoxinas. A) DSP4, B) 5,7-DHT y C) 6-OHDA.

La neurotoxina 5,7-DHT es parcialmente selectiva para el sistema serotoninérgico dentro del SNC, DSP4 es también una neurotoxina parcialmente selectiva para las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* (Fritschy and Grzanna 1991; Ross and Stenfors 2014; Sinhababu and Borchardt 1988), mientras que 6-OHDA se utiliza para dañar neuronas dopaminérgicas (Santiago et al. 2014; Xue and Bian 2015), aunque puede afectar en cierto grado a los tres sistemas. Las tres neurotoxinas son herramientas útiles para el estudio del papel funcional de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico dentro del SNC. Estas neurotoxinas utilizan a los transportadores neurales de monoaminas para acceder a las neuronas; pero a pesar de su afinidad por uno u otro sistema, su administración puede afectar a más de uno de los sistemas monoaminérgicos (Ross and Stenfors 2014; Sinhababu and Borchardt 1988). Con base en lo descrito en la literatura, las neurotoxinas se administraron en una sola dosis, una semana antes del uso de los animales. Además, con el objetivo de evitar el daño a los otros sistemas de neurotransmisión al administrar cada una de las neurotoxinas, los otros sistemas fueron protegidos utilizando inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, o inhibidores de la recaptura de noradrenalina, o de ambos (para mayor detalle, véase más adelante en 3.6 Diseño experimental).

3.3. Modelos animales de depresión

Los siguientes modelos fueron utilizados para inducir la conducta tipo depresión en los ratones adolescentes macho de la cepa SW.

3.3.1. Modelo de nado forzado

El modelo de nado forzado, es comúnmente usado para el cernimiento de fármacos antidepresivos y para el estudio de las bases neurobiológicas de la depresión (Cryan, Valentino, and Lucki 2005; López-Rubalcava, Estrada-Camarena, and Fernández-Guasti 2003). En este modelo los ratones son forzados a nadar, hasta que eventualmente adoptan una postura de flotación, descrita como un conducta de inmovilidad, que es considerada un indicador de desesperanza conductual (Porsolt et al. 1978). Los fármacos con actividad antidepresiva disminuyen la conducta de inmovilidad o retrasan su inicio; además incrementan las conductas activas durante la prueba (Cryan, Valentino, and Lucki 2005). Estas conductas son la conducta de nado y la conducta de escalamiento (Detke and Lucki 1996). En este modelo los ratones se colocan durante un periodo de 6 minutos, dentro de cilindros de cristal, de 13 cm diámetro y 24 cm de altura, que contienen agua a 22° C a una profundidad de 10 cm (Fig. 13).

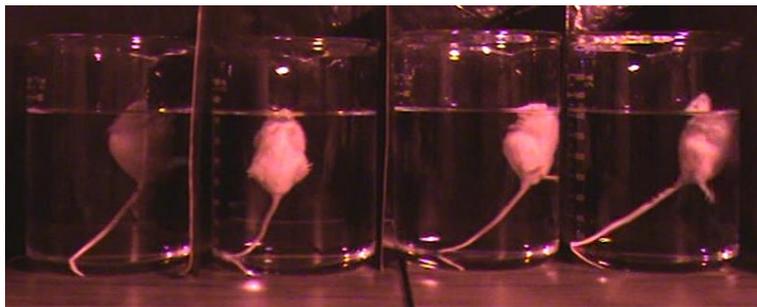


Fig. 13. Modelo de nado forzado.

La prueba es videograbada para posteriormente cuantificar las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, utilizando una técnica de muestreo de tiempo, en la que al final de cada periodo de 5 segundos se registra el comportamiento que predominantemente presenta el ratón. Esto se realiza durante los últimos 4 minutos de la prueba (Cryan, Valentino, and Lucki 2005; Detke and Lucki 1996).

En la conducta de inmovilidad, el ratón únicamente flota en el agua, realizando sólo los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua; la conducta de nado se define como la presencia de movimientos activos y el desplazamiento del ratón dentro del cilindro, más de lo necesario para simplemente mantener la cabeza fuera del agua y por último, la conducta de escalamiento se caracteriza por movimientos vigorosos que realiza el ratón con las patas delanteras dentro y fuera

del agua, contra las paredes del cilindro (para un mejor detalle de las conductas visite: <https://youtu.be/Iew51ijx33U>). Al término de la prueba los ratones son retirados de los cilindros, secados con toallas de papel y colocados en cajas con calor durante 30 minutos, posteriormente son regresados a sus cajas de alojamiento.

3.3.2. Modelo de estrés crónico por derrota social

El modelo se compone de dos fases, la primera fase es de contacto físico, donde un ratón intruso es expuesto al ataque de un ratón residente agresor, durante un periodo corto de tiempo (5-10 minutos) lo que genera un estrés físico y psicológico. La segunda fase es de contacto sensorial, en la cual el ratón intruso mantiene contacto visual, auditivo y olfativo con el ratón residente que previamente lo atacó, durante un periodo largo de tiempo (24 horas) con el objetivo de generar un estrés psicológico en el intruso (Golden et al. 2011; Hammels et al. 2015). La cepa de ratón C57BL/6J es la más utilizada en el modelo de ECDS como residente y se ha reportado que esta cepa presenta una mayor susceptibilidad metabólica al estrés (Hammels et al. 2015). Por otro lado, se emplea a ratones de la cepa CD1 como agresores y ratones diana (Hollis and Kabbaj 2014). En este trabajo utilizamos únicamente ratones de la cepa SW. A continuación se describe el protocolo.

3.3.2.1. Selección de ratones agresores

- 1) Ratones SW adultos de entre 8-12 semanas de edad (probables agresores), fueron alojados individualmente durante 3 días y ratones adolescentes SW de entre 5-6 semanas de edad (ratones de prueba) fueron alojados en grupo durante 3 días. Estos últimos fueron utilizados únicamente para el proceso de selección de los ratones agresores.
- 2) El primer día de selección, se colocó al ratón adolescente dentro de la caja del ratón adulto durante 180 segundos, con el adulto presente. Se registró la latencia de ataque (periodo de tiempo que transcurre desde que el ratón adolescente es colocado en la caja, hasta que es atacado por el ratón adulto). No se sacó al ratón adolescente de la caja hasta que concluyeron los 180 segundos, cuando regresaron a sus cajas de alojamiento, en donde permanecieron hasta el siguiente día.
- 3) Se realizó una sesión diaria de 180 segundos, durante tres días consecutivos, rotando a los ratones adolescentes con la finalidad de evitar que fueran atacados

por el mismo ratón adulto de manera consecutiva. El ratón adulto nunca se cambió de caja.

- 4) Se seleccionaron como ratones agresores, a los ratones adultos que cumplieron con los siguientes criterios:
 - a. Animales que atacaron en al menos dos sesiones consecutivas.
 - b. Animales que presentaron una latencia de agresión menor a 60 segundos.
- 5) Los agresores adultos seleccionados, se alojaron individualmente hasta el inicio de la derrota social. Estos agresores pueden ser utilizados hasta por tres meses posteriores a su selección.

3.3.2.2. Protocolo de estrés crónico por derrota social

- 1) Armar y preparar la caja hogar con la división de acrílico perforada, utilizada para el ECDS (24 horas antes de iniciar el protocolo) y colocar al ratón agresor previamente seleccionado (residente), en el compartimiento derecho de la caja, durante toda la noche previa al inicio del protocolo (Fig. 14).

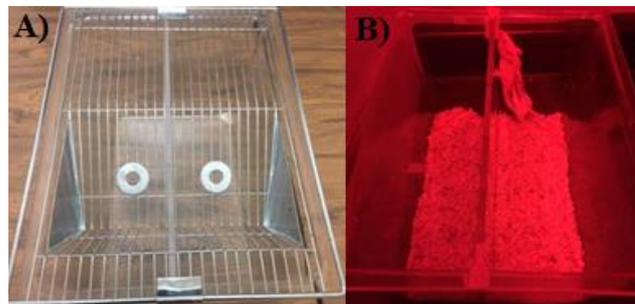


Fig. 14. Caja hogar para el modelo de ECDS. A) Caja hogar con división de acrílico y tapa de acero con doble bebedero para el protocolo de derrota social. B) El agresor es colocado en una de los dos compartimentos dentro de la caja.

- 2) Como sujetos de estudio (intrusos) se utilizaron ratones macho adolescentes de 28 días de edad de la cepa SW, alojados en grupo durante 3 días, previo al inicio del protocolo de ECDS.
- 3) El primer día, se colocó al ratón adolescente (intruso) en la caja hogar, directamente dentro del compartimento del ratón agresor (residente), se dejó ahí durante 5-10 minutos, tiempo en el que el adolescente fue investigado, atacado y derrotado por el agresor (fase de contacto físico). Transcurrido este tiempo el

adolescente se transfirió al compartimiento contiguo a la división de acrílico, en donde permaneció durante 24 hrs (fase de contacto sensorial) (Fig. 15).

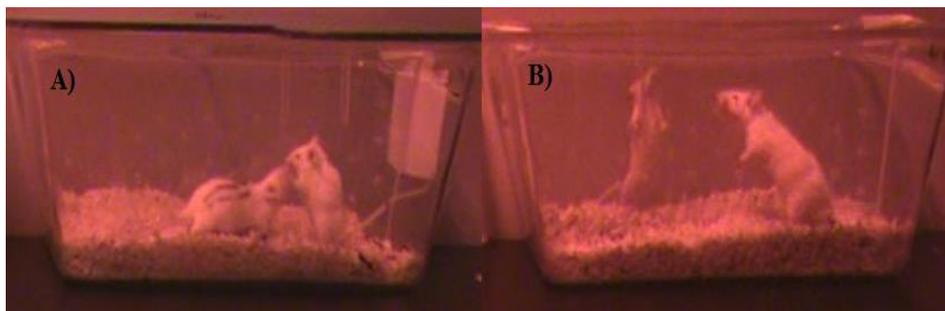


Fig. 15. Fases del modelo de ECDS. A) Fase de contacto físico. B) Fase de contacto sensorial.

- 4) El segundo día de exposición, se colocó al ratón adolescente (intruso) en una nueva caja hogar, directamente dentro del compartimiento de un nuevo agresor (residente), con el objetivo de evitar cualquier tipo de habituación. Al terminar los 5-10 minutos de exposición, el adolescente se transfirió al compartimiento contiguo a la división de acrílico, donde permaneció durante 24 hrs. Este procedimiento se repitió diariamente durante los días restantes del protocolo de ECDS.
- 5) Los agresores nunca se cambiaron de caja hogar durante los 15 días que duro el protocolo; cuando se percibió falta de agresión hacia el intruso, el residente se excluyó del protocolo y se reemplazó por un nuevo agresor.
- 6) La duración de la fase de contacto físico, dependió de la intensidad y del número de ataques que recibió el adolescente. La fase de contacto físico se dio por terminada cuando el adolescente recibió 10, independientemente del tiempo transcurrido.
- 7) Se registró el peso de los ratones adolescentes cada tercer día, durante los días de duración del protocolo.
- 8) Los animales control se colocaron en cajas hogar idénticas, un animal en cada compartimiento durante 15 días. Los adolescentes control fueron rotados diariamente a la caja hogar de un agresor control diferente (el agresor control es un ratón del mismo sexo y edad que el control), evitando en todo momento el contacto físico entre ambos ratones.
- 9) Al término del último día de exposición al ECDS, los ratones adolescentes se alojaron individualmente durante 24 horas, con agua y comida *ad libitum*.

Después de este tiempo se realizó la prueba de interacción social, y al día siguiente la de nado forzado.

3.3.2.3. Prueba de interacción social

Diversos estudios han reportado que los animales derrotados pasan un tiempo promedio significativamente menor cerca de un ratón diana durante una prueba de interacción social (el ratón diana es aquel que cumple con los criterios para ser un ratón agresor, pero que no es utilizado como agresor durante los 15 días del protocolo de ECDS), en comparación con animales no derrotados (Hammels et al. 2015). Este comportamiento denominado aislamiento social, se considera una conducta tipo depresiva (Berton et al. 2006; Golden et al. 2011; Iñiguez et al. 2014). La arena para la prueba de interacción social, es una arena de campo abierto (45 x 45 cm), con una pequeña jaula de alambre (10 x 10 x 10 cm) en el interior de la cual se coloca al ratón diana. El área alrededor de la jaula de alambre se denomina “zona de interacción”, las zonas de “esquinas” se refiere a un área preestablecida en las esquinas en la arena en el lado opuesto a la jaula de alambre (Fig. 16).

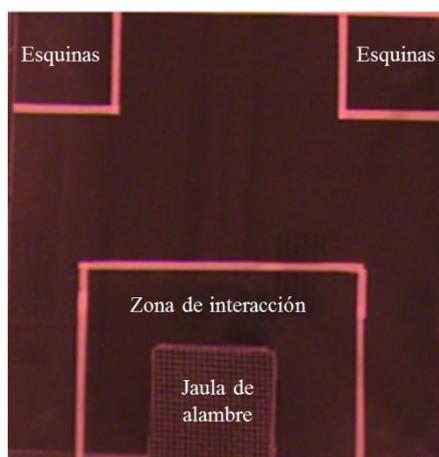


Fig. 16. Arena de interacción social.

Para esta prueba se utilizaron ratones diana y como sujetos experimentales a los ratones adolescentes que fueron expuestos al ECDS. Los ratones se habituaron a la jaula de alambre o a la arena de interacción social, respectivamente, durante 5 minutos, una hora antes de la prueba. La prueba se realizó de siguiente manera:

- 1) La prueba constó de dos fases de 150 segundos de duración cada una, con un intervalo de 30 segundos entre ellas. En la primera fase la jaula de alambre

estuvo vacía, mientras que en la segunda fase el ratón diana fue colocado al interior de la jaula de alambre en la arena de interacción (Fig. 17).

- a. Primera fase (ratón diana ausente): el ratón adolescente derrotado se colocó en la parte central de la arena, en el lado opuesto a la zona de interacción y se le permitió el libre movimiento dentro de la arena durante 150 segundos.
 - b. Al término de esta fase el ratón adolescente derrotado fue retirado de la arena y se dispuso de 30 segundos para introducir al ratón diana dentro de la jaula de alambre en la zona de interacción.
 - c. Segunda fase (ratón diana presente): el ratón adolescente derrotado se colocó nuevamente en la parte central de la arena, en el lado opuesto a la zona de interacción y una vez más se le permitió el libre movimiento dentro de la arena durante 150 segundos.
- 2) Después de esta fase se dio por terminada la prueba de interacción social.

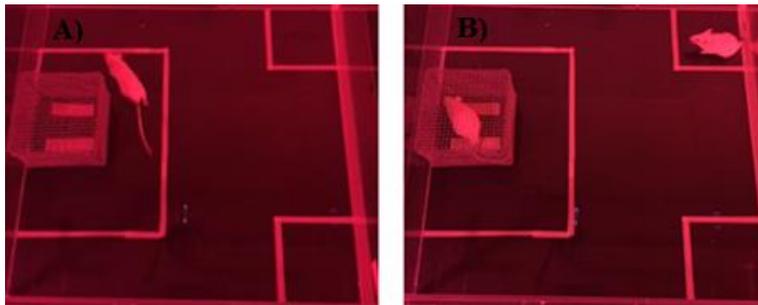


Fig. 17. Fases de la prueba de interacción social. A) Ratón diana ausente. B) Ratón diana presente.

- 3) La prueba fue videograbada para su posterior análisis:
- a. Con el software Top Scan, se midió el tiempo que los adolescentes pasaron en la zona de interacción cuando el ratón diana estuvo ausente y cuando el ratón diana estuvo presente.
 - b. Con estos resultados se calculó la tasa de interacción (TI), dividiendo el tiempo de permanencia en la zona de interacción cuando el ratón diana estuvo presente, entre el tiempo de permanencia en la zona de interacción cuando el ratón diana estuvo ausente.

A partir del resultado de la TI, se determinó si el ratón adolescente desarrolló la conducta de aislamiento social. Si la tasa de interacción fue ≥ 1 se clasificó como

con un fenotipo resiliente, y si la tasa de interacción fue < 1 como un fenotipo susceptible al desarrollo de la conducta de aislamiento social.

3.4. Actividad locomotora y rota rod

Se realizó la prueba de actividad locomotora espontánea y la prueba en rota rod para determinar si clobenpropit afectó la actividad locomotora y por lo tanto las pruebas conductuales. Se utilizó un actímetro infrarrojo Panlab, se midió la actividad locomotora espontánea y los movimientos estereotipados del ratón dentro de la arena durante 5 minutos. Además, esta prueba se videograbó y se analizó con el software Top Scan para obtener la velocidad promedio y la distancia total recorrida dentro de la arena.

La prueba de rota rod evalúa el equilibrio, así como la coordinación motora de los ratones. Se realizaron dos entrenamientos 24 y 18 horas antes de la prueba final. Los entrenamientos y la prueba final consistieron en colocar a los ratones sobre el rotarod, girando a 11 rpm, durante 10 minutos. Independientemente del número de caídas, los animales se volvieron a colocar sobre el rotarod hasta que concluyeron los 10 minutos de entrenamiento. El día de la prueba se registra el número de caídas presentadas por cada ratón; a diferencia de los entrenamientos la prueba final tiene una duración de 5 minutos.

3.5. Obtención de muestras para determinar la concentración tisular de monoaminas por cromatografía líquida de alta resolución

Las áreas a analizar son la corteza prefrontal y la amígdala. Para extraer estas áreas, los ratones fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron inmediatamente los cerebros obteniendo la corteza prefrontal y la amígdala que se colocaron en tubos Eppendorf con 200 μ l de una mezcla de antioxidantes y posteriormente fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

Las determinaciones de las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la corteza prefrontal y la amígdala, se realizaron por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (BAS, West Lafayette, IN, USA). Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4°C . Se extrajo el sobrenadante y se procedió a su análisis mediante HPLC. La fase móvil de la HPLC (0.64 mM de sulfato octilo de sodio, 0.52 mM EDTA, 36.83 mM NaH_2PO_4 ,

10 mM NaCl, 130 ml de metanol, pH 4.0) se bombeó a través de una columna de catecolaminas 3µm (Grace Davison Discovery Science, IL, USA) a un flujo de 1 ml/min.

3.6. Diseño experimental

En todos los experimentos que se describen en esta sección, los ratones adolescentes fueron alojados durante 3 días para permitir su habituación. Las edades se especifican en cada uno de los experimentos. Todas las pruebas de nado forzado e interacción social fueron videograbadas para su posterior análisis.

3.6.1. Experimento 1

Comparar la conducta tipo depresión en ratones adolescentes macho de la cepa SW durante las etapas pre puberal, puberal y pos puberal en el modelo de nado forzado.

Se utilizó el modelo de nado forzado para analizar la conducta tipo depresión, en ratones adolescentes macho de la cepa SW. Con base en las edades descritas por Holder y Blaustein (Holder and Blaustein 2014) se formaron tres grupos independientes. El primer grupo “pre púber” formado por ratones de 31 días de edad, el segundo grupo “púber” formado por ratones de 45 días de edad y el tercer grupo “pos púber” formado por ratones de 57 días de edad (Fig. 18). En los DP 31, 45 y 57 cada uno de los grupos, fue sometido a la prueba de nado forzado.

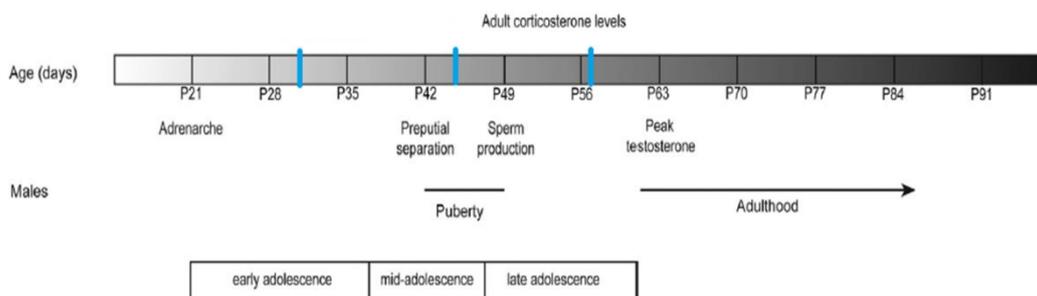


Fig. 18. Generalización del tiempo aproximado y eventos del desarrollo puberal y la adolescencia, en roedores macho (Tomado de Holder y Blaustein 2014).

3.6.2. Experimento 2

Analizar el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R, en ratones adolescentes macho de la cepa SW en el modelo de nado forzado y determinar

su efecto sobre las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la PFC y amígdala.

Se utilizó el modelo de nado forzado para analizar el efecto antidepresivo de clobenpropit en ratones adolescentes macho de la cepa SW (DP45). Para este objetivo se formaron tres grupos, el primer grupo “control” fue tratado con el vehículo; el segundo grupo “control positivo” fue tratado con el antidepresivo sertralina, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina; y el tercer grupo “clobenpropit” con el agonista inverso del H₃R. Utilizamos sertralina como control positivo, ya que con base en lo propuesto por Akhtar et al, el sistema serotoninérgico estaría mediando el efecto tipo antidepresivo presentado por un agonista inverso del H₃R (Akhtar, Pillai, and Vohora 2005).

En el DP 45 los grupos fueron inyectados vía i.p con:

- Control → vehículo
- Control positivo → sertralina (2.5, 5 y 10 mg/kg)
- Clobenpropit → clobenpropit (0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/kg)

Las dosis inicial de 5 mg/kg de clobenpropit fue seleccionada con base en lo descrito previamente en la literatura (Femenía et al. 2015; Ishizuka et al. 2008; Miyazakia et al. 1997; Pérez-García et al. 1999); a partir de esta dosis se construyó una curva dosis respuesta. Una hora después de la administración, se realizó la prueba de nado forzado. Se videograbó para el posterior análisis de las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento.

Para analizar el efecto de clobenpropit sobre las concentraciones tisulares de monoaminas en la PFC y la amígdala en ratones adolescentes macho de la cepa SW, se formaron dos grupos, grupo “control” y grupo “clobenpropit”. En el DP45 el grupo control recibió el vehículo y el grupo clobenpropit 5 mg/kg de clobenpropit por vía i.p. Una hora más tarde los animales se sacrificaron por decapitación sin anestesia y se extrajeron las áreas cerebrales.

Por último, para analizar el efecto de clobenpropit sobre la actividad locomotora en ratones adolescentes macho de la cepa SW, se formaron dos grupos, grupo “control” y grupo “clobenpropit”. En el DP45 el grupo control recibió el vehículo

y el grupo clobenpropit 5 mg/kg de clobenpropit por vía i.p. Una hora más tarde los animales fueron colocados en el actímetro e inmediatamente después en el rota rod.

3.6.3. Experimento 3

Determinar la participación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, en el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R, con el uso de las neurotoxinas 5,7-DHT, DSP4 y 6-OHDA, respectivamente.

Para determinar la participación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, en el efecto tipo antidepresivo de clobenpropit en ratones adolescentes macho de la cepa SW. Se formaron un total de nueve grupos independientes (Tabla 4). En el DP38 dos grupos fueron inyectados por vía i.p con desipramina (30 mg/kg), otros dos grupos con sertralina (10 mg/kg) y dos grupos más con desipramina y sertralina (30 y 10 mg/kg, respectivamente). Treinta minutos después, los dos grupos tratados con desipramina recibieron 5,7-DHT (75 µg/ratón) por vía i.c.v, los dos grupos tratados con sertralina recibieron DSP4 (50 mg/kg) por vía i.p y por último los dos grupos tratados con desipramina y sertralina recibieron 6-OHDA (30 µg/ratón) por vía i.c.v. Los tres grupos restantes formaron los grupos control y fueron inyectados con los vehículos de los fármacos y con los vehículos de las neurotoxinas. El tratamiento con sertralina (inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina) y desipramina (inhibidor de la recaptura de noradrenalina) previo a la administración de las neurotoxinas, se realizó para prevenir daños colaterales en los otros sistemas de neurotransmisión. Al término de estos procedimientos todos los ratones fueron alojados en grupo durante una semana.

Tabla 4. Grupos tratados con las neurotoxinas (DP38).

5,7-DHT	DSP4	6-OHDA
<ul style="list-style-type: none"> • Control • 5,7-HDT + vehículo • 5,7-DHT + clobenpropit 	<ul style="list-style-type: none"> • Control • DSP4 + vehículo • DSP4 + clobenpropit 	<ul style="list-style-type: none"> • Control • 6-OHDA + vehículo • 6-OHDA + clobenpropit

Nota: Los tratamientos en rojo se administraron en el DP45.

En el DP45 los ratones pre tratados con las neurotoxinas, fueron inyectados vía i.p con clobenpropit (5 mg/kg) o con el vehículo (solución salina a 0.9%); formando los grupos neurotoxina + clobenpropit y neurotoxina + vehículo, respectivamente. Una hora después fueron sometidos a la prueba de nado forzado. Adicionalmente

un grupo de ratones intactos (DP45), recibió clobenpropit (5 mg/kg) por vía i.p, formando el grupo intacto + clobenpropit, que sirvió como control positivo.

3.6.4. Experimento 4

Montar el modelo de estrés crónico por derrota social en ratones adolescentes machos de la cepa SW.

Se utilizaron ratones adolescentes macho SW de 25 días de edad. En el DP28 se inició el protocolo de estrés crónico por derrota social (15 días de duración). Se registró el peso de los adolescentes cada tercer día. Al concluir este periodo, en el DP43 se dio por terminado el protocolo y los animales fueron alojados individualmente durante 24 horas. En el DP45 se realizó la prueba de interacción social y en el DP46 se realizó la de nado forzado. Los animales control fueron alojados en las mismas condiciones evitando en todo momento el contacto físico con el agresor control.

3.6.5. Experimento 5

Analizar los posibles efectos antidepresivos del agonista inverso del H₃R, sobre las conductas de aislamiento social y desesperanza, en el modelo de ECDS.

Se utilizaron ratones adolescentes macho SW de 25 días de edad. Se sometieron al protocolo de estrés crónico por derrota social del DP28 al DP43, después de los cual los animales fueron alojados individualmente durante 24 horas. En el DP 45 se realizó la prueba de interacción social, se seleccionó a los ratones adolescentes derrotados susceptibles al desarrollo de la conducta de aislamiento social (TI<1). Al término de la prueba de interacción social los ratones fueron alojados individualmente durante 24 horas. En el DP 46 a estos ratones, se les administró clobenpropit vía i.p (5 mg/kg) o el vehículo, y una hora más tarde se realizó nuevamente la prueba de interacción social e inmediatamente después la prueba de nado forzado.

4. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SEM. La mayoría de nuestros datos no cumplieron con la normalidad, por lo que utilizamos pruebas no paramétricas. Análisis de varianza por rangos (Kruskal Wallis) seguido de la prueba de Dunn´s, para comparar las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento en el modelo de

nado forzado. U de Mann Whitney para establecer diferencias en la concentración tisular de monoaminas, en el peso corporal de los adolescentes expuestos al ECDS y para la prueba de interacción social. Únicamente los datos del actímetro y de rota rod cumplieron la normalidad, por lo utilizamos la prueba t de student para analizarlos. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

5. Resultados

5.1. Comparar la conducta tipo depresión en ratones adolescentes macho de la cepa SW, durante las etapas pre puberal, puberal y pos puberal, en el modelo de nado forzado.

En la figura 19 se comparan las conductas tipo depresión en las etapas pre puberal, puberal y pos puberal en el modelo de nado forzado.

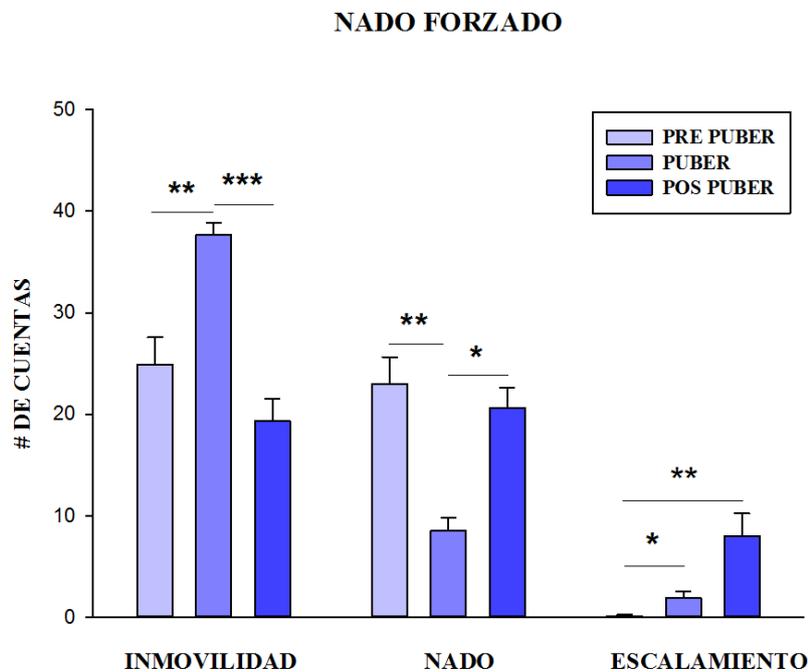


Fig. 19. Conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de las conductas presentadas por cada grupo (pre púber, púber y pos púber), durante los últimos 4 minutos de la prueba. $n=8$. Prueba de Dunn's, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

En la conducta de inmovilidad, el grupo púber presentó un aumento significativo comparado con el grupo pre púber ($p < 0.01$) y pos púber ($p < 0.001$). Entre el grupo pre púber y pos púber no se presentaron diferencias significativas ($p = 0.20$) ($H = 16.418$ con 2 g.l, $p = < 0.001$). El grupo púber presentó una disminución significativa en la conducta de nado, comparado con el grupo pre púber ($p < 0.01$) y

pos púber ($p < 0.05$), sin diferencias entre el grupo pre púber y pos púber ($p = 0.70$) ($H = 14.578$ con 2 g.l, $p = < 0.001$). Por último, en la conducta de escalamiento, los grupos pos púber y púber presentaron un aumento significativo comparados con el grupo pre púber ($p < 0.01$ y < 0.05 , respectivamente); mientras que entre los grupos púber y pos púber no se presentaron diferencias significativas ($p = 0.20$) ($H = 10.904$ con 2 g.l, $p = 0.004$).

5.2. Analizar el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R, en ratones adolescentes macho de la cepa SW en el modelo de nado forzado y determinar su efecto sobre las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la PFC y la amígdala.

A continuación se presentan los efectos de sertralina y clobenpropit en el modelo de nado forzado (Fig. 20).

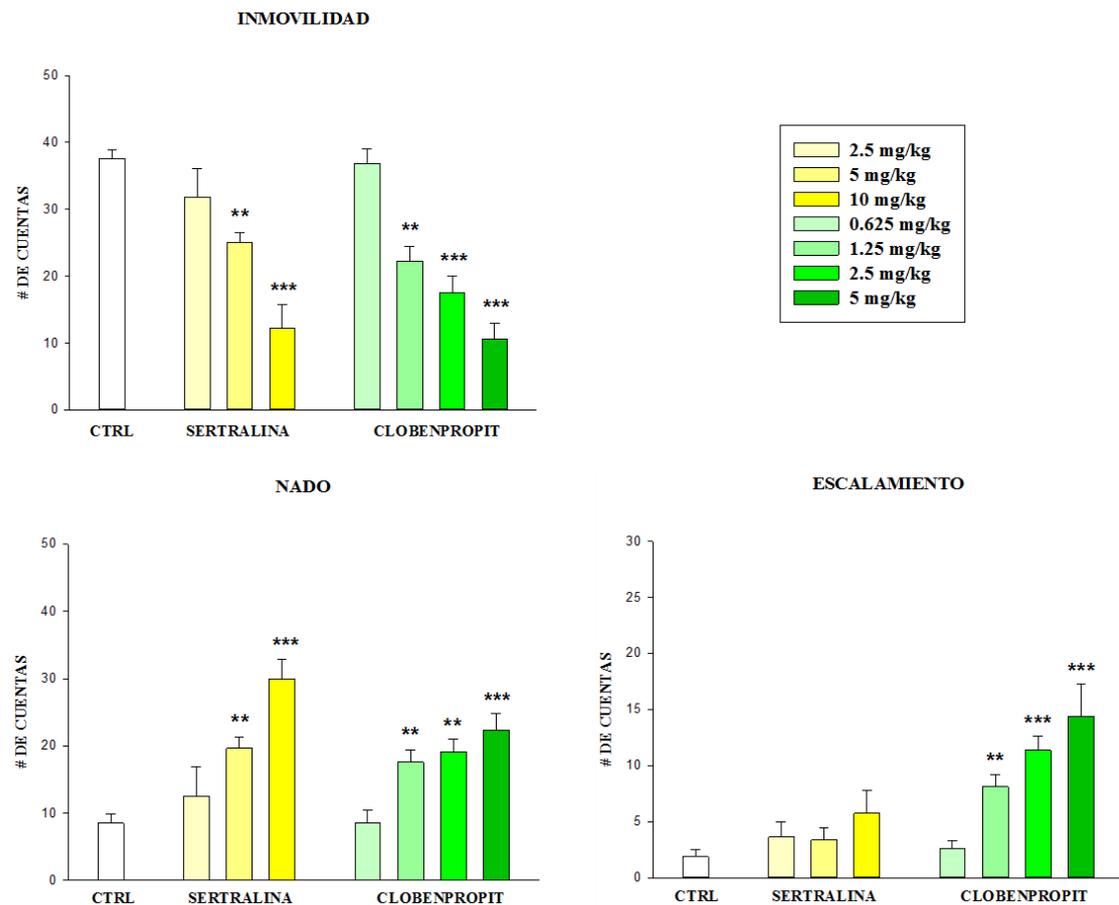


Fig. 20. Efecto de clobenpropit sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas presentadas en los grupos control, control positivo (sertralina) y clobenpropit, durante los últimos 4 minutos de la prueba. $n=8$. Prueba de Dunn's, *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$.

Comparado con el grupo control, sertralina (5 y 10 mg/kg) disminuyó de manera dosis dependiente la conducta de inmovilidad ($H = 20.022$ con 3 g.l, $p = <0.001$), incremento de igual manera la conducta de nado ($H = 19.383$ con 3 g.l, $p = <0.001$) y no modifico la conducta de escalamiento.

Comparado con el grupo control, clobenpropit (1.25, 2.5 y 5 mg/kg vía i.p) disminuyó de manera dosis dependiente la conducta de inmovilidad ($H = 30.487$ con 4 g.l, $p = < 0.001$) e incremento de igual manera las conductas de nado ($H = 22.642$ con 4 g.l, $p = <0.001$) y de escalamiento ($H = 25.925$ con 4 g.l, $p = <0.001$).

Por último, las dosis más bajas tanto de clobenpropit (0.625 mg/kg) como de sertralina (2.5 mg/kg), carecieron de efecto en el modelo de nado forzado, comparado con el grupo control.

Posteriormente se determinó el efecto de clobenpropit (5 mg/kg), sobre la concentración tisular de monoaminas (Fig. 21).

En la corteza prefrontal, en el grupo tratado con clobenpropit se presentó un incremento significativo en la concentración tisular de 5-HT ($p = 0.002$), NA ($p = 0.002$) y DA ($p = 0.002$), comparado con el grupo control, mientras que en la amígdala, en el grupo tratado con clobenpropit se presentó un incremento significativo sólo en la concentración tisular de NA ($p = 0.002$) y DA ($p = 0.002$), mientras que 5-HT permaneció sin cambios ($p = 0.31$).

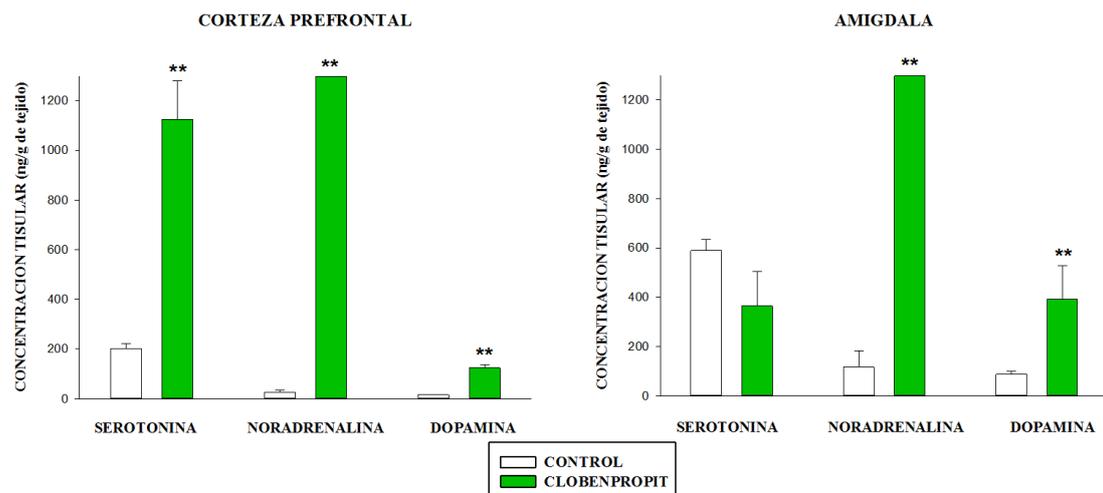


Fig. 21. Efecto de clobenpropit (5 mg/kg) sobre las concentraciones tisulares de serotonina, noradrenalina y dopamina, en la corteza prefrontal y la amígdala. Se presenta la media \pm SEM de la concentración (ng/g de tejido) de cada una de las monoaminas, en el grupo control y el grupo tratado con clobenpropit. $n=6$. Prueba U de Mann-Whitney, ** $p < 0.01$.

Por último, un incremento en la actividad locomotora de los ratones podría ser responsable del incremento en las conductas activas (nado y escalamiento) en el modelo de nado forzado, por tal motivo, medimos el efecto de clobenpropit (5 mg/kg vía i.p) sobre la actividad locomotora (Fig. 22) y la coordinación motriz (Tabla 5).

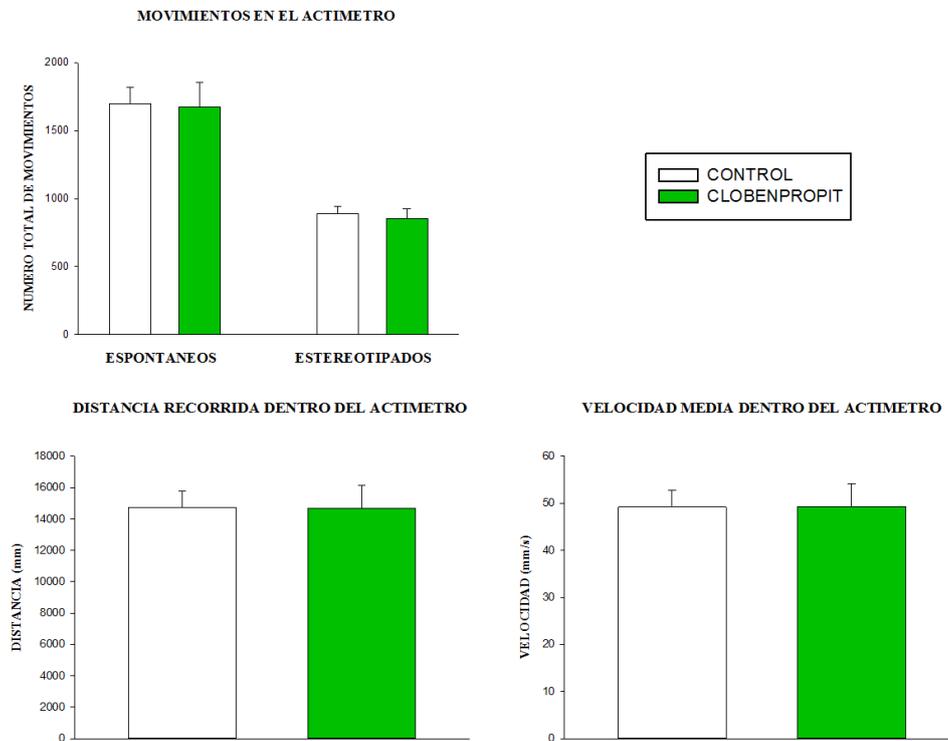


Fig. 22. Efecto de clobenpropit sobre los movimientos, distancia total recorrida y velocidad media, dentro de la arena del actímetro. Se presenta la media \pm SEM del número de movimientos espontáneos y estereotipados, la distancia (mm) y la velocidad (mm/s) en el grupo control y el grupo tratado con clobenpropit. n=10. Prueba t de student.

Tabla 5. Numero de caídas durante la prueba de rota rod.

Ratón	Numero de caídas	
	Control	Clobenpropit
1.	0	0
2.	2	0
3.	1	0
4.	0	2
5.	0	1
6.	0	0
7.	0	0
8.	1	0
9.	0	0
10.	0	0

Prueba U de Mann Whitney. $p = 0.69$

No se presentaron diferencias significativas en los movimientos espontáneos ($p = 0.90$), los movimientos estereotipados ($p = 0.66$), la distancia total recorrida ($p = 0.98$) y la velocidad media dentro del actímetro ($p = 0.98$) entre el grupo control y el grupo tratado con clobenpropit. En el número de caídas en el rota rod, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p = 0.69$).

5.3. Determinar la participación de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, en el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R, con el uso de las neurotoxinas 5,7-DHT, DSP4 y 6-OHDA, respectivamente.

El efecto de clobenpropit en ratones pre tratados con la neurotoxina 5,7-DHT en el modelo de nado forzado se presenta en las figuras 23, 24 y 25.

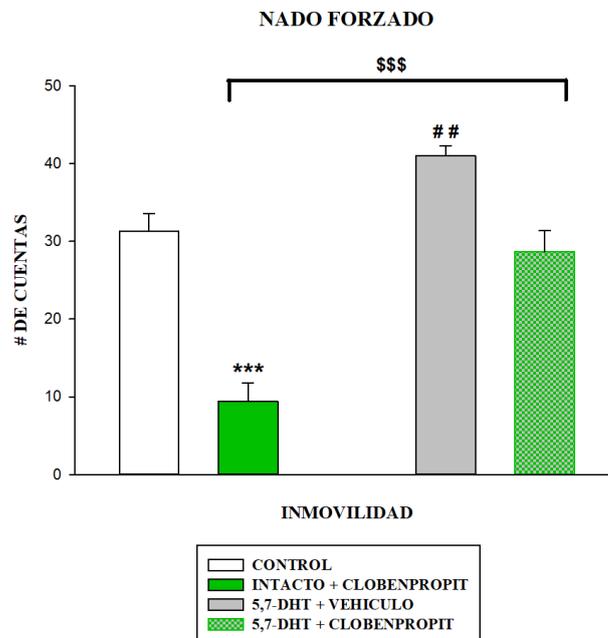


Fig. 23. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 5,7-DHT. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de inmovilidad durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo 5,7-DHT + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo 5,7-DHT + clobenpropit. $n=6-7$. Prueba de Dunn's, vs control ## $p<0.01$; U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit *** $p<0.001$, y para intacto + clobenpropit vs 5,7-DHT + clobenpropit \$\$\$ $p<0.001$.

En la conducta de inmovilidad el grupo intacto + clobenpropit presentó una disminución significativa comparado con el grupo control ($p<0.001$). El grupo 5,7-DHT + vehículo presentó un aumento un aumento significativo en la conducta de inmovilidad comparado con el grupo control; mientras que el grupo 5,7-DHT +

clobenpropit no presentó diferencia significativa comparado con el grupo control ($H = 10.683$ con 2 g.l, $p = 0.005$). El grupo 5,7-DHT + clobenpropit presentó un aumento significativo en la conducta de inmovilidad comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p < 0.001$).

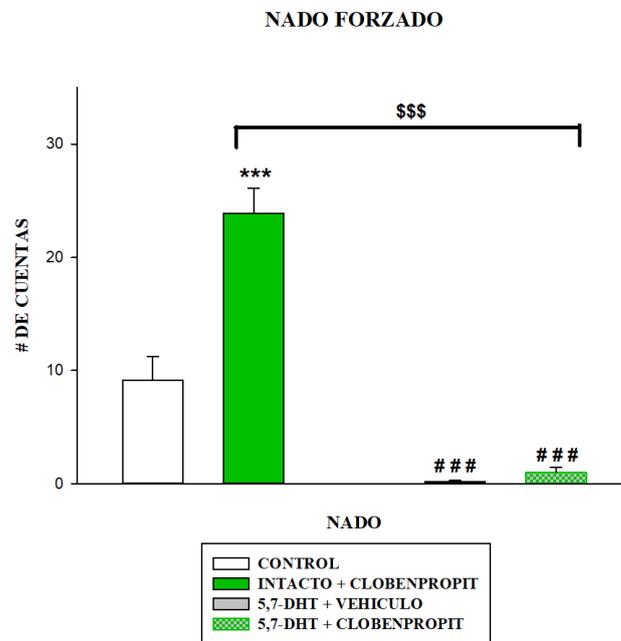


Fig. 24. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de nado en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 5,7-DHT. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de nado durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo 5,7-DHT + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo 5,7-DHT + clobenpropit. $n=6-7$. Prueba de Dunn's, vs control ### $p < 0.001$; U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit *** $p < 0.001$ y para intacto + clobenpropit vs 5,7-DHT + clobenpropit \$\$\$ $p < 0.002$.

En la conducta de nado el grupo intacto + clobenpropit presentó un aumento significativo comparado con el grupo control ($p = 0.001$). Los grupos 5,7-DHT + vehículo y 5,7-DHT + clobenpropit, presentaron una disminución significativa en la conducta de nado comparados con el grupo control ($H = 13.913$ con 2 g.l, $p < 0.001$). Además, el grupo 5,7-DHT + clobenpropit presentó una disminución significativa en la conducta de nado comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p < 0.001$).

Por último, en la conducta de escalamiento el grupo intacto + clobenpropit presentó un aumento significativo comparado con el grupo control ($p = 0.022$). El grupo 5,7-DHT + vehículo no presentó diferencia significativa comparado con el grupo control; mientras que el grupo 5,7-DHT + clobenpropit presentó un aumento significativo en la conducta de escalamiento comparado con el grupo control ($H =$

10.618 con 2 g.l, $p = 0.005$). El grupo 5,7-DHT + clobenpropit no presentó diferencia significativa en la conducta de escalamiento comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = 0.534$).

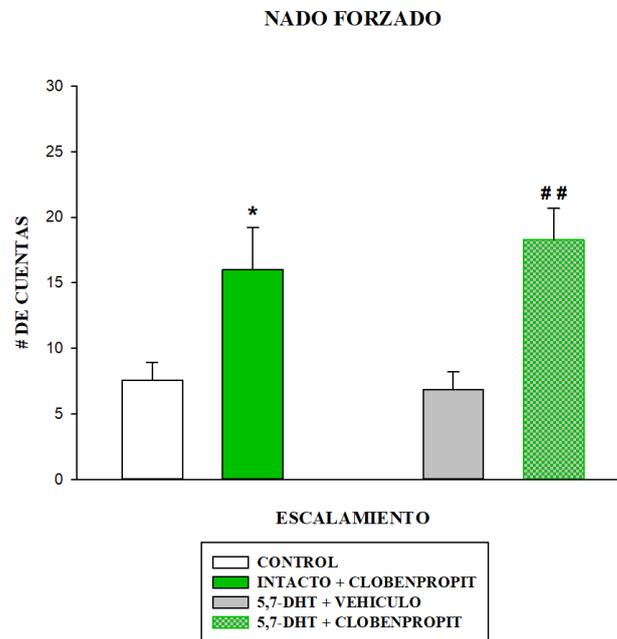


Fig. 25. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 5,7-DHT. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de escalamiento durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo 5,7-DHT + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo 5,7-DHT + clobenpropit. $n=6-7$. Prueba de Dunn's, vs control $##p<0.01$; U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit $*p<0.05$.

El efecto de clobenpropit en ratones pre tratados con la neurotoxina DSP4 en el modelo de nado forzado se presenta en las figuras 26, 27 y 28.

En la conducta de inmovilidad el grupo intacto + clobenpropit presentó una disminución significativa comparado con el grupo control ($p = 0.001$). Los grupos DSP4 + vehículo y DSP4 + clobenpropit no presentaron diferencias significativas en la conducta de inmovilidad comparados con el grupo control ($H = 4.406$ con 2 g.l, $p = 0.110$). El grupo DSP4 + clobenpropit presentó un aumento significativo en la conducta de inmovilidad comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = 0.005$).

En la conducta de nado el grupo intacto + clobenpropit presentó un aumento significativo comparado con el grupo control ($p = 0.014$). El grupo DSP4 + vehículo no presentó diferencia significativa comparado con el grupo control, mientras que el grupo DSP4 + clobenpropit presentó un aumento significativo en la conducta de nado comparado con el grupo control ($H = 11.016$ con 2 g.l, $p = 0.004$). El grupo

DSP4 + clobenpropit no presentó diferencia significativa en la conducta de nado comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = 0.867$).

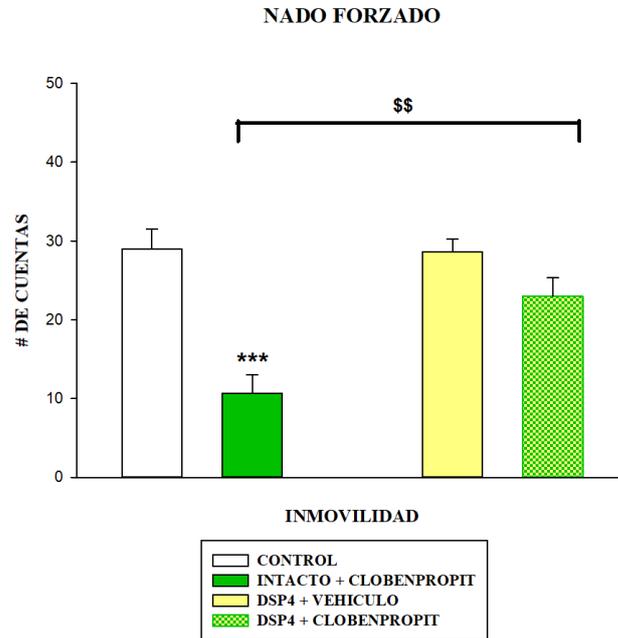


Fig. 26. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con DSP4. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de inmovilidad durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo DSP4 + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo DSP4 + clobenpropit. $n=7-8$. Kruskal Wallis. U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit $***p<0.001$ y para intacto + clobenpropit vs DSP4 + clobenpropit $$$p<0.01$.

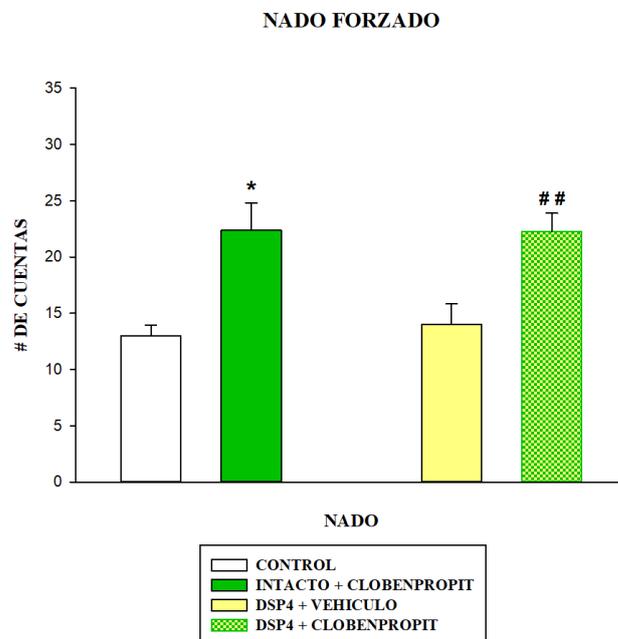


Fig. 27. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de nado en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con DSP4. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de nado durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo DSP4 + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo DSP4 + clobenpropit. $n=7-8$. Prueba de Dunn's, vs control $##p<0.01$; U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit $*p<0.05$.

Por último, en la conducta de escalamiento el grupo intacto + clobenpropit presentó un aumento significativo comparado con el grupo control ($p = 0.007$). Los grupos DSP4 + vehículo y DSP4 + clobenpropit no presentaron diferencias significativas comparados con el grupo control ($H = 0.457$ con 2 g.l, $p = 0.796$). El grupo DSP4 + clobenpropit presentó una disminución significativa en la conducta de escalamiento comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = 0.003$).

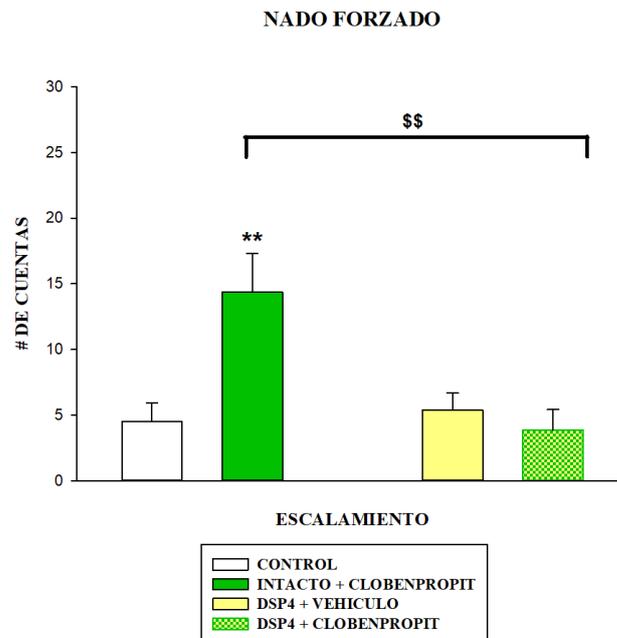


Fig. 28. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con DSP4. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de escalamiento durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo DSP4 + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo DSP4 + clobenpropit. $n=7-8$. Kruskal Wallis. U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit $**p < 0.01$ y para intacto + clobenpropit vs DSP4 + clobenpropit $$$p < 0.01$.

El efecto de clobenpropit en ratones pre tratados con la neurotoxina 6-OHDA en el modelo de nado forzado se presenta en las figuras 29, 30 y 31.

En la conducta de inmovilidad el grupo intacto + clobenpropit presentó una disminución significativa comparado con el grupo control ($p = < 0.001$). Los grupos 6-OHDA + vehículo y 6-OHDA + clobenpropit no presentaron diferencias significativas en la conducta de inmovilidad comparados con el grupo control ($H = 1.314$ con 2 g.l, $p = 0.518$). El grupo 6-OHDA + clobenpropit presentó un aumento significativo en la conducta de inmovilidad comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = < 0.001$).

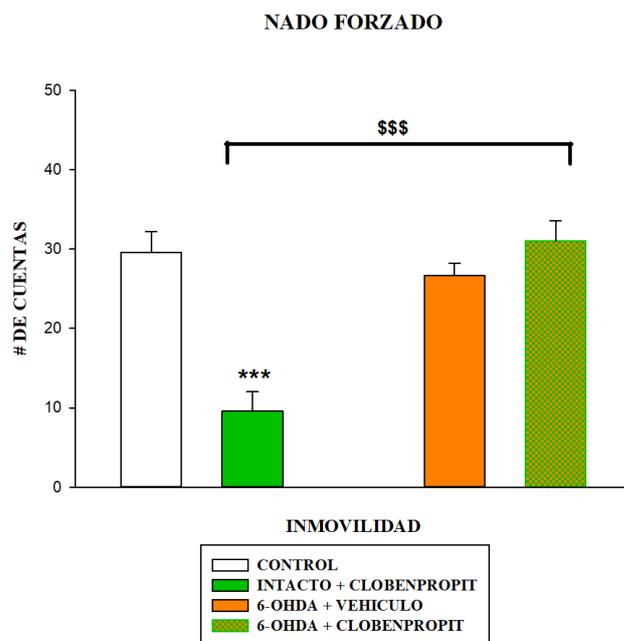


Fig. 29. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 6-OHDA. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de inmovilidad durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo 6-OHDA + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo 6-OHDA + clobenpropit. n=6-8. Kruskal Wallis. U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit *** $p < 0.001$ y para intacto + clobenpropit vs 6-OHDA + clobenpropit \$\$\$ $p < 0.001$.

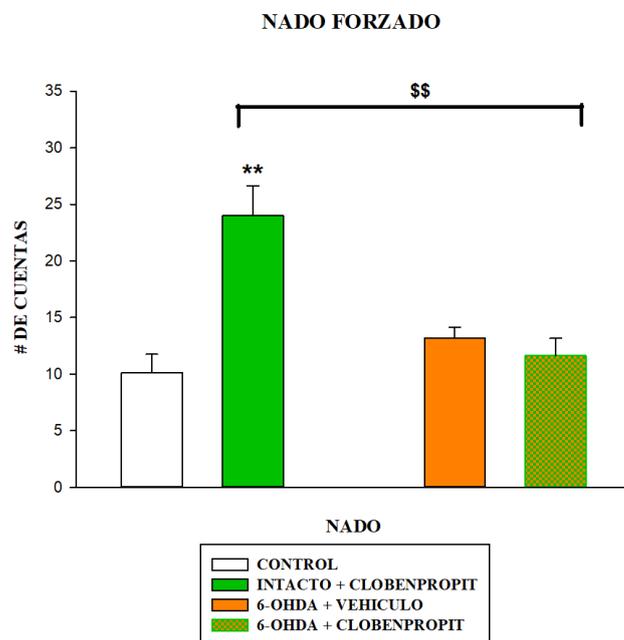


Fig. 30. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de nado en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 6-OHDA. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de nado durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo 6-OHDA + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo 6-OHDA + clobenpropit. n=6-8. Kruskal Wallis. U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit ** $p < 0.01$ y para intacto + clobenpropit vs 6-OHDA + clobenpropit \$\$ $p < 0.01$.

En la conducta de nado el grupo intacto + clobenpropit presentó un aumento significativo comparado con el grupo control ($p = 0.002$). Los grupos 6-OHDA + vehículo y 6-OHDA + clobenpropit no presentaron diferencias significativas comparados con el grupo control ($H = 1.543$ con 2 g.l, $p = 0.462$). El grupo 6-OHDA + clobenpropit presentó una disminución significativa en la conducta de nado comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = 0.003$).

Por último, en la conducta de escalamiento el grupo intacto + clobenpropit presentó un aumento significativo comparado con el grupo control ($p = 0.017$). Los grupos 6-OHDA + vehículo y 6-OHDA + clobenpropit no presentaron diferencias significativas comparados con el grupo control ($H = 0.990$ con 2 g.l, $p = 0.609$). El grupo 6-OHDA + clobenpropit presentó una disminución significativa en la conducta de escalamiento comparado con el grupo intacto + clobenpropit ($p = 0.009$).

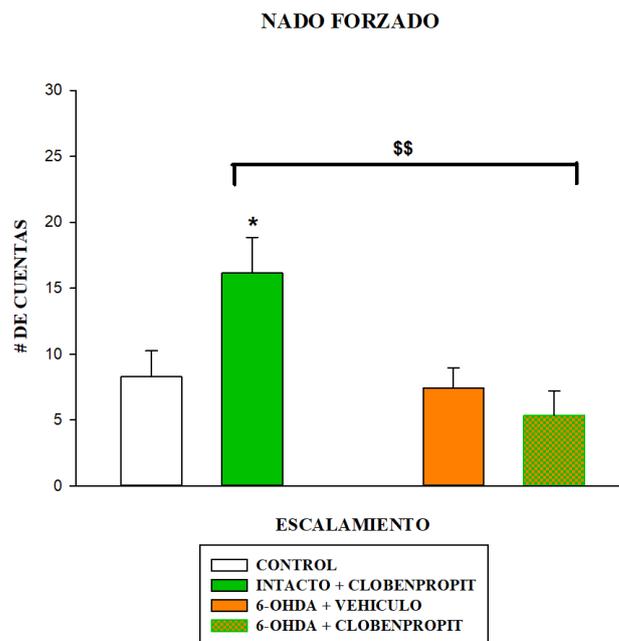


Fig. 31. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de escalamiento en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho pre tratados con 6-OHDA. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de la conducta de escalamiento durante los últimos 4 minutos de la prueba, en el grupo control, el grupo 6-OHDA + vehículo, el grupo intacto + clobenpropit y el grupo 6-OHDA + clobenpropit. $n=6-8$. Kruskal Wallis. U de Mann Whitney para control vs intacto + clobenpropit $*p<0.05$ y para intacto + clobenpropit vs 6-OHDA + clobenpropit $$$p<0.01$.

5.4. Montar el modelo de estrés crónico por derrota social en ratones adolescentes macho de la cepa SW.

Al comparar contra los adolescentes control, los adolescentes derrotados presentaron una disminución significativa y persistente en el peso corporal (Fig. 32), a partir del quinto día de exposición a la derrota social ($p < 0.01$) y hasta el final del protocolo de ECDS ($p < 0.001$).

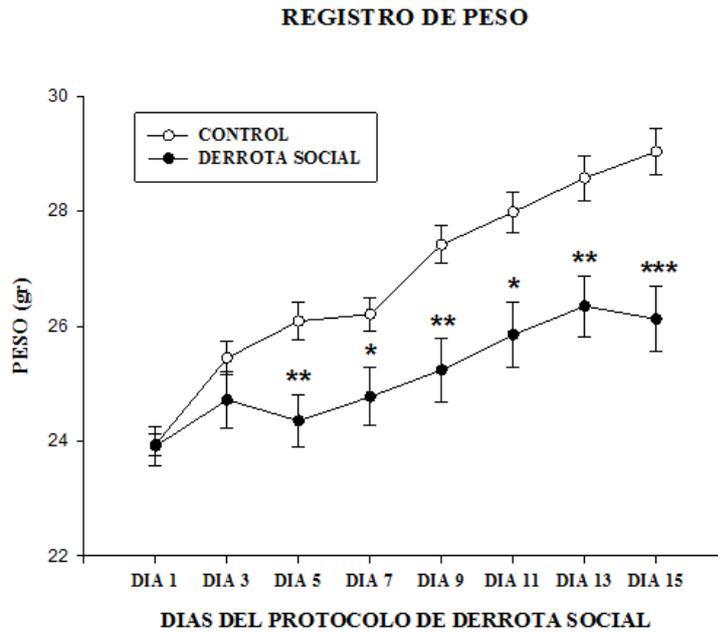


Fig. 32. Registro de peso de los ratones adolescentes durante el protocolo de ECDS. Se presenta la media \pm SEM del peso medido cada tercer día, en los ratones adolescentes control y los ratones adolescentes sometidos a la derrota social. $n = 10$. Prueba U de Mann-Whitney, *** $P < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

En la prueba de interacción social, el grupo control no mostró diferencias significativas en el tiempo que los ratones pasan dentro de la zona de interacción cuando el ratón diana está ausente en comparación con cuando está presente ($p = 0.25$). Los ratones adolescentes sometidos al ECDS, pasaron un tiempo significativamente menor dentro de la zona de interacción cuando el ratón diana estuvo presente, que cuando estuvo ausente ($p < 0.001$). El tiempo que pasan dentro de la zona de interacción los ratones derrotados cuando el ratón diana estuvo presente, también es menor comparado con los ratones control ($p < 0.001$) (Fig. 33).

PRUEBA DE INTERACCION SOCIAL

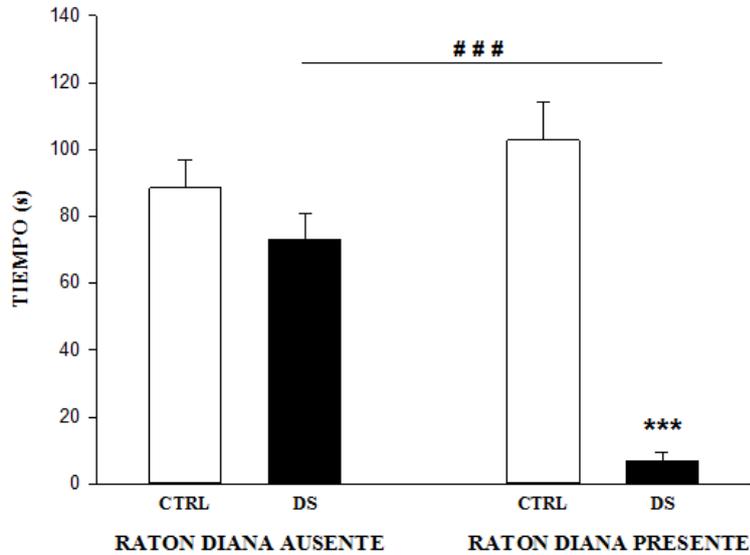


Fig. 33. Prueba de interacción social en los ratones adolescentes expuestos al ECDS. Se presenta la media \pm SEM del tiempo que los ratones adolescentes control (CTRL) y los ratones adolescentes derrotados (DS), permanecen en la zona de interacción en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) del ratón diana. $n = 7-10$. Prueba U de Mann Whitney, vs CTRL *** $p < 0.001$; vs DS ### $p < 0.001$.

En cuanto a la tasa de interacción (TI) encontramos que el 83% de los ratones adolescentes expuestos al ECDS, fue susceptible al desarrollo de la conducta de aislamiento social, mientras que el 17% restante fue resiliente al desarrollo de tal conducta. Los resultados de la TI se presentan en la figura 34.

DISTRIBUCION DE LA TI

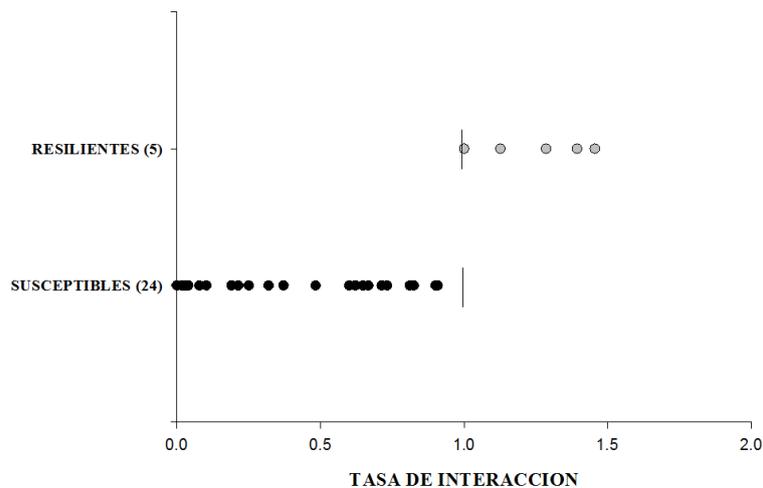


Fig. 34. Desarrollo de la conducta de aislamiento social con base en la tasa de interacción presentada en los ratones adolescentes expuestos al ECDS. Resilientes (círculos grises) $TI \geq 1$. Susceptibles (círculos negros) $TI < 1$.

La figura 35 muestra el desempeño de los ratones expuestos al ECDS en el modelo de nado forzado.

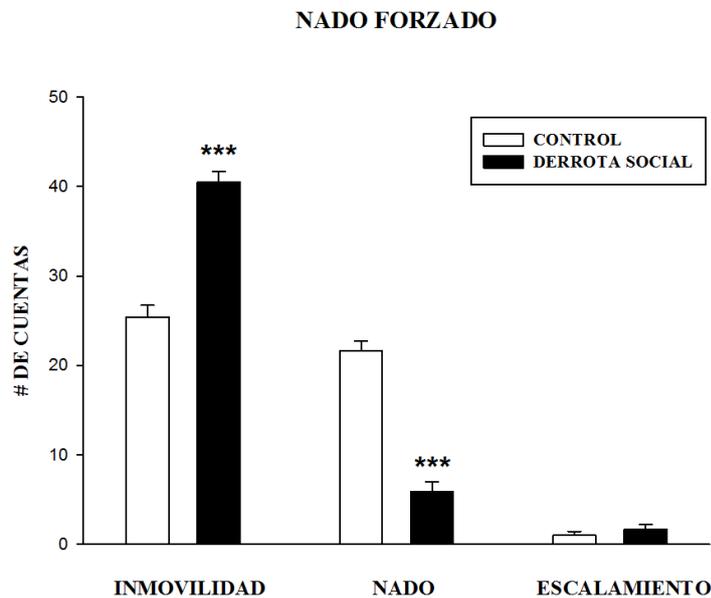


Fig. 35. Efecto del ECDS sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en los ratones que desarrollaron la conducta de aislamiento social. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de las conductas presentadas en el grupo control y el grupo expuesto a ECDS, durante los últimos 4 minutos de la prueba. $n = 8$. Prueba U de Mann-Whitney, *** $p < 0.001$.

Los ratones adolescentes expuestos al ECDS presentaron un aumento significativo en la conducta de inmovilidad ($p < 0.001$), así como una disminución significativa en la conducta de nado ($p < 0.001$), al compararlos con el grupo control, mientras que la conducta de escalamiento no presentó diferencias ($p = 0.44$).

5.5. Analizar los posibles efectos antidepressivos del agonista inverso del H₃R, en el modelo de ECDS.

En la prueba de interacción social clasificatoria (DP45) (Fig. 36), los ratones adolescentes sometidos al ECDS presentaron una disminución significativa en el tiempo pasado en la zona de interacción cuando el ratón diana estaba presente comparado con cuando estaba ausente ($p < 0.01$).

Los ratones susceptibles tratados con clobenpropit presentaron una disminución significativa en el tiempo pasado en la zona de interacción cuando el ratón diana estuvo presente que cuando ratón diana estuvo ausente ($p < 0.05$). Tanto en la prueba de interacción clasificatoria como en la prueba de interacción social posterior al tratamiento con clobenpropit, los tiempos pasados en la zona de interacción por los ratones susceptibles cuando el ratón diana estuvo presente, no fueron diferentes (p

= 0.59). Posteriormente se calculó la TI para cada ratón y a continuación se presentan los resultados (Fig. 37).

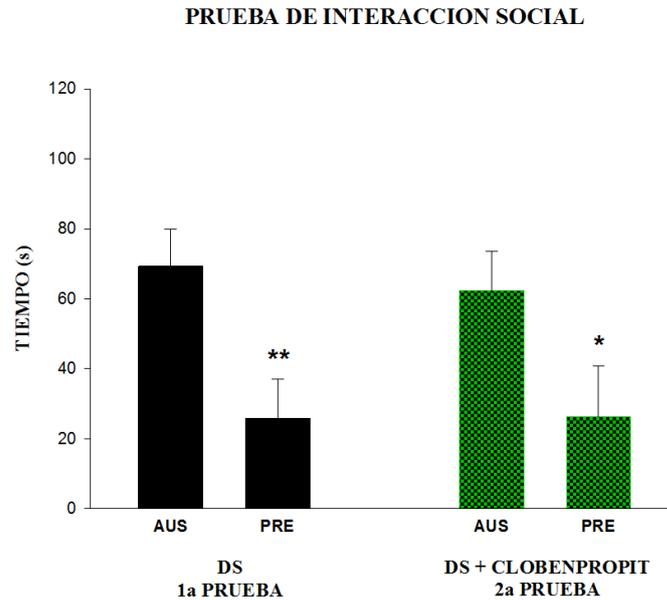


Fig. 36. Efecto de clobenpropit sobre la prueba de interacción social en ratones adolescentes con conducta de aislamiento social. Se presenta la media \pm SEM del tiempo (s) de permanencia en la zona de interacción, durante la 1ª (DP45) prueba de interacción social (clasificatoria) y durante la 2ª (DP46) prueba de interacción social (ratones susceptibles tratados con clobenpropit), cuando el ratón diana está ausente (AUS) y presente (PRE). $n = 9$. Prueba U de Mann-Whitney, vs AUS ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

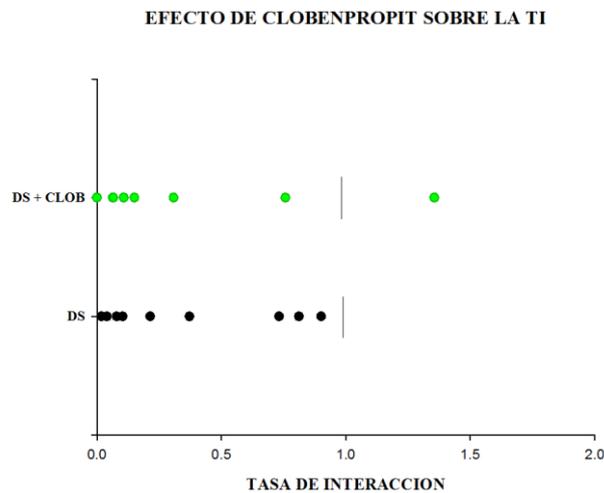


Fig. 37. Efecto de clobenpropit sobre la TI. Se presenta la tasa de interacción de los ratones en la 1ª (DP45) prueba de interacción social (círculos negros) y durante la 2ª (DP46) prueba de interacción social (ratones susceptibles tratados con clobenpropit, círculos verdes). $n = 9$.

Solo uno de los ratones que desarrolló la conducta de aislamiento social y posteriormente fue tratado con clobenpropit (5 mg/kg) presentó remisión de la

conducta de evitación social (tasa de interacción ≥ 1). En el resto de los ratones persistió la conducta de evitación social.

La figura 38 presenta los parámetros de nado forzado en los ratones sometidos al ECDS que desarrollaron la conducta de aislamiento social y fueron tratados con clobenpropit.

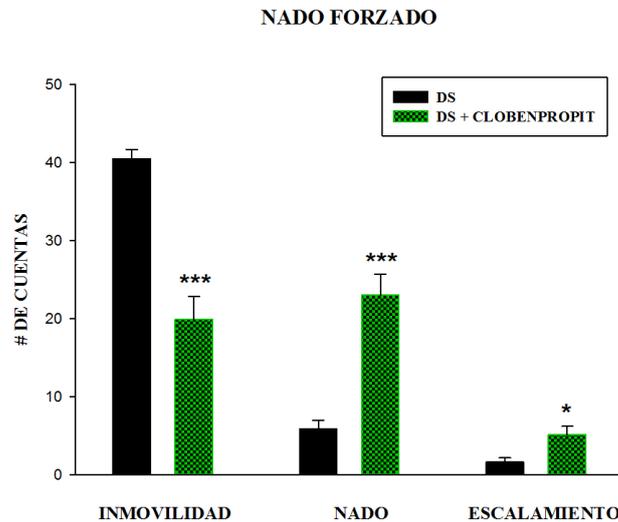


Fig. 38. Efecto de clobenpropit sobre las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento, en ratones adolescentes con conducta de aislamiento social. Se presenta la media \pm SEM del número de cuentas de las conductas presentadas en el grupo DS (expuesto a ECDS) y el grupo DS + clobenpropit (ratones susceptibles tratados con clobenpropit), durante los últimos 4 minutos de la prueba. $n = 7-8$. Prueba U de Mann-Whitney, *** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$.

En el grupo DS + clobenpropit se presentó una disminución significativa en la conducta de inmovilidad ($p < 0.001$) comparado con el grupo DS sin tratamiento. Mientras que en las conductas de nado y escalamiento, en el grupo DS + clobenpropit se presentó un aumento significativo en estas conductas ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente) comparadas con el grupo DS sin tratamiento.

6. Discusión

6.1. Conducta tipo depresión en ratones adolescentes macho

En humanos la edad máxima de inicio de distintos trastornos afectivos, incluida la depresión es a los 14 años, durante la parte final de la pubertad (Holder and Blaustein 2014; McCormick and Green 2013). Se ha propuesto que la elevada neuroplasticidad puberal, incrementa la vulnerabilidad al desarrollo de enfermedades mentales (Holder and Blaustein 2014), sin embargo estos mecanismos no han sido aclarados por completo. En roedores, la conducta de inmovilidad en el modelo de nado forzado, es utilizada como medida de

desesperanza conductual, también denominado conducta tipo depresión (Porsolt et al. 1978). Con el objetivo de analizar si la conducta tipo depresión variaba dependiendo de la edad, en nuestro trabajo estudiamos y encontramos que únicamente los ratones adolescentes macho púberes (DP45) de la cepa SW, presentan un aumento significativo en la conducta de inmovilidad comparado con ratones adolescentes macho pre-púberes y pos-púberes, lo que se traduce en una mayor conducta tipo depresión. Hefner y Holmes (2007) reportaron que en ratones adolescentes macho de la cepa C57BL/6J, los ratones púberes (DP42) y pos-púberes (DP56), presentan mayor conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado, comparado con los ratones pre-púberes (DP28) (Hefner and Holmes 2007). Estos resultados nos indican que los ratones macho púberes de las cepas SW y C57BL/6J presentan de manera espontánea mayor conducta tipo depresión, en el modelo de nado forzado; y por lo tanto, son sujetos útiles para el estudio de la depresión en la adolescencia. Estructuras clave implicadas en la fisiopatología de la depresión como el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala, presentan diferentes patrones de maduración. En humanos el hipocampo alcanza la madurez durante los primeros años de vida, la corteza prefrontal continúa su desarrollo durante la infancia y logra la madurez en la adolescencia tardía, mientras que la amígdala es la estructura que presenta el desarrollo más lento, alcanzando la madurez durante la vida adulta (Lupien et al. 2009). Dado que durante la pubertad, la corteza prefrontal y la amígdala no han alcanzado la madurez, es posible pensar que los procesos cognitivos y emocionales regulados por estas estructuras no pueden ser llevados a cabo de manera eficiente durante la pubertad y que, al igual que en el humano, las diferencias en las etapas de maduración de estas áreas (Holder and Blaustein 2014; Lupien et al. 2009), podrían favorecer la aparición de conductas tipo depresión. Estudios futuros que evalúen la estructura y funcionalidad de las conexiones entre la PFC y la amígdala (con imagen por resonancia magnética funcional, en estado de reposo y/o ante un estímulo sensorial o un desafío farmacológico), a la par del desarrollo de conductas tipo depresión en ratones adolescentes (como la desesperanza en el modelo de nado forzado), son necesarios para lograr un mejor entendimiento de la asociación entre adolescencia y depresión.

6.2 Efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R en el modelo de nado forzado

Con respecto a otros modelos animales de depresión, una ventaja del modelo de nado forzado es que tiene un gran valor predictivo para probar los efectos antidepresivos de un nuevo compuesto (Cryan, Valentino, and Lucki 2005). Además, permite diferenciar entre las dos principales clases de antidepresivos: los inhibidores de la recaptura de NA y DA, que incrementan la conducta de escalamiento, y los inhibidores de la recaptura de 5-HT, que incrementan la conducta de nado (Bogdanova et al. 2013; Cryan, Valentino, and Lucki 2005; Detke and Lucki 1996). En nuestro trabajo observamos que el agonista inverso del H₃R (clobenpropit), disminuyó significativamente la conducta de inmovilidad e incrementó de manera significativa las conductas de nado y de escalamiento.

La disminución en la conducta de inmovilidad ya había sido reportada en trabajos previos con el uso distintos antagonistas/agonistas inversos del H₃R (Akhtar, Pillai, and Vohora 2005; Bahi, Schwed, and Walter 2014; Femenía et al. 2015; Gao et al. 2013; Lamberti et al. 1998; Pérez-García et al. 1999). En esos trabajos, sin embargo, no se tomaron en cuenta las conductas activas de nado y escalamiento. Sólo el trabajo de Akhtar et al (Akhtar, Pillai, and Vohora 2005), al igual que el nuestro, cuantificó las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento y nuestros resultados son consistentes con lo reportado por este autor. Es importante mencionar que nuestro trabajo es el primero que encuentra un efecto tipo antidepresivo de un agonista inverso del H₃R en ratones adolescentes púberes (DP45). Por lo tanto, se puede concluir que los agonistas inversos del H₃R tienen un efecto antidepresivo tanto en animales adultos como en adolescentes púberes.

El trabajo de Akhtar reporta haber encontrado además un incremento en la conducta de nado, con el uso del agonista inverso del H₃R tioperamida, en el modelo de nado forzado. Dado que Akhtar et al., propusieron que el mecanismo por el cual actuaba la tioperamida era serotoninérgico (Akhtar, Pillai, and Vohora 2005), en nuestro trabajo decidimos utilizar como control positivo un ISRS, la sertralina. Nuestros datos muestran que el agonista inverso del H₃R clobenpropit, al igual que sertralina, incrementa significativamente la conducta de nado. Es importante notar que clobenpropit es más potente que sertralina, ya que el efecto tipo antidepresivo de

sertralina se presentó con una dosis de 2.5 mg/kg, mientras que el mismo efecto con clobenpropit se presentó con una dosis de 1.25 mg/kg. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el sistema serotoninérgico podría estar mediando el efecto tipo antidepresivo de los agonistas inversos del H₃R, tanto en animales adultos como en adolescentes púberes.

Por último, observamos que el clobenpropit incrementó de manera significativa la conducta de escalamiento. Nuestro trabajo es el primero que reporta un aumento en esta conducta, que sugiere la participación de los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico en la mediación del efecto tipo antidepresivo del clobenpropit, que no parece compartir con la tioperamida, otro agonista inverso del H₃R. No obstante, el trabajo de Flik reporta que la tioperamida incrementa las concentraciones extracelulares de NA y DA en la PFC (Flik et al. 2015). En este trabajo, observamos que clobenpropit incrementó las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la corteza pre frontal, y de NA y DA en la amígdala, dos estructuras clave implicadas en la fisiopatología de la depresión. Estudios *in vitro* demuestran que histamina y R- α -metilhistamina, son capaces de inhibir la liberación de 5-HT, NA y DA y que este efecto fue mediado por el H₃R (Fink et al. 1990; Schlicker et al. 1989, 1993). Además, diversos trabajos han determinado el efecto de los antagonistas/agonistas inversos del H₃R, sobre las concentraciones extracelulares de 5-HT, NA y DA, encontrando que incrementan la tasa de recambio de 5-HT en el estriado (Ligneau, Perrin, et al. 2007), incrementan la concentración extracelular de 5-HT, NA y DA en la corteza prefrontal (Flik et al. 2015; Ligneau, Perrin, et al. 2007) e incrementan la concentración extracelular de NA y DA en la corteza cingulada anterior y en los núcleos tuberomamilares (Flik et al. 2015; Medhurst et al. 2007; Southam et al. 2009). Es importante mencionar que en ninguno de estos trabajos se evaluó el efecto tipo antidepresivo de los compuestos. Nuestro trabajo demostró que el efecto tipo antidepresivo de clobenpropit, se acompañó de un incremento significativo en las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en la PFC, y de NA y DA en la amígdala, de ratones adolescentes. Lo que sugiere que los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico estarían participando en la mediación del efecto tipo antidepresivo de clobenpropit.

Nuestros resultados muestran que el efecto tipo antidepresivo de clobenpropit no fue secundario a un aumento en la actividad locomotora del ratón. Trabajos previos

que analizaron el efecto tipo antidepresivo de antagonistas/agonistas inversos del H₃R tampoco encontraron alteraciones en la actividad locomotora de los animales (Bahi, Schwed, and Walter 2014; Lamberti et al. 1998; Pérez-García et al. 1999).

6.3 Los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico participan en la mediación del efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R clobenpropit

No es del todo claro el mecanismo a través del cual los antagonistas/agonistas inversos del H₃R ejercen un efecto tipo antidepresivo. Existen algunos factores a tomar en cuenta al momento de plantear una explicación; no olvidemos que los H₃R's presentan una elevada actividad constitutiva y en condiciones fisiológicas mantienen un tono inhibitorio sobre la síntesis y liberación de histamina (autorreceptores), así como de la liberación de otros neurotransmisores (heterorreceptores) (Aquino-Miranda and Arias-Montaña 2012; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016). Por lo tanto, la unión de un agonista inverso al H₃R se traducirá en un aumento en la liberación de neurotransmisores (autorreceptores → histamina; heterorreceptores → 5-HT, NA y DA) y, a su vez, estos neurotransmisores ejercerán un efecto sobre sus respectivos receptores (Ellenbroek and Ghiabi 2014; Sadek et al. 2016). Por lo tanto, el efecto tipo antidepresivo presentado por el agonista inverso del H₃R clobenpropit podría tener las siguientes dos explicaciones:

Por una parte, existe evidencia de que la activación de H₁R y H₂R postsinápticos, podría mediar el efecto tipo antidepresivo de los agonistas inversos de H₃R. Femenía et al, demostró que en la rata cuando se administra clobenpropit por vía sistémica y, de manera simultánea, los antagonistas de los H₁R y H₂R triprolidina y cimetidina, respectivamente, por vía intra-hipocampal, se pierde el efecto tipo antidepresivo del clobenpropit en el modelo de nado forzado. Este resultado sugiere que el efecto del clobenpropit está mediado por la desinhibición de la liberación de histamina (autorreceptores) y la subsecuente activación de receptores postsinápticos H₁ y H₂, todo esto específicamente en hipocampo (Femenía et al. 2015). En otras regiones del SNC, se reportan efectos similares. En un estudio *in vivo* con microdiálisis se demostró que la administración de histamina directamente en el núcleo accumbens (NAc), aumenta significativamente la

concentración extracelular de dopamina. Esta respuesta fue completamente bloqueada por la administración de un antagonista del H₁R (Galosi et al. 2001). Otro estudio de imagen demostró que en humanos con depresión hay una disminución de los H₁R's en la corteza prefrontal y en el giro cingulado, además esta disminución se asoció con la severidad de la depresión (Kano et al. 2004). Estas evidencias sugieren que los H₁R's postsinápticos podrían participar en la mediación del efecto tipo antidepresivo del clobenpropit, sugiriendo la posibilidad de que la histamina liberada por efecto de este compuesto, favorece la subsecuente activación de neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas, a través de H₁R's.

La segunda posible explicación plantea que como heterorreceptores pre-sinápticos, los H₃R's regulan la liberación de otros neurotransmisores como serotonina, noradrenalina y dopamina. Estas monoaminas son importantes en la neurobiología de la depresión y en la mediación del efecto antidepresivo de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de este trastorno. Para comprobar si estos sistemas participan en la mediación del efecto tipo antidepresivo del clobenpropit en la presente tesis ratones adolescentes macho, fueron lesionados con las neurotoxinas serotoninérgica 5,7-DHT, noradrenérgica DSP4 o dopaminérgica 6-OHDA.

Encontramos que la lesión de las terminales serotoninérgicas con 5,7-DHT revierte el efecto tipo antidepresivo del clobenpropit. En este caso la pérdida del efecto tipo antidepresivo fue secundaria a la disminución en la conducta de nado. Estos resultados resaltan la participación del sistema serotoninérgico en la conducta de nado (Detke and Lucki 1996; Detke, Rickels, and Lucki 1995; Rénéric and Lucki 1998). Diversos trabajos han analizado la interacción entre los H₃R's y el sistema serotoninérgico encontrando que, la histamina y los agonistas del H₃R R- α -metilhistamina e immpip disminuyen la liberación de 5-HT en la corteza cerebral y en la pars reticulada de la sustancia nigra (SNr) de la rata, mientras que el agonista inverso del H₃R tioperamida produce el efecto contrario (Fink et al. 1990; Schlicker, Betz, and Göthert 1988; Threlfell et al. 2004). Además, los agonistas inversos del H₃R tioperamida y BF2.649 incrementan la concentración extracelular de 5-HT en la corteza prefrontal y la tasa de recambio de 5-HT en el estriado, respectivamente (Flik et al. 2015; Ligneau, Perrin, et al. 2007).

Con relación a la lesión noradrenérgica con DSP4, encontramos que ésta también bloqueó el efecto tipo antidepresivo del clobenpropit. En este caso, la pérdida del efecto tipo antidepresivo fue secundaria a la disminución en la conducta de escalamiento, mientras que la conducta de nado permaneció sin cambios. Estos resultados resaltan la participación del sistema noradrenérgico en la conducta de escalamiento (Detke and Lucki 1996; Detke, Rickels, and Lucki 1995). Trabajos que han analizado la interacción entre los H₃R's y el sistema noradrenérgico encontraron que, la histamina y el agonista del H₃R R- α -metilhistamina inhiben la liberación de NA en la corteza cerebral e hipocampo de roedores (Di Carlo, Ghi, and Orsetti 2000; Schlicker et al. 1989, 1992; Timm et al. 1998) y en la corteza cerebral humana (Schlicker, Werthweina, and Zentnerb 1999), mientras que el agonista inverso del H₃R tioperamida produce el efecto contrario. Los agonistas inversos del H₃R GSK189254, GSK207040 y tioperamida incrementan la concentración extracelular de NA en la corteza cingulada anterior, en la corteza prefrontal y en los núcleos tuberomamilares (Flik et al. 2015; Medhurst et al. 2007; Southam et al. 2009).

Por último, encontramos que la lesión con 6-OHDA bloquea el efecto tipo antidepresivo del clobenpropit. La pérdida del efecto tipo antidepresivo fue secundaria a la disminución en la conducta de nado y en la conducta de escalamiento. Estos resultados resaltan la participación del sistema dopaminérgico en la conducta de escalamiento (Rénéric and Lucki 1998) y también en la conducta de nado. Trabajos previos han analizado la interacción entre los H₃R y el sistema dopaminérgico encontrando que, la histamina y el agonista del H₃R R- α -metilhistamina disminuyen la liberación de DA en el estriado, mientras que el agonista inverso del H₃R tioperamida bloquea este efecto (Schlicker et al. 1993). Los agonistas inversos del H₃R BF2.649, GSK189254, GSK207040 y tioperamida incrementan la concentración extracelular de DA en la corteza prefrontal y en la corteza cingulada anterior (Flik et al. 2015; Ligneau, Perrin, et al. 2007; Medhurst et al. 2007; Southam et al. 2009). En el NAc, tanto tioperamida como clobenpropit, potencian el aumento en la concentración extracelular de DA inducida por metanfetamina (Munzar et al. 2004). Además, tioperamida incrementa la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del NAc (Flik et al. 2015).

Nuestro trabajo demostró que el agonista inverso del H₃R clobenpropit requiere de las terminales serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas para ejercer un efecto tipo antidepresivo en el modelo de nado forzado. Además, las evidencias señalan que la acción de los agonistas inversos del H₃R sobre heterorreceptores, se traduce en una mayor liberación de los neurotransmisores 5-HT, NA y DA en regiones como la corteza prefrontal y la corteza cingulada anterior.

El trabajo de Flik et al, es el único trabajo hasta la fecha que evalúa la interacción entre el sistema histaminérgico y los otros sistemas de monoaminas a través de los H₃R's utilizando el agonista inverso tioperamida (Flik et al. 2015). En este trabajo tioperamida incrementó la concentración extracelular de 5-HT, NA y DA en la corteza prefrontal y además, incrementó la tasa de disparo de neuronas dopaminérgicas del ATV, este efecto fue mimetizado por la histamina. Este autor concluye que tioperamida estimula la transmisión serotoninérgica, noradrenérgica y dopaminérgica al menos en la PFC (Flik et al. 2015). En el trabajo de Guiard et al, la lesión selectiva de las terminales dopaminérgicas con 6-OHDA disminuyó la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas del DRN (Guiard et al. 2008), revelando con esto el efecto excitatorio de las proyecciones dopaminérgicas sobre las neuronas serotoninérgicas. Con base en esto, se ha planteado que la mayor liberación de histamina por acción del agonista inverso del H₃R tioperamida, es capaz de estimular la neurotransmisión dopaminérgica a través de H₁R's y que subsecuentemente DA pueda activar al sistema serotoninérgico (Flik et al. 2015; Guiard et al. 2008), proponiendo al sistema dopaminérgico como un elemento clave en la interacción funcional entre la histamina y los otros sistemas (Flik et al. 2015). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, encontramos que al lesionar las terminales dopaminérgicas, se perdió el efecto antidepresivo del clobenpropit. La pérdida del efecto antidepresivo fue secundaria a una disminución en la conducta de escalamiento, pero también se debió a una disminución en la conducta de nado, que es mediada por el sistema serotoninérgico. Concluimos que al lesionar las terminales dopaminérgicas interferimos con el desarrollo de la conducta de escalamiento (DA). Además, es probable que se disminuyera el efecto excitatorio de las terminales dopaminérgicas sobre las neuronas serotoninérgicas en el DRN, lo que podría interferir también con el desarrollo de la conducta de nado (5-HT) y de esta manera bloquear el efecto tipo antidepresivo de clobenpropit. Sin embargo,

trabajos previos señalan que la histamina *per se* activa tanto neuronas del sistema noradrenérgico como del sistema serotoninérgico, a través de H₁R's (Brown et al. 2002; Korotkova et al. 2005). Es importante mencionar que, en el trabajo de Flik et al, no se evaluó el efecto de la histamina sobre la tasa de disparo de neuronas noradrenérgicas o serotoninérgicas (debido a que la tasa de disparo de estas neuronas no fue modificada por tioperamida). Por lo que la noción del sistema dopaminérgico como elemento clave en la interacción entre histamina y los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico, debe ser evaluada a detalle en futuros estudios.

Con todo lo anterior podemos proponer que el efecto tipo antidepresivo del agonista inverso del H₃R, puede ser explicado de la siguiente manera. En primer lugar, la acción del fármaco sobre autorreceptores H₃ presinápticos localizados en las terminales histaminérgicas, lo que se traduce en una mayor liberación de histamina (Aquino-Miranda and Arias-Montaña 2012; H. L. Haas, Sergeeva, and Selbach 2008; Panula et al. 2015; Schlicker and Kathmann 2016). Esta histamina liberada activaría posteriormente H₁R postsinápticos, localizados en las distintas áreas de proyección de las neuronas histaminérgicas, favoreciendo de esta manera la activación de neuronas del sistema dopaminérgico, serotoninérgico y noradrenérgico (Brown et al. 2002; Flik et al. 2015; Korotkova et al. 2005). Y en segundo lugar, la acción del fármaco sobre heterorreceptores H₃ presinápticos localizados en la terminales de las neuronas monoaminérgicas, que al revertir la actividad constitutiva del H₃R y bloquear la inhibición que en condiciones fisiológicas se mantiene sobre la liberación del neurotransmisor, favorece una mayor liberación de 5-HT, NA y DA (Fink et al. 1990; Flik et al. 2015; Ligneau, Landais, et al. 2007; Medhurst et al. 2007; Munzar et al. 2004; Southam et al. 2009), todo esto específicamente en las áreas de proyección en las que convergen el sistema histaminérgico y los otros sistemas, como el locus coeruleus, el núcleo dorsal del rafe, el área tegmental ventral, la corteza prefrontal y la amígdala.

Estos resultados deben ser tomados con reserva, ya que es necesario evaluar el efecto *per se* de las neurotoxinas, sobre la actividad locomotora. Evidencias previas señalan que el pre tratamiento con las neurotoxinas DSP4 y 6-OHDA, no modifican la actividad locomotora (Ku et al. 2012; Santiago et al. 2014, 2015; Vega-Rivera, López-Rubalcava, and Estrada-Camarena 2013; Yan et al. 2016), aunque en esos

trabajos los animales, las vías de administración y las dosis de las neurotoxinas, son diferentes a lo que utilizamos en nuestro trabajo. También será importante evaluar el efecto *per se* de las neurotoxinas, sobre la concentración tisular de 5-HT, NA y DA en los distintos grupos experimentales, y de esta manera determinar el daño selectivo de cada uno de los sistemas de neurotransmisión.

6.4 El modelo de estrés crónico por derrota social en ratones adolescentes macho SW, induce comportamientos tipo depresión

El bullying, la subordinación y la elevada competencia, son estresores sociales etiológicamente relevantes para el desarrollo de psicopatologías y además, son altamente prevalentes entre los adolescentes (Gilbert et al. 2009; Xu et al. 2016). En roedores, el estrés crónico por derrota social, trata de reflejar tales situaciones estresantes (Xu et al. 2016). Es un modelo útil para estudiar el desarrollo de comportamientos tipo depresión durante la adolescencia, que induce cambios conductuales y neurobiológicos duraderos, que pueden persistir hasta la vida adulta (Berton et al. 2006; Buwalda et al. 2011; Hammels et al. 2015; Hollis and Kabbaj 2014; Iñiguez et al. 2014; McCormick and Green 2013; Xu et al. 2016). Estos comportamientos tipo depresión (endofenotipos) son el aislamiento social, la desesperanza, la anhedonia y alteraciones en el peso corporal (Buwalda et al. 2011; Iñiguez et al. 2014, 2016; McCormick and Green 2013). En este trabajo utilizamos el modelo de ECDS en ratones adolescentes macho de la cepa Swiss Webster, durante quince días consecutivos (DP28-43). Nuestros resultados indican que el ECDS fue capaz de inducir comportamientos tipo depresión, caracterizados por un incremento en el aislamiento social (en la prueba de interacción social), aumento en la conducta tipo desesperanza (en la prueba de nado forzado) y disminución en el peso corporal.

Al realizar la prueba de interacción social, el 83% de los ratones adolescentes derrotados desarrollaron la conducta de evitación social, mientras que el 17% restante fue resiliente al desarrollo de esta conducta. Nuestro porcentaje de susceptibilidad es mayor a lo reportado en trabajos previos (55-62%), en donde se utilizan ratones de la cepa C57BL/6 (Golden et al. 2011; Jianhua et al. 2017; Qiao et al. 2016). Nuestros datos sugieren que la cepa SW parece ser más susceptible al desarrollo de la conducta de aislamiento social, que la cepa C57BL/6. El desarrollo

de la conducta de aislamiento social en ratones sometidos al modelo de ECDS, ya ha sido reportado previamente en ratones adultos (Berton et al. 2006; Golden et al. 2011; Krishnan et al. 2007), así como en ratones adolescentes (G.-B. Huang, Zhao, and Muna 2013; Iñiguez et al. 2014, 2016), en todos estos casos se utilizó la cepa C57BL/6 como ratón de estudio. Es importante señalar que en esos casos se utilizaron ratones de la cepa CD1 como agresores y como ratones diana en la prueba de interacción social, el tiempo de exposición al ECDS en estos trabajos fue de 10 días. En nuestro trabajo todos los ratones utilizados (experimentales, agresores y ratones diana) fueron de la misma cepa (SW). Estudios previos demuestran que los ratones C57BL/6 derrotados, no desarrollan la conducta de aislamiento social, cuando se utiliza como ratón diana a un ratón de la misma cepa (Hammels et al. 2015). Por esta razón, una ventaja de nuestro trabajo es que el aislamiento social se desarrolló hacia un individuo de la misma cepa, lo que agrega mayor valor al estudio del comportamiento social (Hammels et al. 2015), confiriendo mayor validez al modelo de estrés crónico por derrota social.

En este trabajo, los ratones adolescentes expuestos al ECDS que desarrollaron la conducta de aislamiento social también presentaron mayor conducta de inmovilidad y menor conducta de nado durante la prueba de nado forzado comparándolos con el grupo control (Fig. 35). Estos resultados coinciden con datos reportados en ratones adultos de la cepas C57BL/6 y NMRI, expuestos a 14 y 21 días de ECDS, respectivamente (Keeney et al. 2006; Lehmann and Herkenham 2011) y con datos reportados en ratones adolescentes de la cepa C57BL/6 expuestos a 10 días de ECDS (G.-B. Huang, Zhao, and Muna 2013; Iñiguez et al. 2014). Otros estudios en los que se utilizaron ratas como sujetos experimentales, también reportaron que la exposición al ECDS induce un aumento en el tiempo de inmovilidad, durante la prueba de nado forzado (Becker et al. 2008; Hayashida et al. 2010; Hollis and Kabbaj 2014; Rygula et al. 2005), aunque en estos trabajos la exposición al ECDS fue mayor a 28 días.

Cabe mencionar que existen dos trabajos, que no reportan cambios en la conducta de inmovilidad ni en la prueba de nado forzado, ni en la prueba de suspensión de la cola (Kinsey et al. 2007; Krishnan et al. 2007), utilizando ratones adultos C57BL/6 y con un tiempo de exposición al ECDS de 6-10 días. Consideramos que este periodo de exposición breve, y el hecho de que los ratones adultos son menos

susceptibles a los efectos del estrés (Eiland and Romeo 2013) podrían explicar la ausencia de efectos. En nuestro trabajo la exposición durante 15 días al ECDS fue suficiente para incrementar significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

Por último, en cuanto al peso corporal la mayoría de los trabajos reportan una disminución y/o una menor ganancia de peso, en los ratones expuestos al ECDS, durante los días de exposición y al término de los mismos (Chaouloff 2013; Iñiguez et al. 2014, 2016; Jianhua et al. 2017; Krishnan et al. 2007; Venzala et al. 2013). En este trabajo observamos que los adolescentes expuestos al ECDS presentaron una menor ganancia de que el grupo control. Esta disminución fue evidente a partir del quinto día de exposición y se mantuvo hasta finalizar el protocolo de ECDS.

Con todo lo anterior, podemos decir que el modelo de estrés crónico por derrota social, en ratones adolescentes macho de la cepa SW mimetiza algunos de los síntomas centrales de la depresión, como el aislamiento social, la desesperanza y las fluctuaciones en el peso corporal (American Psychiatric Association 2013). Concluyendo que es un modelo animal útil, para estudiar la neurobiología de la depresión en ratones adolescentes, así como para la selección y prueba de fármacos útiles en el tratamiento de la misma. Además encontramos dos ventajas, la primera le confiere mayor validez al modelo de ECDS ya que se desarrolló la conducta de aislamiento social hacia un individuo de la misma cepa; y la segunda es con respecto al cuidado y manejo de los animales de laboratorio, ya que aparentemente los ratones adolescentes de la cepa SW son más susceptibles que los ratones de la cepa C57BL/6 al desarrollo de la conducta de aislamiento social, lo que representaría el uso de un menor número de animales al realizar el protocolo de ECDS con los beneficios que esto representa.

Estudios futuros deben estar dirigidos a estandarizar de mejor manera el modelo de ECDS, teniendo dos objetivos. El primero es tratar de disminuir al mínimo necesario, el tiempo y la cantidad de ataques recibidos por los ratones adolescentes. Una vez logrado lo anterior, el segundo objetivo sería determinar si las conductas tipo depresión son capaces de persistir hasta la vida adulta del ratón. Otro factor a tomar en cuenta al momento de medir el desarrollo de la conducta de desesperanza, es el efecto de la disminución en la ganancia de peso corporal sobre los resultados

en las conductas durante la prueba de nado forzado. Bogdanova et al, sugieren que en ratas el peso corporal es un factor importante a tomar en cuenta durante la prueba de nado forzado, aunque no especifican en que forma el menor o mayor peso corporal podrían afectar los resultados en esta prueba (Bogdanova et al. 2013). En ratones serían necesarios más estudios para poder descartar que la mayor conducta de desesperanza, en los ratones sometidos al ECDS, sea un efecto *per se* de la menor ganancia de peso corporal.

6.5 En un tratamiento agudo, el agonista inverso del H₃R no revierte la conducta de aislamiento social, pero si logro revertir la conducta de desesperanza, en ratones adolescentes expuestos al modelo de ECDS

Planteamos que el agonista inverso del H₃R (clobenpropit), que demostró tener propiedades antidepresivas en el modelo de nado forzado (que usa estrés físico y psicológico de forma aguda) podría también ser útil en la remisión de las conductas de aislamiento social y desesperanza, inducidas por el estrés crónico por derrota social (que usa estrés físico y psicológico de manera crónica).

Para probar esto, ratones adolescentes macho expuestos al ECDS fueron tratados con una dosis única de clobenpropit (DP46). Al realizar la prueba de interacción social encontramos que el tratamiento con clobenpropit no fue útil para revertir la conducta de aislamiento social (sólo revirtió la conducta en uno de los nueve ratones tratados). Trabajos previos reportan que en ratón, sólo el tratamiento crónico durante 28 días con imipramina y/o fluoxetina, produce la remisión de la conducta de aislamiento social (Berton et al. 2006; Tsankova et al. 2006), por lo que es posible que también sea necesario un tratamiento crónico con clobenpropit para observar efectos antidepresivos en el modelo de ECDS.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que una dosis única de clobenpropit redujo la conducta tipo depresión en los ratones sometidos al ECDS. El trabajo de Rygula, reportó que únicamente el tratamiento crónico por 28 días con citalopram, revierte la conducta de desesperanza en ratas que fueron expuestas al ECDS (Rygula et al. 2006); otro trabajo documentó que el enriquecimiento ambiental durante 21 días, previo al inicio del ECDS, confiere resiliencia para el desarrollo de las conductas de aislamiento social y desesperanza, en ratones adultos de la cepa C57BL/6 (Lehmann and Herkenham 2011). Nuestros resultados son el primer

trabajo en documentar, que un agonista inverso del H₃R en dosis única, es capaz de revertir la conducta de desesperanza inducida por el ECDS, en ratones adolescentes macho de la cepa SW.

Resulta complicado formular una posible explicación a dos resultados contradictorios, la remisión de la conducta de desesperanza y la falta de remisión de la conducta de aislamiento social, con una sola dosis de clobenpropit en ratones sometidos al ECDS. Futuros trabajos que evalúen el efecto de un tratamiento crónico o sub-crónico con un agonista inverso del H₃R sobre la conducta de aislamiento social deberán ser realizados, poniendo especial atención en el rol de la corteza prefrontal en la mediación de los efectos antidepresivos de estos compuestos. En este trabajo el agonista inverso del H₃R clobenpropit incremento la concentración extracelular de 5-HT, NA y DA en la corteza pre frontal de ratones adolescentes macho púberes; proponemos que el incremento de estas monoaminas indique una mayor actividad neuronal en esta región y que esta mayor actividad neuronal pudiera estar relacionada con el efecto antidepresivo del agonista inverso del H₃R. Es evidente que al plantear esta hipótesis, surgen más preguntas que respuestas. Por lo tanto, futuros trabajos deben ser dirigidos a responder estas interrogantes.

7. Conclusiones

Los ratones adolescentes macho púberes de la cepa SW presentan de manera natural una conducta tipo depresión (desesperanza) mayor comparado con ratones pre y pos-púberes. Por lo tanto, son individuos útiles para el estudio de la depresión en la población adolescente.

El clobenpropit (agonista inverso del H₃R) presentó un efecto tipo antidepresivo en el modelo de nado forzado, en ratones adolescentes macho púberes de la cepa SW e incremento las conductas de nado y de escalamiento, conductas mediadas por el sistema serotoninérgico y los sistemas noradrenérgico/dopaminérgico, respectivamente. El clobenpropit no afectó la actividad locomotora de los ratones.

La integridad de los sistemas monoaminérgicos es necesaria para el efecto tipo antidepresivo del clobenpropit. Es probable que este fármaco actué a dos niveles. Por un lado, a nivel de autorreceptores H₃, incrementando la síntesis y liberación de histamina de las terminales histaminérgicas, en regiones como el LC, DRN y

ATV. Esta histamina a través de H₁R's postsinápticos favorecería la activación de neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas. Por otro lado, a nivel de heterorreceptores H₃, incrementando la liberación de 5-HT, NA y DA en las terminales neurales correspondientes.

Los ratones adolescentes macho de la cepa SW son susceptibles a desarrollar conductas de aislamiento social y desesperanza, así como a presentar alteraciones en el peso corporal, secundarias a la exposición el modelo de estrés crónico por derrota social. Además la cepa SW parece ser más susceptible que la cepa C57BL/6 al desarrollo de la conducta de aislamiento social. Haber utilizado ratones de una misma cepa, le confiere mayor validez a el modelo de ECDS utilizado en este trabajo.

El tratamiento agudo con clobenpropit revirtió la conducta de desesperanza en ratones expuestos al ECDS, pero no revirtió la conducta de aislamiento social. Por lo tanto, el efecto de un tratamiento sub crónico y/o crónico sobre la conducta de aislamiento social debe ser evaluado. Además, el efecto tipo antidepresivo de los agonistas inversos del H₃R podría estar relacionado con una mejoría funcional en la corteza prefrontal, por lo que futuros estudios en esa dirección deben ser realizados.

8. Perspectivas

Realizar la misma metodología en ratones adolescentes hembra de la cepa SW.

Determinar el grado específico de interacción entre histamina y los sistemas monoaminérgicos, así como las regiones específicas en donde suceden estas interacciones. Logrando un mejor entendimiento de estos procesos, en primer lugar en condiciones fisiológicas y en segundo lugar en condiciones patológicas.

Realizar una curva dosis respuesta con el clobenpropit, determinar las dosis mínimas y máximas a las cuales se afecta la concentración tisular de 5-HT, NA y DA en PFC y determinar el comportamiento farmacológico del compuesto.

Determinar las concentraciones tisulares de 5-HT, NA y DA en los grupos pre tratados con las distintas neurotoxinas, para determinar la especificidad de las lesiones inducidas, así como evaluar el efecto de las neurotoxinas sobre la actividad locomotora.

Estandarizar en el protocolo de estrés crónico por derrota social, para garantizar el desarrollo de las conductas tipo depresión, disminuyendo en la medida de lo posible los días de exposición, el número de ataques y la duración de los mismos. Así como determinar si las conductas tipo depresión persisten hasta la vida adulta del ratón.

Analizar y evaluar cambios en la expresión y el funcionamiento del H₃R, durante la adolescencia (pre púber, púber y pos púber).

Determinar si la exposición al ECDS induce modificaciones en la expresión y/o funcionalidad del H₃R.

Evaluar el efecto de un tratamiento sub crónico y crónico con un agonista inverso del H₃R, sobre la conducta de aislamiento social en ratones adolescentes, realizando una curva dosis respuesta.

Analizar el efecto de los agonistas inversos del H₃R en pruebas que evalúen la funcionalidad de la corteza pre frontal, como un paradigma de flexibilidad cognitiva.

Analizar la posibilidad de realizar un ensayo clínico con Pitolisant® en adolescentes o adultos con depresión. Pitolisant® es el único agonista inverso del H₃R, disponible únicamente en la unión europea y autorizado para el tratamiento de la narcolepsia.

9. Bibliografía

- Akhtar, Mohd, K K Pillai, and Divya Vohora. 2005. "Effect of Thioperamide on Modified Forced Swimming Test-Induced Oxidative Stress in Mice." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 97: 218–21.
- American Psychiatric Association. 2013. *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed.
- Andersen, Susan L. 2003. "Trajectories of Brain Development : Point of Vulnerability or Window of Opportunity ?" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27: 3–18.
- Aquino-Miranda, Guillermo, and Jose Antonio Arias-Montaña. 2012. "Neuromodulación E Histamina : Regulación de La Liberación de Neurotransmisores Por Receptores H 3." *Salud Mental* 35(4): 345–52.
- Arrang, Jean-Michel, Monique Garbarg, and Jean-Charles Schwartz. 1983. "Auto-Inhibition of Brain Histamine Release Mediated by a Novel Class (H₃) of Histamine Receptor." *Nature* 302: 832–37.
- Arrang, Jean-Michel, Séverine Morisset, and Florence Gbahou. 2007.

- “Constitutive Activity of the Histamine H3 Receptor.” *Trends in Pharmacological Sciences* 28(7): 350–57.
- Bahi, Amine, Johannes Stephan Schwed, and Miriam Walter. 2014. “Anxiolytic and Antidepressant-like Activities of the Novel and Potent Non-Imidazole Histamine H 3 Receptor Antagonist ST-1283.” *Drug Design, Development and Therapy* 8: 627–37.
- Becker, Cx et al. 2008. “Repeated Social Defeat-Induced Depression-like Behavioral and Biological Alterations in Rats: Involvement of Cholecystokinin.” *Molecular Psychiatry* 13: 1079–92.
- Berton, Olivier et al. 2006. “Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress.” *Science* 311: 864–68.
- Bhagwagar, Z et al. 2004. “Persistent Reduction in Brain Serotonin 1A Receptor Binding in Recovered Depressed Men Measured by Positron Emission Tomography with [11 C] WAY-100635.” *Molecular Psychiatry* 8: 386–92.
- Birmaher, Boris, and David A Brent. 2007. “Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Depressive Disorders.” *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 46(11): 1503–26.
- Bogdanova, Olena V, Shami Kanekar, Kristen E D’Anci, and Perry F Renshaw. 2013. “Factors Influencing Behavior in the Forced Swim Test.” *Physiology & Behavior* 118: 227–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012>.
- Bongers, Gerold, Remko A Bakker, and Rob Leurs. 2007. “Molecular Aspects of the Histamine H 3 Receptor.” *Biochemical Pharmacology* 73: 1195–1204.
- Bremner, J Douglas et al. 2000. “Hippocampal Volume Reduction in Major Depression.” *Am J Psychiatry* 157(January): 115–17.
- Brown, Ritchie E, Olga A Sergeeva, Krister S Eriksson, and Helmut L Haas. 2002. “Convergent Excitation of Dorsal Raphe Serotonin Neurons by Multiple Arousal Systems (Orexin/Hypocretin, Histamine and Noradrenaline).” *The Journal of Neuroscience* 22(20): 8850–59.
- Burghy, Cory A et al. 2012. “Developmental Pathways to Amygdala-Prefrontal Function and Internalizing Symptoms in Adolescence.” *Nature Neuroscience* 15(12): 1736–42.
- Buwalda, Bauke, Moniek Geerdink, Jose Vidal, and Jaap M Koolhaas. 2011. “Social Behavior and Social Stress in Adolescence: A Focus on Animal Models.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(8): 1713–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.004>.
- Di Carlo, Giovanni, Piera Ghi, and Marco Orsetti. 2000. “Effect of R- α -Methylhistamine and Thioperamide on in Vivo Release of Norepinephrine in the Rat Hippocampus.” *Prog. Neuro.Psychopharmacol & Biol. Psych* (1983): 275–84.
- Chaouloff, Francis. 2013. “Social Stress Models in Depression Research: What Do They Tell Us ?” *Cell Tissue Research*.

- Connolly, Colm G et al. 2017. "Resting-State Functional Connectivity of the Amygdala and Longitudinal Changes in Depression Severity in Adolescent Depression." *Journal of Affective Disorders* 207(June 2016): 86–94.
- Costello, E Jane, Alaattin Erkanli, and Adrian Angold. 2006. "Is There an Epidemic of Child or Adolescent Depression?" *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 12(47): 1263–71.
- Cryan, John F, Rita J Valentino, and Irwin Lucki. 2005. "Assessing Substrates Underlying the Behavioral Effects of Antidepressants Using the Modified Rat Forced Swimming Test." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 547–69.
- Cullen, Kathryn, Bonnie Klimes-dougan, Sanjiv Kumra, and S Charles Schulz. 2009. "Paediatric Major Depressive Disorder: Neurobiology and Implications for Early Intervention." *Early Intervention in Psychiatry* 3: 178–88.
- Czéh, Boldizsár, Eberhard Fuchs, Ove Wiborg, and Mária Simon. 2016. "Animal Models of Major Depression and Their Clinical Implications." *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 64: 293–310.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>.
- Dere, E et al. 2010. "Neuronal Histamine and the Interplay of Memory , Reinforcement and Emotions." *Behavioural Brain Research* 215(2): 209–20.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.045>.
- Detke, Michael J, and Irwin Lucki. 1996. "Detection of Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants in the Rat Forced Swimming Test : The Effects of Water Depth." *Behavioural Brain Research* 73: 43–46.
- Detke, Michael J, Michael Rickels, and Irwin Lucki. 1995. "Active Behaviors in the Rat Forced Swimming Test Differentially Produced by Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants." *Psychopharmacology* 121: 66–72.
- Duman, Ronald S. 2014. "Neurobiology of Stress, Depression, and Rapid Acting Antidepressants: Remodeling Synaptic Connections." *Depression and Anxiety* 31: 291–96.
- Eiland, L, and R D Romeo. 2013. "Stress and the Developing Adolescent Brain." *Neuroscience* 249: 162–71.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.048>.
- Ellenbroek, Bart A, and Bibinaz Ghiabi. 2014. "The Other Side of the Histamine H3 Receptor." *Trends in Neurosciences/* 37(4): 191–99.
- Eriksson, Krister S, Olga Sergeeva, Ritchie E Brown, and Helmut L Haas. 2001. "Orexin / Hypocretin Excites the Histaminergic Neurons of the Tuberomammillary Nucleus." *The Journal of Neuroscience* 21(23): 9273–79.
- Eriksson, Krister S, David R Stevens, and Helmut L Haas. 2001. "Serotonin Excites Tuberomammillary Neurons by Activation of Na/Ca-Exchange." *Neuropharmacology* 40: 345–51.
- Esbenshade, T A et al. 2008. "The Histamine H 3 Receptor : An Attractive Target for the Treatment of Cognitive Disorders." *British Journal of Pharmacology*

154: 1166–81.

- Femenía, Teresa, Salvatore Magara, Caitlin M Dupont, and Maria Lindskog. 2015. “Hippocampal-Dependent Antidepressant Action of the H₃ Receptor Antagonist Clobenpropit in a Rat Model of Depression.” *International Journal of Neuropsychopharmacology*: 1–11.
- Ferrari, F, and R F Villa. 2016. “The Neurobiology of Depression : An Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence.” *Molecular Neurobiology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0032-y>.
- Fink, K, Eberhard Schlicker, A Neise, and M Göthert. 1990. “Involvement of Presynaptic H₃ Receptors in the Inhibitory Effect of Histamine on Serotonin Release in the Rat Brain Cortex.” *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol* 1989: 513–19.
- Flik, Gunnar et al. 2015. “Interaction Between Brain Histamine and Serotonin, Norepinephrine and Dopamine Systems: In Vivo Microdialysis and Electrophysiology Study.” *J Mol Neurosci* 56: 320–28.
- Fritschy, J, and R Grzanna. 1991. “Selective Effects of DSP-4 on Locus Coeruleus Axons: Are There Pharmacologically Different Types of Noradrenergic Axons in the Central Nervous System ?” *Progress in Brain Research* 88(1966): 257–68.
- Galosi, R et al. 2001. “Dopaminergic Effects of Histamine Administration in the Nucleus Accumbens and the Impact of H₁-Receptor Blockade.” *Neuropharmacology* 40: 624–33.
- Gao, Zhongli et al. 2013. “Identification and Profiling of 3 , 5-Dimethyl-Isoxazole-4-Carboxylic Amide as Histamine H₃ Receptor Antagonist for the Treatment of Depression.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23: 6269–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.081>.
- Gilbert, Paul et al. 2009. “The Dark Side of Competition: How Competitive Behaviour and Striving to Avoid Inferiority Are Linked to Depression , Anxiety , Stress and Self-Harm.” *The British Psychological Society* 82: 123–36.
- Golden, Sam A, Herbert E Covington Iii, Olivier Berton, and Scott J Russo. 2011. “A Standardized Protocol for Repeated Social Defeat Stress in Mice.” *Nature Protocols* 6(8): 1183–91. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.361>.
- Goyens, Jacqueline, and Eliane Notrot. 1975. “Effects of Cohabitation with Females on Aggressive Behavior Between Male Mice.” *Developmental Psychobiology* 8(April 1974): 79–84.
- Guiard, Bruno P, Mostafa El Mansari, Zul Merali, and Pierre Blier. 2008. “Functional Interactions between Dopamine , Serotonin and Norepinephrine Neurons : An in-Vivo Electrophysiological Study in Rats with Monoaminergic Lesions.” *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11: 625–39.
- Haas, Helmut L, Olga A Sergeeva, and Oliver Selbach. 2008. “Histamine in the Nervous System.” *Physiol Rev* 88: 1183–1241.

- Haas, Helmut, and Pertti Panula. 2003. "The Role of Histamine and the Tuberomammillary Nucleus in the Nervous System." *Nature Reviews* 4(February): 121–30.
- Haley, T J, and W G McCormick. 1957. "Pharmacological Effects Produced by Intra-Cerebral Injection of Drugs in the Conscious Mouse." *Brit. J. Pharmacol.* 12: 12–15.
- Hammels, Caroline et al. 2015. "Defeat Stress in Rodents : From Behavior to Molecules." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 59: 111–40.
- Hasler, Gregor, Wayne C Drevets, Hussein K Manji, and Dennis S Charney. 2004. "Discovering Endophenotypes for Major Depression." *Neuropsychopharmacology* 29: 1765–81.
- Hayashida, Sota, Takakazu Oka, Takashi Mera, and Sadatoshi Tsuji. 2010. "Repeated Social Defeat Stress Induces Chronic Hyperthermia in Rats." *Physiology & Behavior* 101(1): 124–31.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.027>.
- Heathcote, D, J Robertson, and D Henry. 1995. "Efficacy of Tricyclic Drugs in Treating Child and Adolescent Depression : A Meta-Analysis." *BMJ* 310(April): 897–901.
- Hefner, Kathryn, and Andrew Holmes. 2007. "Ontogeny of Fear-, Anxiety- and Depression-Related Behavior across Adolescence in C57BL/6J Mice." *Behavioural Brain Research* 176: 210–15.
- Hernández, Humberto Cruzblanca, Patricia Lupercio Coronel, Jorge Collas Aguilar, and Elena Castro Rodríguez. 2016. "Neurobiología de La Depresión Mayor Y de Su Tratamiento Farmacológico." *Salud Mental* 39(1): 47–58.
- Holder, Mary K, and Jeffrey D Blaustein. 2014. "Puberty and Adolescence as a Time of Vulnerability to Stressors That Alter Neurobehavioral Processes." *Frontiers in Neuroendocrinology* 35(1): 89–110.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.004>.
- Hollis, Fiona, and Mohamed Kabbaj. 2014. "Social Defeat as an Animal Model for Depression." *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 55(2): 221–32.
- Holmes, Avram J. et al. 2013. "Amygdala-Medial Prefrontal Circuit Anatomy Predicts Negative Affect, Social Functioning, and Polygenic Depression Risk in Healthy Young Adults." *Biological Psychiatry* 73: 141S.
- Huang, Guang-Biao, Tong Zhao, and Sushma Shrestha Muna. 2013. "Effects of Chronic Social Defeat Stress on Behaviour, Endoplasmic Reticulum Proteins and Choline Acetyltransferase in Adolescent Mice." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16: 1635–47.
- Huang, Yu-wen, Wei-wei Hu, Zhong Chen, and Li-san Zhang. 2004. "Effect of the Histamine H3-Antagonist Clobenpropit on Spatial Memory Deficits Induced by MK-801 as Evaluated by Radial Maze in Sprague – Dawley Rats." *Behavioural Brain Research* 151: 287–93.
- Iñiguez, Sergio D et al. 2014. "Social Defeat Stress Induces a Depression-like

- Phenotype in Adolescent Male c57BL/6 Mice.” *Stress* 3890(3): 247–55.
- . 2016. “Social Defeat Stress Induces Depression-like Behavior and Alters Spine Morphology in the Hippocampus of Adolescent Male C57BL/6 Mice.” *Neurobiology of Stress* 5: 54–64.
- Ishizuka, Tomoko, Kouta Hatano, Tomotaka Murotani, and Atsushi Yamatodani. 2008. “Comparison of the Effect of an H3 Inverse Agonist on Energy Intake and Hypothalamic Histamine Release in Normal Mice and Leptin Resistant Mice with High Fat Diet-Induced Obesity.” *Behavioural Brain Research* 188: 250–54.
- Ito, Chihiro et al. 1999. “Effects of the Acute and Chronic Restraint Stresses on the Central Histaminergic Neuron System of Fischer Rat.” *Neuroscience Letters* 262: 143–45.
- Jalbrzikowski, Maria et al. 2017. “Development of White Matter Microstructure and Intrinsic Functional Connectivity Between the Amygdala and Ventromedial Prefrontal Cortex : Associations With Anxiety and Depression.” *Biological Psychiatry*: 1–11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.01.008>.
- Jeon, Sang Won, and Yong-ku Kim. 2016. “Molecular Neurobiology and Promising New Treatment in Depression.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(381).
- Jianhua, Fan, Wei Wei, Liao Xiaomei, and Wang Shao-hui. 2017. “Chronic Social Defeat Stress Leads to Changes of Behaviour and Memory-Associated Proteins of Young Mice.” *Behavioural Brain Research* 316: 136–44.
- Kano, Michiko et al. 2004. “Decreased Histamine H 1 Receptor Binding in the Brain of Depressed Patients.” *European Journal of Neuroscience* 20(December 2003): 803–10.
- Keeney, A et al. 2006. “Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Stress on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Hippocampal Serotonin Release in Mice.” *Journal of Neuroendocrinology* 18(13): 330–38.
- Kinsey, Steven G et al. 2007. “Repeated Social Defeat Causes Increased Anxiety-like Behavior and Alters Splenocyte Function in C57BL / 6 and CD-1 Mice.” *Brain, Behavior, and Immunity* 21: 458–66.
- Kjaer, Andreas, Ulrich Knigge, Flemming W Bach, and Jorgen Warberg. 1992. “Histamine-and Stress-Induced Secretion of ACTH and B-Endorphin: Involvement of Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopresin.” *Neuroendocrinology* 56: 419–28.
- Klimek, Violetta et al. 1997. “Reduced Levels of Norepinephrine Transporters in the Locus Coeruleus in Major Depression.” *The Journal of Neuroscience* 17(21): 8451–58.
- Kloet, E Ron De, Marian Joëls, and Florian Holsboer. 2005. “Stress and the Brain: From Adaptation to Disease.” *Nature Reviews* 6(June): 463–75.
- Korotkova, Tatiana M, Olga A Sergeeva, Alexei A Ponomarenko, and Helmut L Haas. 2005. “Histamine Excites Noradrenergic Neurons in Locus Coeruleus

- in Rats.” *Neuropharmacology* 49: 129–34.
- Krishnan, Vaishnav et al. 2007. “Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions.” *Cell* 131: 391–404.
- Krishnan, Vaishnav, and Eric J Nestler. 2008. “The Molecular Neurobiology of Depression.” *Nature* 455(October).
- Ku, Yu-chi et al. 2012. “Different Involvement of Ventral and Dorsal Norepinephrine Pathways on Norepinephrine Reuptake Inhibitor-Induced Locomotion and Antidepressant-like Effects in Rats.” *Neuroscience Letters* 514(2): 179–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.088>.
- Lamberti, Claudia et al. 1998. “Antidepressant-like Effects of Endogenous Histamine and of Two Histamine H₁ Receptor Agonists in the Mouse Forced Swim Test.” *British Journal of Pharmacology* 123: 1331–36.
- Leff, Paul. 1995. “The Two-State Model of Receptor Activation.” *Trends in Pharmacology* 16(March).
- Lehmann, Michael L, and Miles Herkenham. 2011. “Environmental Enrichment Confers Stress Resiliency to Social Defeat through an Infralimbic Cortex-Dependent Neuroanatomical Pathway.” *The Journal of Neuroscience* 31(16): 6159–73.
- Lemondé, Sylvie et al. 2003. “Impaired Repression at a 5-Hydroxytryptamine 1A Receptor Gene Polymorphism Associated with Major Depression and Suicide.” *The Journal of Neuroscience*, 23(25): 8788–99.
- Leurs, Rob, Remko A Bakker, Henk Timmerman, and Iwan J P De Esch. 2005. “The Histamine H₃ Receptor: From Gene Cloning to H₃ Receptor Drugs.” *Nature Reviews Drug Discovery* 4(February): 107–20.
- Lewinsohn, Peter M et al. 2000. “Natural Course of Adolescent Major Depressive Disorder in a Community Sample : Predictors of Recurrence in Young Adults.” *American Journal of Psychiatry* 157(October): 1584–91.
- Ligneau, Xavier, D Perrin, et al. 2007. “BF2.649 [1-{3-[3-(4Chlorophenyl) Propoxy]propyl} Piperidine, Hydrochloride], a Nonimidazole Inverse Agonist/Antagonist at the Human Histamine H₃ Receptor: Preclinical Pharmacology.” *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 320(1): 365–75.
- Ligneau, Xavier, Laurent Landais, et al. 2007. “Brain Histamine and Schizophrenia: Potential Therapeutic Applications of H₃ -Receptor Inverse Agonists Studied with BF2.649.” *Biochemical Pharmacology* 73: 1215–24.
- López-Rubalcava, Carolina, Erika Estrada-Camarena, and Alonso Fernández-Guasti. 2003. “Antidepressant-Like Effect of Different Estrogenic Compounds in the Forced Swimming Test.” *Neuropsychopharmacology* 28: 830–38.
- Lovenberg, Timothy W et al. 1999. “Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H₃ Receptor.” *Molecular Pharmacology* 55: 1101–7.

- Lupien, Sonia J, Bruce S McEwen, Megan R Gunnar, and Christine Heim. 2009. "Effects of Stress throughout the Lifespan on the Brain , Behaviour and Cognition T I R." *Nature Reviews* 10: 434–45.
- Mahdy, Amr M, and Nigel R Webster. 2017. "Histamine and Antihistamines." *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 18(4): 210–15.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.01.007>.
- Marcus, Marina, M. Taghi Yasami, Mark van Ommeren, and Dan Chisholm. 2012. "Depression: A Global Public Health Concern." *World Federation for Mental Health*: 6–8.
- Mason, N S, and A H Schene. 2007. "Mood Is Indirectly Related to Serotonin , Norepinephrine and Dopamine Levels in Humans : A Meta-Analysis of Monoamine Depletion Studies." *Molecular Psychiatry* 12: 331–59.
- McClintock, Shawn M et al. 2011. "Residual Symptoms in Depressed Outpatients Who Respond by 50 % But Do Not Remit to Antidepressant Medication." *31*(2): 180–86.
- McCormick, C. M., and M. R. Green. 2013. "From the Stressed Adolescent to the Anxious and Depressed Adult: Investigations in Rodent Models." *Neuroscience* 249: 242–57.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.063>.
- Mccormick, C.M, and I.Z Mathews. 2007. "HPA Function in Adolescence: Role of Sex Hormones in Its Regulation and the Enduring Consequences of Exposure to Stressors." *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 86: 220–33.
- McEwen, Bruce S. 2011. "The Ever-Changing Brain : Cellular and Molecular Mechanisms for the Effects of Stressful Experiences." *Developmental Neurobiology* (July): 878–90.
- Medhurst, Andrew D et al. 2007. "GSK189254, a Novel H₃ Receptor Antagonist That Binds to Histamine H₃ Receptors in Alzheimer ' S Disease Brain and Improves Cognitive Performance in Preclinical Models." *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 321(3): 1032–45.
- Ménard, C, G E Hodes, and S J Russo. 2016. "Pathogenesis of Depression: Insights from Human." *Neuroscience* 321: 138–62.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.053>.
- Meyer, Jeffrey H, Nathalie Ginovart, Anahita Boovariwala, and Sandra Sagrati. 2006. "Elevated Monoamine Oxidase A Levels in the Brain." *Arch Gen Psychiatry* 63: 1209–16.
- Miyazakia, Shuichi, Kenji Onodera, Masahiro Imaizumi, and Hendrik Timmerman. 1997. "Effects of Clobenpropit (VUF-9153), a Histamine H₃ Receptor Antagonist, on Learning and Memory, and on Cholinergic and Monoaminergic Systems in Mice." *Life Sciences* 61(4): 355–61.
- Moreno-Delgado, David et al. 2006. "Constitutive Activity of H₃ Autoreceptors Modulates Histamine Synthesis in Rat Brain through the cAMP/PKA Pathway." *Neuropharmacology* 51: 517–23.

- Morisset, Â et al. 2000. "High Constitutive Activity of Native H₃ Receptors Regulates Histamine Neurons in Brain." *Nature* 408(December): 7–11.
- Munzar, Patrik, Gianluigi Tanda, Zuzana Justinova, and Steven R Goldberg. 2004. "Histamine H₃ Receptor Antagonists Potentiate Methamphetamine Self-Administration and Methamphetamine-Induced Accumbal Dopamine Release." *Neuropsychopharmacology* (29): 705–17.
- Nestler, Eric J, and William A Carlezon. 2005. "The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression." *Biological Psychiatry* 59: 1151–59.
- Nieto-Alamilla, Gustavo et al. 2016. "The Histamine H₃ Receptor : Structure , Pharmacology , and Function." *Molecular Pharmacology* 90(November): 649–73.
- Ordway, Gregory A, Jane Schenk, Craig A Stockmeier, and Warren May. 2003. "Elevated Agonist Binding to α 2 -Adrenoceptors in the Locus Coeruleus in Major Depression." *Society of Biological Psychiatry* 53: 315–23.
- Páez-Pereda, Marcelo, and Gfinter K Stalla. 2005. "Hormones of the Pituitary." In *Handbook of Stress and the Brain*, , 67–77.
- Panula, Pertti et al. 2015. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors." *Pharmacol Rev* 67(March 2010): 601–55.
- Panula, Pertti, and Saara Nuutinen. 2013. "The Histaminergic Network in the Brain: Basic Organization and Role in Disease." *Nature Publishing Group* 14(7): 472–87. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3526>.
- Paus, Tomás, Matcheri Keshavan, and Jay N Giedd. 2008. "Why Do Many Psychiatric Disorders Emerge during Adolescence?" *Nature Reviews* 9: 947–57.
- Pérez-García, Carmen et al. 1999. "Effects of Histamine H₃ Receptor Ligands in Experimental Models of Anxiety and Depression." *Psychopharmacology* 142: 215–20.
- Porsolt, Roger D, Guy Anton, Nadine Blavet, and Maurice Jalfre. 1978. "Behavioural Despair in Rats: A New Model Sensitive to Antidepressant Treatments." *European Journal of Pharmacology* 47: 379–91.
- Porsolt, Roger D, Geneviève Brossard, Carine Hautbois, and Sylvain Roux. 2001. "Rodent Models of Depression : Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral." *Current Protocols in Neuroscience*.
- Price, Joseph L, and Wayne C Drevets. 2012. "Neural Circuits Underlying the Pathophysiology of Mood Disorders." *Trends in Cognitive Sciences* 16(1): 61–71.
- Qiao, Hui et al. 2016. "Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models." *Neural Plasticity*: 1–26.
- Rao, Uma et al. 2008. "Effects of Early and Recent Adverse Experiences on Adrenal Response to Psychosocial Stress in Depressed Adolescents." *Biological Psychiatry* 64: 521–26.

- Rénéric, Jean-Philippe, and Irwin Lucki. 1998. "Antidepressant Behavioral Effects by Dual Inhibition of Monoamine Reuptake in the Rat Forced Swimming Test." *Psychopharmacology* 136: 190–97.
- Richardson, Laura P, and Rachel Katzenellenbogen. 2005. "Childhood and Adolescent Depression: The Role of Primary Care Providers in Diagnosis and Treatment." *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 35(January): 6–24.
- Ross, Svante B, and Carina Stenfors. 2014. "DSP4 , a Selective Neurotoxin for the Locus Coeruleus Noradrenergic System . A Review of Its Mode of Action." *Neurotox Res* (Junio).
- Rygula, Rafal et al. 2005. "Anhedonia and Motivational Deficits in Rats : Impact of Chronic Social Stress." *Behavioural Brain Research* 162: 127–34.
- . 2006. "Citalopram Counteracts Depressive-like Symptoms Evoked by Chronic Social Stress in Rats." *Behavioural Pharmacology* 17(1): 19–29.
- Sadek, Bassem et al. 2016. "Histamine H3 Receptor as a Potential Target for Cognitive Symptoms in Neuropsychiatric Diseases." *Behavioural Brain Research* 312: 415–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.051>.
- Samuels, Benjamin A, and René Hen. 2011. "Neurogenesis and Affective Disorders." *European Journal of Neuroscience*, 33: 1152–59.
- Santiago, Ronise M et al. 2014. "Induction of Depressive-like Behavior by Intranigral 6-OHDA Is Directly Correlated with Deficits in Striatal Dopamine and Hippocampal Serotonin." *Behavioural Brain Research* 259: 70–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.035>.
- . 2015. "The Nonsteroidal an Antiinflammatory Drug Piroxicam Reverses the Onset of Depressive-like Behavior in 6-OHDA Animal Model of Parkinson´s Disease." *Neuroscience* 300: 246–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.030>.
- Schlicker, Eberhard, A Behling, G Liimmen, and M Göthert. 1992. "Histamine H3A Receptor-Mediated Inhibition of Noradrenaline Release in the Mouse Brain Cortex." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (345): 489–93.
- Schlicker, Eberhard, Roland Betz, and Manfred Göthert. 1988. "Histamine H3 Receptor-Mediated Inhibition of Serotonin Release in the Rat Brain Cortex." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1: 588–90.
- Schlicker, Eberhard, Klaus Fink, M Detzner, and Manfred Göthert. 1993. "Histamine Inhibits Dopamine Release in the Mouse Striatum via Presynaptic H3 Receptors." *J Neural Transm* (93): 1–10.
- Schlicker, Eberhard, Klaus Fink, Marc Hinterthaler, and G Manfred. 1989. "Inhibition of Noradrenaline Release in the Rat Brain Cortex via Presynaptic H3 Receptors." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (340): 633–38.
- Schlicker, Eberhard, and Markus Kathmann. 2016. "Role of the Histamine H 3 Receptor in the Central Nervous System." In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer International Publishing Switzerland.

- Schlicker, Eberhard, Sven Werthweina, and Josef Zentnerb. 1999. "Histamine H₃ Receptor-Mediated Inhibition of Noradrenaline Release in the Human Brain." *Fundam. Clin. Pharmacol* 13: 120–22.
- Schneider, Erich H, Detlef Neumann, and Roland Seifert. 2014. "Modulation of Behavior by the Histaminergic System : Lessons from H₁ R- and H₂ R-Deficient Mice." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 42: 252–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.009>.
- Schneider, Miriam. 2013. "Adolescence as a Vulnerable Period to Alter Rodent Behavior." *Cell Tissue Research* 354: 99–106.
- Schwartz, Jean-Charles. 2009. "The Third Histamine Receptor: From Discovery to Clinics, Long-Lasting Love Story at INSERM and Bioprojet." In *From Discovery to Clinics*, , 13–29.
- Shahid, Mohammad et al. 2009. "Histamine, Histamine Receptors, and Their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review." *The Open Immunology Journal* (2): 9–41.
- Shahid, Mohammad, Nancy Khardori, Rahat Ali Khan, and Trivendra Tripathi. 2010. "Biological and Pharmacological Aspects of Histamine Receptors and Their Ligands." In *Biomedical Aspects of Histamine*, Springer, 61–100.
- Shan, Ling, Ai-min Bao, and Dick F Swaab. 2015. "The Human Histaminergic System in Neuropsychiatric Disorders." *Trends in Neurosciences* 38(3): 167–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.008>.
- Shu, Yu, and Tonghui Xu. 2017. "Chronic Social Defeat Stress Modulates Dendritic Spines Structural Plasticity in Adult Mouse Frontal Association Cortex." *Neural Plasticity*: 1–13.
- Sinhababu, Achintya K, and Ronald T Borchardt. 1988. "Molecular Mechanism of Biological Action of the Serotonergic Neurotoxin 5,7-Dihydroxytryptamine." *Neurochem. Int* 12(3): 273–84.
- Sisk, Cheryl L, and Douglas L Foster. 2004. "The Neural Basis of Puberty and Adolescence." *Nature Neuroscience* 7(10): 1040–47.
- Southam, Eric et al. 2009. "Preclinical Investigations into the Antipsychotic Potential of the Novel Histamine H₃ Receptor Antagonist GSK207040." *Psychopharmacology* (201): 483–94.
- Southan, C et al. 2016. "The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: Towards Curated Quantitative Interactions between 1300 Protein Targets and 6000 Ligands." *Nucl Acids Res*. <http://www.guidetopharmacology.org/>.
- Steckler, Thomas. 2005. "The Neuropsychology of Stress." In *Handbook of Stress and the Brain*, Elsevier Masson SAS, 25–42.
- Stevens, David R et al. 2004. "α₂ -Adrenergic Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of GABAergic IPSPs in Rat Histaminergic Neurons." *Neuropharmacology* 46: 1018–22.
- Thapar, Anita, Stephan Collishaw, Daniel S Pine, and Ajay K Thapar. 2012.

- “Depression in Adolescence.” *Lancet* 379(9829): 1056–67.
- Threlfell, Sarah et al. 2004. “Histamine H3 Receptors Inhibit Serotonin Release in Substantia Nigra Pars Reticulata.” *The Journal of Neuroscience* 24(40): 8704–10.
- Timm, Jörg et al. 1998. “H2 Receptor-Mediated Facilitation and H3 Receptor-Mediated Inhibition of Noradrenaline Release in the Guinea-Pig Brain.” *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*: 232–39.
- Tottenham, Nim, and Adriana Galván. 2016. “Stress and the Adolescent Brain Amygdala-Prefrontal Cortex Circuitry and Ventral Striatum as Developmental Targets.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 70: 217–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.030>.
- Tsankova, Nadia M et al. 2006. “Sustained Hippocampal Chromatin Regulation in a Mouse Model of Depression and Antidepressant Action.” *Nature Neuroscience* 9(4): 519–26.
- Vega-Rivera, Nelly Maritza, Carolina López-Rubalcava, and Erika Estrada-Camarena. 2013. “The Antidepressant-like Effect of Ethynyl Estradiol Is Mediated by Both Serotonergic and Noradrenergic.” *Neuroscience* 250: 102–11.
- Venzala, E, A L García-García, N Elizalde, and R M Tordera. 2013. “Social vs Environmental Stress Models of Depression from a Behavioural and Neurochemical Approach.” *European Neuropsychopharmacology* 23: 697–708.
- Vogel, G.W, A. Buffenstein, and K. Minter. 1990. “Drug Effects on REM Sleep and on Endogenous Depression.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 14(242): 49–63.
- Walker, Elaine F, Zainab Sabuwalla, and Rebecca Huot. 2004. “Pubertal Neuromaturation , Stress Sensitivity , and Psychopathology.” *Development and Psychopathology* 16: 807–24.
- Willner, P, and P J Mitchell. 2002. “The Validity of Animal Models of Predisposition to Depression.” *Behavioural Pharmacology* 13(3): 169–88.
- Xu, Hang et al. 2016. “Effects of Duloxetine Treatment on Cognitive Flexibility and BDNF Expression in the mPFC of Adult Male Mice Exposed to Social Stress during Adolescence.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9(October): 1–12.
- Xue, Xue, and Jin-Song Bian. 2015. 554 Methods in enzymology *Neuroprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Parkinson’s Disease Animal Models: Methods and Protocols*. 1st ed. Elsevier Inc. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687914000809>.
- Yan, Tingxu et al. 2016. “The Effect of Schisandra Chinensis Extracts on Depression by Noradrenergic, Dopaminergic, GABAergic and Glutamatergic Systems in the Forced Swim Test in Mice.” *Food & Function* 7: 2811–19. <http://dx.doi.org/10.1039/c6fo00328a>.
- Zhang, Xiaodong et al. 2005. “Loss-of-Function Mutation in Tryptophan

- Hydroxylase-2 Identified in Unipolar Major Depression.” *Neuron* 45: 11–16.
- Zhao, Tong et al. 2013. “Effects of Chronic Social Defeat Stress on Behavior and Choline Acetyltransferase, 78-kDa Glucose-Regulated Protein, and CCAAT/enhancer-Binding Protein (C/EBP) Homologous Protein in Adult Mice.” *Psychopharmacology* 228(2): 217–30.