



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA).

**Efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz en un modelo murino de depresión
inducido por estrés crónico impredecible.**

TESIS DE MAESTRIA QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN
CIENCIAS PRESENTA:

Biól. Meneses San Juan David)

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Ramírez Rodríguez. Gerardo Bernabé. Facultad de Psicología UNAM.

COMITÉ TUTORAL:

Dr. González Olvera Jorge Julio. (INPRFM).

Dr. Reyes Haro Daniel. Instituto nacional de Neurobiología (INB)

Ciudad de México a Septiembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

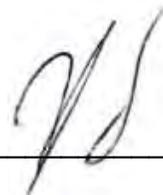
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Meneses San Juan David, cuyo título es: "Efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz en un modelo murino de depresión inducido por estrés crónico impredecible" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Sánchez Castillo Hugo

Firma



Secretario (Tutor)

Dr. Ramírez Rodríguez Gerardo Bernabé



Vocal

Dra. Vega Rivera Nelly Maritza



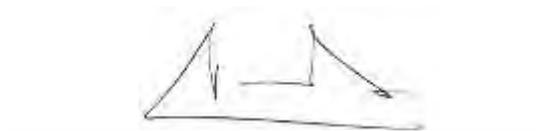
Suplente

Dr. Reyes Haro Daniel



Suplente

Dra. Ricardo Garcell Josefina



Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

INDICE.

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
AGRADECIMIENTOS	8
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1. DEPRESIÓN.....	10
1.1 <i>Síntomas y generalidades de la depresión.</i>	10
1.2 <i>Factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo de la depresión.</i>	11
1.3 <i>Estrés y depresión.</i>	11
1.4 <i>Modelos animales de depresión.</i>	12
1.5 <i>Tratamientos convencionales de la depresión.</i>	14
2. ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL (EMT).....	15
2.1 <i>Características y modalidades de la EMT.</i>	15
2.2 <i>EMTr como tratamiento antidepresivo.</i>	18
2.3 <i>Eficiencia de la EMTr a 5 Hz.</i>	19
2.4 <i>Efectos celulares y moleculares de la EMTr.</i>	20
3. INFLUENCIA DE LOS FACTORES GENÉTICOS EN EL EFECTO ANTIDEPRESIVO DE LA EMTR.....	21
3.1 <i>Polimorfismos asociados a la respuesta del tratamiento con EMTr en pacientes con depresión.</i>	21
3.2 <i>Influencia del fondo genético en la respuesta al tratamiento farmacológico en modelos murinos de depresión.</i>	22
II. JUSTIFICACIÓN.....	23
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
V. MATERIAL Y MÉTODO.....	25
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
2. ANIMALES.....	26
3. ESTRÉS CRÓNICO IMPREDECIBLE (ECI).....	27
4. ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL REPETITIVA (EMTR).....	28

5.	FÁRMACOS.....	30
6.	PRUEBAS CONDUCTUALES.	30
	6.1 Estado de pelaje (EP).....	32
	6.2 Rotarod.	32
	6.3 Acicalamiento artificial.	33
	6.4 Nado forzado.....	33
7.	ESTADÍSTICA.	33
VI.	RESULTADOS.	34
	1. CONDUCTAS DE AUTOCUIDADO EVALUADAS A TRAVÉS DEL ESTADO DE PELAJE.	34
	2. ACTIVIDAD MOTORA EN ROTAROD.	35
	3. CONDUCTAS DE ACICALAMIENTO CON LA PRUEBA DE ACICALAMIENTO ARTIFICIAL.	37
	4. DESESPERANZA EN NADO FORZADO (NF)	38
VII.	DISCUSIÓN.	41
	1. DIFERENCIAS ENTRE CEPAS A LA SUSCEPTIBILIDAD ECI Y AL EFECTO ANTIDEPRESIVO DE LA EMTR.	41
	2. EFECTO DEL ECI Y LA EMTR EN LAS CONDUCTAS DE AUTOCUIDADO.....	42
	3. EFECTO DEL ECI Y LA EMTR (5 Hz) EN LA ACTIVIDAD MOTORA.	43
	4. EFECTO DEL ECI Y LA EMTR EN EL DESARROLLO DE ANHEDONIA.	43
	5. EFECTO DEL ECI Y LA EMTR EN EL DESARROLLO DE DESESPERANZA.....	45
	6. EFECTO ANTIDEPRESIVO DE LA COMBINACIÓN DE EMTR (5 Hz) Y FLX.....	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	46
IX.	PERSPECTIVAS	47
	1. ANTECEDENTES.....	47
	2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
	3. RESULTADOS PRELIMINARES.....	49
	4. CONCLUSIONES PRELIMINARES.	55
X.	BIBLIOGRAFIA.....	56

RESUMEN.

La estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr) es una técnica no invasiva que puede generar diversos efectos en el cerebro, desde regular la neuroplasticidad hasta inducir cambios en la excitabilidad neuronal. Las propiedades de esta técnica han permitido que sea considerada como tratamiento alternativo a la depresión. Existen trabajos en humanos que indican el uso terapéutico de la EMTr a diferentes frecuencias, siendo las más utilizadas 10, 15 y 20 Hz, aunque también se han reportado efectos positivos empleando EMTr a 5 Hz, con la ventaja de que esta frecuencia disminuye los efectos colaterales que esta técnica puede llegar a causar, tales como dolores de cabeza y molestias durante la aplicación. En relación con el protocolo de 5 Hz, existe muy poca evidencia preclínica sobre la capacidad de esta frecuencia para revertir las conductas tipo depresivos en roedores. Considerando esto y que existe evidencia que los factores genéticos como el tipo de cepa, influyen a la respuesta a los tratamientos antidepresivos en modelos animales de depresión, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antidepresivo de la EMTr (5 Hz) en ratones de las cepas Balb/C y Swiss Webster, así como comparar dicho efecto entre estas dos cepas. Tanto los ratones Balb/C como Swiss Webster, fueron sometidos al protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) durante ocho semanas, a partir de la cuarta semana se inició el tratamiento con EMTr (5 Hz), Fluoxetina (Flx; 10 mg/Kg) y la combinación de ambos (EMTr+Flx) durante cuatro semanas. Posteriormente, se aplicó una batería de pruebas conductuales (Evaluación del estado de pelaje, rotarod, acicalamiento artificial y nado forzado) para medir el efecto de los tratamientos sobre la presencia de conductas tipo depresivas. Los resultados obtenidos indican que la exposición al ECI genera conductas tipo depresivas (deterioro en el estado de pelaje, retardo psicomotor, anhedonia y desesperanza) las cuales fueron disminuidas por la EMTr y la Flx. En este estudio concluimos que la EMTr y la Flx revierten las conductas tipo depresivas generadas por el ECI tanto en la cepa de ratones Balb/C como en la Swiss Webster.

ABSTRACT.

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a non-invasive technique that can generate effects in the brain, from neuroplasticity to induce changes in neuronal excitability. The properties of this technique have allowed the sea to be considered as an alternative treatment to depression. There are investigations in humans that indicate the therapeutic use of rTMS at different frequencies, the most commonly used being 10, 15 and 20 Hz, although positive effects have also been reported that use rTMS at 5 Hz, with the advantage that this frequency decreases collateral effects that can cause, such as headaches and discomfort during of application. In relation to the 5 Hz protocol, there is few preclinical evidence about the ability of this frequency to reverse depressive like-behaviors in rodents. Considering that there is evidence that genetic factors such as the type of strain, influences the response to antidepressant treatments in animal models of depression, the objective of this work was to evaluate the antidepressant effect of rTMS (5 Hz) in mice of the Balb/C and Swiss Webster strains, as well as the comparison of the effect between these two strains. Both the Balb/C and Swiss Webster mice were subjected to the chronic unpredictable stress protocol (CUS) for eight weeks, starting from the fourth week, treatment with rTMS (5 Hz), Fluoxetine (Flx, 10 mg / kg) and the combination of both (EMTr + Flx) during four weeks. Subsequently, a battery of behavioral tests was applied to measure the effect of the treatments on the presence of depressive-like behaviors. The results indicate that the exposure to the CUS generates depressive-like behaviors (coat state deterioration, psychomotor retardation, anhedonia and hopelessness) which were diminished by the rTMS and the Flx. In this study we conclude that rTMS and Flx revert the depressive-like behaviors generated by the CUS both in the Balb/C and Swiss Webster mice.

AGRADECIMIENTOS

“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños” (Eleanor Rosvelt).

Tomare las siguientes líneas como un foro para expresar toda la gratitud que siento hacia todas aquellas personas, que han sido parte fundamental en mi camino personal y académico para la culminación de esta meta. En primera instancia doy las gracias a mis padres, a mi madre por creer incondicionalmente en mí, por siempre recibirme con un abrazo y un plato de sopa cada vez que volvía al hogar, por cobijarme tantas veces con su calidez y su nobleza y por ser un pilar en mi formación humana; a mi padre por su apoyo tanto moral y económico, por confiar en mi capacidad para lograr mis sueños y por ser un vivo ejemplo de disciplina y trabajo, a mis hermanas Esmeralda y Eva por compartirme de ellas, por enseñarme el valor de la humildad y siempre ser un hombro donde apoyarme cuando el camino es cansado. Mi familia ha sido un gran motor para mí, sin embargo, indudablemente, este logro no hubiese sido posible sin la tutoría, apoyo y orientación del Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, loable ser humano, gran líder y excelente científico, que además de guiarme de manera congruente y apasionada en el camino de la ciencia, ha representado en mi un claro ejemplo de la alta calidad de la ciencia que se hace en México; de igual manera, agradezco a mis sinodales, el Dr. Daniel Reyes Haro y al Dr. Gonzales Olvera Jorge Julio, quienes fungieron un papel clave en el planteamiento y el desarrollo del proyecto y los cuales me compartieron su juicio crítico y su gran experiencia en la investigación. Siendo piezas claves en mi formación, también requiero agradecer profundamente al Químico Leonardo Ortiz López, por compartirme tantas enseñanzas, muchas de ellas aprendizajes de ciencia, muchas de ellas aprendizajes de vida, de igual manera expreso mi sincera gratitud a la Dra, Edith Araceli Cabrera, quien, con su tenacidad e inteligencia, me enseñó con el ejemplo la importancia de luchar con perseverancia y pasión por tus metas. De igual manera agradezco a mis compañeros de laboratorio (Andrea, Cesar, Ana, Lizeth, Enrique, Carla, Betsa, Reina, Diana y el Sr. Arturo) por ser un gran equipo de trabajo, buenos amigos e interesantes ponentes en aquellas incontables tardes de filosofía y reflexión.

Por otro lado, me es indispensable mencionar el apoyo de mis amigos más cercanos, que han

sido testigos de diferentes etapas de mi vida, y que, sin duda en esta, no es la excepción. Gracias Vero (lealtad), Oliver (inteligencia), Luis (irreverencia), Memo (serenidad), Ferchis (confianza) y Fernando (humildad) por seguir formando parte de mi vida y por las aventuras juntos. En igual grado me encuentro infinitamente agradecido con Nancy, que es estandarte, ejemplo de vida, inspiración y apoyo, gracias por la paciencia, amor y apoyo incondicional. Agradezco, de igual manera, a mis compañeros de Jornada, un movimiento de mentes inconformes, rebeldes y creadoras que, a lo largo de mucho tiempo, han alimentado mi esperanza y humanidad, así como también, quiero dedicar unas breves palabras a la Sra. Rosalinda, a Ixchel y a Itseni, quienes me apoyaron en muchos sentidos, y que desde que llegue a su hogar, me abrieron las puertas de su corazón. Finalmente, quiero reconocer en estas últimas líneas, de forma simbólica y con todo el respeto que según mi pensamiento merece, a todos aquellos animales de laboratorio que, por el avance de la ciencia y el bienestar humano, fueron eutanizados, para un fin mayor. Agradezco y hago una profunda reflexión al respecto, y no me queda más que poner al servicio de la sociedad mi labor, que, con amor y pasión, ejerzo. Gracias por la oportunidad, por creer en mí, ahora me corresponde seguir con mi camino, marchar con más firmeza ante la adversidad y devolver con resultados todo aquello que la nación me dio. Muchas gracias.

Agradecimientos especiales:

- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico en todo este tiempo de mi formación.
Becario No: 773861
- Al Instituto de Neurobiología, por ser la sede principal del posgrado y apoyar siempre al desarrollo de las Neurociencias en México.
- A la facultad de Psicología, UNAM, por ser mi sede local durante mi Maestría, y a la UNAM en general por ser mi Alma Mater en toda mi vida académica.
- Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz (INPRFM), por permitirme elaborar mi proyecto de investigación dentro de sus prestigiados laboratorios.

I. INTRODUCCION.

1. Depresión.

1.1 Síntomas y generalidades de la depresión.

La depresión es uno de los trastornos afectivos más comunes, se caracteriza por la falta de interés en actividades cotidianas, alteraciones en la alimentación y el sueño, anhedonia, sentimientos de culpa e inutilidad, formación de pensamientos suicidas, pérdida de peso y libido, poca reactividad emocional, retardo motor y escasez de energía. Tales síntomas deben de presentarse en el sujeto por un periodo mínimo de dos semanas para que se pueda diagnosticar como depresión (World Health Organization 1992). Esta enfermedad es aproximadamente dos veces más común en mujeres que en hombres y es más frecuente entre los 15 y 29 años de edad, aunque algunos estudios sugieren que la edad de inicio de este padecimiento está disminuyendo en cohortes recientes, llegándose a presentar así, en niños y adolescentes (Benjet, Psicol, and Borges 2004). Este padecimiento puede volverse crónico y alterar significativamente las habilidades de autocuidado del individuo, y en los casos más graves, puede llevar al suicidio (Wan 2012).

Por otro lado, se calcula que actualmente la depresión afecta a cerca de 300 millones de personas a nivel mundial, y que para el año 2020, ocupará el primer lugar como carga de enfermedad en países en vías de desarrollo, y el segundo, en países de primer mundo (Benjet, Psicol, and Borges 2004). En México, se calcula que cerca del 2.0% de los mexicanos han padecido depresión en algún momento de sus vida, con un promedio de siete episodios, durante los cuales no reciben el tratamiento adecuado (Kohn et al. 2005), teniendo como consecuencia el aumento en el número de días vividos con discapacidad y la disminución en su productividad laboral (Borges y Survey 2007).

1.2 Factores genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo de la depresión.

La depresión es una enfermedad multifactorial, sin una causa única aparente, al contrario, esta parece ser el resultado de la combinación de una serie de factores genéticos, ambientales y psicosociales que predisponen al desarrollo de esta enfermedad. La condición genética es un componente importante ya que este trastorno tiene un alto grado de heredabilidad, de un cuarenta hasta un cincuenta por ciento (Malhi, Moore, y McGuffin 2000) y una frecuencia típica constante del 8 al 12 % en todos los países del mundo, sin importar su nivel socioeconómico (Layard 2006). Si bien, los genes no son responsables directos de esta enfermedad, si participan en la predisposición a desarrollarla. Actualmente se han identificado distintos genes cuya expresión esta alterada en muchos pacientes con depresión, tales como son el gen del transportador de Serotonina *5HTT/SLC6A4* y el gen del receptor de Serotonina 5HT 2A (Fa 2002), además del polimorfismo Val66Met del gen del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y el gen de la isoforma TPH2 de la hidroxilasa del triptófano (Malhi, Moore, y McGuffin 2000). Sin embargo, es importante mencionar que la susceptibilidad a la enfermedad también depende del fenotipo, el estilo de vida y las diferencias individuales generadas por distintos factores ambientales. Dentro de estos factores ambientales que elevan el riesgo de desarrollar un episodio depresivo, destacan la vivencia de eventos traumáticos, la pérdida de un familiar, violencia constante, abuso infantil, abandono materno/paterno, infecciones virales, lesiones cerebrales y exposición crónica al estrés.(Nestler *et al.* 2002).

1.3 Estrés y depresión.

El estrés puede ser definido como una respuesta biológica y/o psicológica no específica, que generan todos los organismos frente a las demandas y presiones del medio ambiente (estresores) para conservar la homeostasis y adaptarse a los cambios del entorno. Cuando el estrés es breve y controlable, este tiene efectos positivos en el organismo (eustres). Mientras que, cuando el estrés provoca una mala respuesta adaptativa (distrés) generada por la exposición intensa e incontrolable de distintos estresores, este produce efectos negativos en la salud. (Subiabre 2012). Tales como el aumento en la propensión al desarrollo de padecimientos

psiquiátricos, como la depresión. Frecuentemente la depresión es descrita como un trastorno relacionado con el estrés dado que muchos de los episodios depresivos suelen ocurrir en presencia de algún tipo de estresor, aunque el estrés, *per se*, no es la causa directa de esta enfermedad (Nestler *et al.* 2002)..Por otro lado, existe evidencia clínica que demuestra que el sistema de regulación neuroendocrino a la respuesta de estrés (el sistema Hipotalámico-Hipófisis-Glándula adrenal, también conocido como eje HHA), se encuentra alterado en pacientes con depresión. Presentándose en muchos casos de ellos una hipersecreción de glucocorticoides la cual, durante periodos prolongados, puede generar una disminución en la neurogénesis y producir la pérdida de neuronas piramidales en el hipocampo, fenómeno que puede estar asociado con la presencia de síntomas depresivos en estas personas (Cordero Andrey, Trías y Jaime, 2009). Por otro lado, diversos estudios en animales de laboratorio han dado evidencia de que la exposición continua a diversos estresores genera conductas “tipo depresivas” en estos organismos (anhedonia, disminución en la conducta sexual, poca actividad motora, cambios en los patrones de sueño y aumento o disminución de peso). Con base a ello, existen diversos protocolos de estrés que permiten generar modelos animales de depresión para poder estudiar a detalle los mecanismos celulares y moleculares asociados a la patogénesis, desarrollo y tratamiento de esta enfermedad.

1.4. Modelos animales de depresión.

Idealmente para que un modelo animal pueda ser considerado como tal, debe de cumplir con los siguientes criterios de validez: a) criterio de apariencia, el cual indica que el modelo es capaz de mimetizar la fisiopatología y fenomenología de la enfermedad en cuestión, b) criterio de constructo, que señala que las hipótesis que explican un trastorno también pueden servir como fundamento al modelo, y c) criterio de predictividad, que muestra que el modelo responde al tratamiento de manera similar a como ocurre en individuos con la enfermedad (Belzung y Lemoine 2011). Dada la complejidad y heterogeneidad en la etiología de la depresión, es difícil reproducir en animales de laboratorio determinados síntomas de esta patología, tales como son la presencia de sentimientos de culpa y de tristeza, así como la recurrencia de pensamientos suicidas. Sin embargo, cabe resaltar que no es necesario que un modelo de depresión

reproduzca todas las alteraciones conductuales encontradas en este trastorno, dado que los pacientes no siempre manifiestan todo el cuadro clínico, además de que la mayoría de los modelos de depresión reproducen los síntomas diacríticos de esta enfermedad, tales como lo son la anhedonia (perdida de interés en estímulos placenteros) y la desesperanza (falta de voluntad o apatía) (Yan *et al.* 2010).

Entre los principales modelos de depresión inducidos por estrés se encuentran:

- a) El modelo de desesperanza aprendida, el modelo de derrota social y el modelo de estrés crónico impredecible. El modelo de desesperanza aprendida consiste en la exposición repetida de un evento traumático insuperable, tal como puede ser la prueba de nado forzado o la aplicación de shocks eléctricos, a roedores para inducir una desesperanza continua (Meier. 1984). Por su lado, el modelo de derrota social, se basa en el desarrollo de conductas tipo depresivas a través de la exposición a estrés social inducido por el confrontamiento entre individuos de distintas jerarquías (Riggs *et al.* 2014), mientras que, el modelo de estrés crónico impredecible consiste en la aplicación de diversos estresores de distinta naturaleza y duración de forma impredecible para reproducir algunos síntomas de pacientes con depresión, en roedores (Yan *et al.* 2010).

1.4.1 Modelo de estrés crónico impredecible.

El modelo de estrés crónico impredecible fue propuesto por primera vez por Katz (1982) y desarrollado por Papp y Willner en los años noventa. (Nollet, Le Guisquet, y Belzung 2013). Este modelo reproduce las principales alteraciones conductuales de la depresión (Anhedonia y apatía), así como también induce algunas alteraciones fisiológicas presentes en las personas deprimidas, tales como el aumento en los niveles de corticosterona en plasma (Vega-Rivera *et al.* 2016), disminución en la neurogénesis hipocampal (Alonso *et al.* 2004) y disfunción del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Zhao *et al.* 2018). Además de que tiene la ventaja sobre otros modelos, de reproducir la condición clínica del tratamiento farmacológico, ya que la administración crónica, pero no aguda, de disminuye las conductas tipo depresivas generadas en este modelo (Nollet, Le Guisquet, y Belzung 2013). De tal modo que el modelo de estrés

crónico impredecible, es uno de los más usados para generar conductas depresivas en modelos animales y estudiar el efecto de distintos tratamientos antidepresivos (Willner 2016).

1.5. Tratamientos convencionales de la depresión.

Para disminuir los síntomas de la depresión se han establecido diversas estrategias terapéuticas, dentro de las que convencionalmente se encuentran la psicoterapia, la terapia electroconvulsiva y la farmacoterapia.

a) Psicoterapia:

Existe una gran variedad de técnicas empleadas en la psicoterapia para tratar la depresión, siendo la terapia cognitivo conductual la más utilizada y con mejores resultados, no obstante, existen estudios que indican que su efectividad es limitada cuando no se aplica en conjunto con la terapia farmacológica (Little 2009).

b) Terapia electroconvulsiva:

La terapia electroconvulsiva ha demostrado ser eficiente para tratar la depresión severa, y en muchos casos es el método más usado para tratar la depresión psicótica, sin embargo, este tipo de estimulación tiene el inconveniente de producir alteraciones en la memoria (amnesia anterógrada o retrograda) que pueden durar desde semanas hasta meses (Schulze-Rauschenbach 2005).

c) Farmacoterapia:

El empleo de fármacos es el método más convencional para aminorar o eliminar los síntomas de la depresión. Estos fármacos pueden clasificarse en distintos grupos de antidepresivos tales como los inhibidores de la mono amino oxidasa (IMAOs), los inhibidores selectivos de la recaptura de Serotonina (ISRS) y norepinefrina (INSR), los antidepresivos tricíclicos (TCAs) y la tri-yodotironina (T3) (Little 2009). A pesar de la eficiencia antidepresiva de estos fármacos muchos de ellos producen distintos efectos secundarios, tales como aumento de peso, hipo e hipertensión, problemas cardiovasculares, náuseas, sedación etc

(Hansen *et al.* 2005) aunando a que el efecto antidepresivo de estos fármacos tarda en observarse en un promedio de entre tres y seis semanas. Además, de que entre una y dos terceras partes de los pacientes pueden no responder al primer fármaco antidepresivo prescrito y que esta parte de la población es propensa a generar depresión resistente a fármacos (Little 2009). En este sentido, una alternativa efectiva al tratamiento farmacológico de la depresión es la estimulación magnética transcraneal (EMT).

2. Estimulación magnética transcraneal (EMT).

2.1 Características y modalidades de la EMT.

La EMT es un método indirecto, no invasivo, que es usado para inducir cambios en la excitabilidad nerviosa. Esta técnica está basada en el principio físico propuesto por Michael Faraday en 1831 sobre la radiación electromagnética (Ridding y Rothwell 2007). Con base en esto, se produce un pulso electromagnético generado por bobinas, el cual es capaz de atravesar el cuero cabelludo y el cráneo, para estimular o inhibir distintas áreas del cerebro (Fig. 1) (Klomjai, Katz, y Vallée 2015).

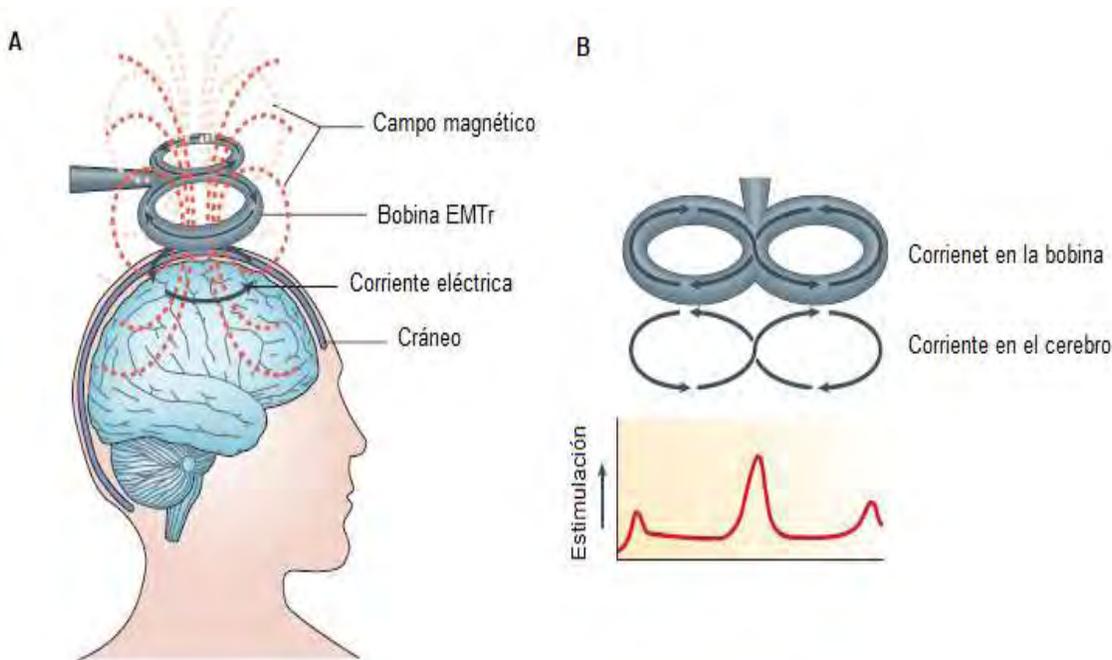


Fig. 1. Principio básico de la EMTr. A. Cada pulso de la EMTr produce una corriente eléctrica en el cerebro la cual es capaz de estimular los nervios corticales. El campo magnético decae rápidamente con base a la distancia de la bobina. B. El empleo de bobinas “en forma de ocho” permite focalizar moderadamente el pulso ya que cada “bucle circular genera una corriente que al momento de interactuar con esa configuración intensifica la corriente en el punto medio de la bobina (Modificada de Ridding y Rothwell, 2007).

Esta técnica ofrece la posibilidad de inducir cambios neuroplásticos, así como producir neuromodulación y regular la excitabilidad del tejido nervioso sin la necesidad de producir algún tipo de lesión que deje expuesto al cerebro. Sin embargo también tiene dos importantes limitaciones, la primera es que el campo magnético decae rápidamente con la distancia a la que se encuentra la superficie de la bobina, lo cual genera que si se requiere estimular partes profundas del cerebro se tenga que aumentar la intensidad del campo magnético, produciendo una sobre estimulación de la corteza en comparación con las regiones profundas; la segunda limitación es que el sitio de estimulación no es focal, por lo que se han diseñado distintos modelos de bobinas que aminoran este efecto (Fig. 1 B) (Thielscher y Kammer 2004) aunado al acompañamiento con neuronavegadores en la EMTr, para mejorar la precisión de las regiones a estimular.

La aplicación de la EMT involucra la configuración de distintos parámetros acerca de las características del pulso a utilizar, estas características son la intensidad, el ritmo, el tiempo entre pulsos, la duración de la sesión, el tiempo entre sesiones, el tipo de EMT y la frecuencia. Respecto a este último parámetro, la EMT puede ser definida de “baja frecuencia (≤ 1 Hz) o de “alta frecuencia” (>1 Hz). Convencionalmente, en experimentos con animales de laboratorio, se utilizan frecuencias de 0.3 a 1 Hz como estimulación de baja frecuencia y de 5 a 20 Hz como de alta frecuencia. La importancia de este parámetro en la configuración de la EMT radica en su poder modulador de la excitabilidad neuronal. De esta manera, las bajas frecuencias inducen un efecto inhibitor, mientras que las altas frecuencias desencadenan un efecto excitador. De igual manera, se ha demostrado que la duración de dichos efectos depende en gran medida del número de pulsos aplicados (Abraham 2003) Por otro lado, existen diferentes modalidades de la EMT de acuerdo con la forma en cómo se aplican los pulsos electromagnéticos, estos tipos de estimulación son las siguientes:

- a) EMT simple (EMTs): caracterizada por la descarga de un único pulso electromagnético sobre la corteza cerebral.
- b) EMT de pulsos pareados (EPP): aplicación de dos pulsos seguidos los cuales pueden poseer las mismas o diferentes características.
- c) Estimulación asociativa pareada (EAP): aplicación de dos pulsos de diferentes energías.
- d) Estimulación mediante cuadripulsos (ECP): Se generan cuatro pulsos de las mismas características, y que está basada en la hipótesis de que el número de pulsos por sesión es un factor importante para su efecto.
- e) EMT “theta burst” (ETB): Consiste en la aplicación de ráfagas repetidas de estímulos electromagnéticos de alta o baja frecuencia.

f) EMT repetitiva (EMTr): caracterizada por la emisión de varios pulsos de una intensidad determinada por unidad de tiempo definida como tren.

La EMTr genera pulsos cortos y repetidos que pueden producir efectos más prolongados en el cerebro que los pulsos únicos de otras modalidades de la EMT (Ridding y Rothwell 2007). Es por lo que este tipo de estimulación es una de las más utilizadas tanto en la investigación como en la clínica, en especial en el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos, tales como la depresión.

2.2 EMTr como tratamiento antidepresivo.

La EMTr ha sido aceptada ampliamente como tratamiento antidepresivo, no solo por su eficacia, sino también por la seguridad que brinda y por los pocos, o nulos efectos secundarios que puede llegar a causar, en comparación a los generados por la toma de medicamentos y por la estimulación electroconvulsiva (George *et al.* 2000b)(Schulze-Rauschenbach 2005).

Existen diversos estudios en humanos que respaldan la eficiencia de la EMTr como intervención terapéutica para la depresión (Loo y Mitchell 2005), (Brunelin *et al.* 2007) de tal modo que desde el año 2008 la agencia de alimentos y medicinas de Estados Unidos (FDA; por sus siglas en inglés) aprobó su uso oficial como tratamiento antidepresivo en todo el mundo (FDA 2011).

Por otro lado, la mayoría de los ensayos clínicos han establecido que la aplicación de frecuencias por encima de 1 Hz sobre la corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) izquierda tiene efectos antidepresivos (Brunelin *et al.* 2007).. En la mayoría de los estudios publicados, tanto a nivel clínico como en animales de laboratorio, las frecuencias empleadas más comúnmente han sido las de 10, 15 y 20 Hz (George *et al.* 2000a), (Magavi, Reti, y Vasa 2017), aunque en general, estímulos menores a esta frecuencia, como son los pulsos de 5 Hz, han demostrado efectos terapéuticos, con la ventaja de que reducen las molestias durante la aplicación y los dolores de cabeza que pueden llegar a presentarse después de la estimulación (Wassermann 1998).

2.3 Eficiencia de la EMTr a 5 Hz.

La investigación referente al efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz aun es escasa en comparación con los estudios realizados con EMTr a frecuencias más altas. Sin embargo, existen algunos trabajos con humanos, que reportan que la aplicación de EMTr a 5 Hz en la CPFDLI disminuye los síntomas en pacientes con depresión en una población mexicana, y que esta mejoría se puede mantener hasta tres meses después del inicio del tratamiento (Armas-Castañeda *et al.* 2015), por otro lado existen algunos trabajos que demuestran que la frecuencia de 5Hz tiene la misma eficiencia que otros protocolos de estimulación, tal como lo indica Noah y colaboradores en el 2015, quienes señalan que la EMTr a 5 Hz en la corteza prefrontal izquierda (CPFI) tiene el mismo efecto antidepresivo y ansiolítico que la frecuencia de 10 Hz (Philip *et al.* 2015), así como también lo reporta Mark y su equipo de trabajo en el 2000, pero comparando los protocolos de 5 y 20 Hz, los cuales disminuyen significativamente los síntomas en pacientes con depresión mayor a comparación de pacientes “Sham”, pero sin diferencias significativas entre el efecto antidepresivo de los dos protocolos de estimulación (George *et al.* 2000a). En cuanto a investigaciones con animales de laboratorio, Peng y su equipo de trabajo en el 2017, reportan que la aplicación de EMTr a 5 Hz en la CPF de ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés, disminuye la desesperanza y la anhedonia en este modelo de depresión, y que este efecto antidepresivo puede estar asociado a la inhibición de la expresión de las proteínas Sirtuína 1 (Sirt1) y la oxidasa de monoamina A (MAO-A) en astrocitos de la CPF (Peng *et al.* 2018).

Por otro lado, a pesar de que no se conocen con claridad cómo actúa la EMTr en el cerebro, se ha sugerido que el efecto antidepresivo de esta intervención terapéutica está asociado con diferentes fenómenos, tales como la liberación de neurotransmisores, la eficiencia sináptica, la activación de vías de señalización, cambios neuroplásticos y la expresión de genes (Chervyakov *et al.* 2015).

2.4 Efectos celulares y moleculares de la EMTr.

a) Efecto de la EMTr en la neuroplasticidad.

Se sabe que la EMTr induce distintos cambios en la neuroplasticidad, específicamente se ha reportado su efecto sobre la potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente), la dendritogénesis y la neurogénesis, en cuanto a esta última, existen diversos estudios que indican que la EMTr induce la formación de nuevas neuronas en el hipocampo, tanto en condiciones fisiológicas (Ueyama *et al.* 2011) como en enfermedades psiquiátricas y bajo condiciones de estrés, (Chen *et al.* 2015), además de incrementar los niveles de proliferación celular así como los niveles de BDNF con estímulos de alta frecuencia (10-15 Hz) (Feng *et al.* 2012). Respecto a la LTP y LTD, existen estudios que demuestran que pulsos de 10 Hz produce LTP, y que esto está asociado con el efecto antidepresivo de la EMTr (Kim *et al.* 2006) Mientras que otros estudios indican que la estimulación con 0.25 Hz disminuye la LTP, pero aumenta la LTD en la corteza de los sujetos estimulados (Jung y Ziemann 2009). En cuanto a la dendritogénesis y sinaptogénesis, se ha observado que la EMTr a 10 Hz induce el crecimiento y remodelación de las espinas dendríticas, así como un aumento en la cantidad de contactos sinápticos, mientras que la EMTr a 1 Hz produce el efecto contrario (Chervyakov *et al.* 2015).

b) Efecto de la EMTr en los sistemas de neurotransmisores.

La EMTr puede modificar el patrón de liberación de distintos neurotransmisores, entre ellos, uno de los más importantes recientemente identificado es la dopamina, la cual aumenta su liberación en distintos núcleos cerebrales, especialmente cuando se estimula la corteza frontal (Kuroda *et al.* 2006). De igual manera la estimulación a 0.5 Hz modifica los niveles de GABA y Glutamato en el hipocampo y núcleo estriado. Otro de los sistemas de neurotransmisores afectados por la EMTr es el serotoninérgico, del cual se tiene evidencia que pulsos de 25 Hz en la corteza prefrontal, aumentan la producción de este neurotransmisor (Kurumaji, Umino, y Nishikawa

2011), al igual de que pulsos de 15 Hz también modifica la sensibilidad de los receptores 5-HT1A (Gur *et al.* 2004).

c) Efecto de la EMTr en la expresión y regulación de genes.

La EMTr también genera efectos a nivel de expresión proteica, por ejemplo, se tiene reportado que distintos protocolos de este tipo de estimulación incrementan los niveles del ARN mensajero (ARNm) que codifica para la proteína c-fos en el tálamo y en la corteza prefrontal (Chervyakov *et al.* 2015), además estudios en animales de laboratorio también indican que la EMTr aumenta los niveles de ARNm de genes que se han relacionado con el ciclo circadiano, como la Calmodulina cinasa II (CaMK2) y la Caseína cinasa 1 ϵ (CK-1 ϵ), mientras que disminuye los niveles del ARNm del receptor de DA D2 (Ikeda *et al.* 2013). Aunado que, a nivel proteico, se ha encontrado que la EMTr aumenta la expresión de las proteínas hidroxilasa de tirosina y la proteína nuclear NeuN en la sustancia nigra (Chervyakov *et al.* 2015)

3. Influencia de los factores genéticos en el efecto antidepresivo de la EMTr.

3.1 Polimorfismos asociados a la respuesta del tratamiento con EMTr en pacientes con depresión.

Por otro lado, también es importante considerar que la eficiencia al tratamiento con EMTr o con fármacos antidepresivos puede estar ligada a diferencias en la expresión de genes. En ese sentido, algunos estudios hechos en humanos han revelado que existe una correlación entre la respuesta al tratamiento con EMTr y la presencia de distintos polimorfismos en pacientes diagnosticados con depresión, tal como lo sugiere el trabajo realizado por Zanardi y colaboradores en el 2007, en el cual se señala que la presencia del polimorfismo SERTPR del transportador de Serotonina, mejora la respuesta al tratamiento con EMTr a 15 Hz (Zanardi *et al.* 2007), al igual que también se ha reportado que la presencia del polimorfismo *rs6295* del

receptor de serotonina 5HT1A aumenta la remisión en pacientes con depresión mayor y con trastorno bipolar, tratados con EMTr a 20 Hz (Malaguti *et al.* 2011). Estos datos nos confirman la relevancia de las diferencias genéticas individuales en la eficiencia de la EMTr como tratamiento antidepresivo. A pesar de ello, no existen estudios a nivel preclínico con modelos animales de depresión, que exploren el efecto del tipo de cepa y el fondo genético de estos organismos, en la respuesta terapéutica de la EMTr a 5 Hz. Aunque si existen diversos estudios que evalúan el efecto de estos parámetros (tipo de cepa y fondo genético) en la respuesta a otros tratamientos antidepresivos, como lo es el empleo de fármacos en distintos modelos de depresión.

3.2 Influencia del fondo genético en la respuesta al tratamiento farmacológico en modelos murinos de depresión.

En el contexto del uso de animales de laboratorio, una cepa es una población de individuos con un determinado fondo genético (conjunto total de genes) y un fenotipo común. En modelos roedores para la investigación biomédica, existen dos principales tipos de cepas: a) Cepas tipo Inbred y b) Cepas tipo outbred. Las cepas inbred se caracterizan por ser cepas endogámicas con individuos con poca variedad genética (98% Isogenicidad), lo cual les permite ser un excelente modelo para replicar datos y probar la respuesta a distintos tratamientos experimentales (Casellas 2011). Mientras que, por el contrario, las cepas outbred presentan un origen exogámico que les permite mantener una alta diversidad genética individual, por lo cual son muy utilizadas para el establecimiento y estandarización de colonias (Chia *et al.* 2005).

Numerosos estudios realizados en distintos modelos murinos de depresión demuestran que el genotipo propio de cada cepa de roedores es un factor determinante en la sensibilidad a diferentes fármacos antidepresivos en estos modelos animales. Tal como lo reportaron Yalcin y colaboradores en el 2008, quienes evaluaron el efecto de distintos fármacos tales como la Imipramina (IMP), Desipramina (DMP), Maprotilina (MPT) y Flx, en la disminución de conductas tipo depresivas en ratones de las cepas Balb/C y Swiss Webster expuestos a ECI. Concluyendo que la cepa Balb/C es más sensible al estrés y a los distintos antidepresivos probados, a comparación de la cepa Swiss Webster (Yalcin, Belzung, y Surget 2008). Por otro lado, Deniss

y su equipo de trabajo reportaron en el 2003, que existe una respuesta diferencial al tratamiento antidepresivo con IMP, DMP, Citalopram (CTM), Paroxetina (Prx) y Bupropion (BUPR) en ratones de distinto fondo genético, siendo la cepa Swiss la más sensible al efecto antidepresivo de la mayoría de los fármacos, a comparación de las cepas NMRI, DBA/2 y C57BL/6JRj (David *et al.* 2003). Finalmente, datos similares fueron publicados en un trabajo realizado por Lucki y colaboradores en el 2001, en el cual empleando el modelo de nado forzado, concluyen que los ratones de la cepa DBA/2J y la C57BL/6J son más sensibles al efecto de la DPM, mientras que la cepa Balb/Cj y la NIH Swiss son más sensibles al efecto de la Flx (Lucki, Dalvi, y Mayorga 2001). En conjunto, estos trabajos dan evidencia de que en tipo de cepa influye en la respuesta a distintos fármacos antidepresivos en modelos animales de depresión, resaltando con ello, el papel de las diferencias genéticas a nivel poblacional e individual, en la eficiencia a los tratamientos antidepresivos.

II. JUSTIFICACION.

La EMTr es una técnica no invasiva que puede generar diversos efectos en el cerebro, desde inducir neuroplasticidad y neuromodulación, hasta generar cambios en la actividad eléctrica de las neuronas. Las propiedades de esta técnica la hacen una excelente candidata como tratamiento alternativo a distintos trastornos neuropsiquiátricos, en especial en la depresión, enfermedad en la cual los tratamientos convencionales pueden generar cierta resistencia y numerosos efectos secundarios. Sin embargo, a pesar de ser una técnica que actualmente ya está aprobada mundialmente como tratamiento antidepresivo por la FDA, aún existen muchas interrogantes alrededor de los mecanismos y efectos que está tiene en el cerebro. Respecto a ello, uno de los campos menos explorados en investigaciones con animales de laboratorio, es la influencia de las diferencias genéticas en la respuesta al tratamiento antidepresivo con EMTr a 5 Hz. Este planteamiento se genera con base a los trabajos previamente citados que demuestran que la respuesta al tratamiento farmacológico se ve influida por el genotipo propio de cada cepa, y por la evidencia clínica que señala que la presencia de ciertos polimorfismos en determinadas poblaciones de pacientes con depresión, pueden mejorar la eficiencia al tratamiento antidepresivo con EMTr a altas frecuencias (15 y 20 Hz). En este sentido, resulta

importante evaluar la influencia del fondo genético de distintos tipos de cepas (Inbred y Outbred) en el efecto antidepresivo generado por la EMTr a 5 Hz en un modelo de depresión. Ya que, en primera instancia, responder esta interrogante nos permitirá, además de aportar información metodológica acerca de qué tipo de cepa es mejor para estudiar el efecto antidepresivo de la EMTr evaluar la participación de los factores genéticos en la respuesta al tratamiento con EMTr a 5Hz.

Y, en segundo lugar, esto también nos permitirá caracterizar y reproducir en un modelo animal, el efecto clínico de la EMTr a 5 Hz reportado en pacientes con depresión, y con ello explorar de manera más profunda en futuros experimentos, los mecanismos celulares y moleculares implicados en la EMTr.

Finalmente, también vale la pena resaltar la importancia de seguir aportando información, tanto a nivel clínico como experimental, referente al efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz, ya que el empleo de esta frecuencia parece tener el mismo efecto terapéutico que los protocolos de 10 y 20 Hz, pero con la ventaja de que esta cantidad de Hz disminuye los efectos colaterales que la estimulación puede llegar a causar, tal como se mencionó anteriormente.

III. HIPOTESIS.

- a) La exposición de los ratones Balb/C y Swiss Webster al protocolo de ECI generara conductas tipo depresivas en ambas cepas.
- b) La cepa de ratones Balb/C será la más sensible al estrés y al desarrollo de conductas tipo depresivas a comparación de la cepa Swiss Webster.
- c) La EMTr disminuirá las conductas tipo depresivas establecidas en los ratones de cada una de las cepas.

IV. OBJETIVOS.

- **General:**

- a) Evaluar el efecto de la EMTr (5Hz) en la disminución de las conductas tipo depresivas en ratones con distinto fondo genético (Balb/C y Swiss Webster) expuestos al protocolo de ECI

- **Particulares:**

- a) Generar en ambas cepas conductas tipo depresivas inducidas por ECI.
- b) Evaluar la sensibilidad de cada cepa al protocolo de ECI.
- c) Analizar conductualmente el efecto antidepresivo de la EMTr y compararlo con el efecto tipo antidepresivo de la Flx en cada una de las cepas.

V. MATERIAL Y MÉTODO.

1. Diseño experimental.

Se utilizaron ratones tipo inbred (Balb/C) y outbred (Swiss Webster), los cuales fueron expuestos al protocolo de ECI durante ocho semanas (con una semana previa de aclimatación), para inducir conductas tipo depresivas y evaluar a partir de ello, el efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz. Los tratamientos (EMTr y Flx), el Sham y el vehículo de la Flx (NaCl), fueron aplicados a partir del día 35 por un periodo de cuatro semanas, y finalmente, una vez terminado el protocolo de ECI y la intervención terapéutica, se realizó una batería de pruebas conductuales asociada a comportamientos tipo depresivos y posteriormente, dos horas después de la última prueba, los organismos fueron eutanizados por decapitación (Fig 2).

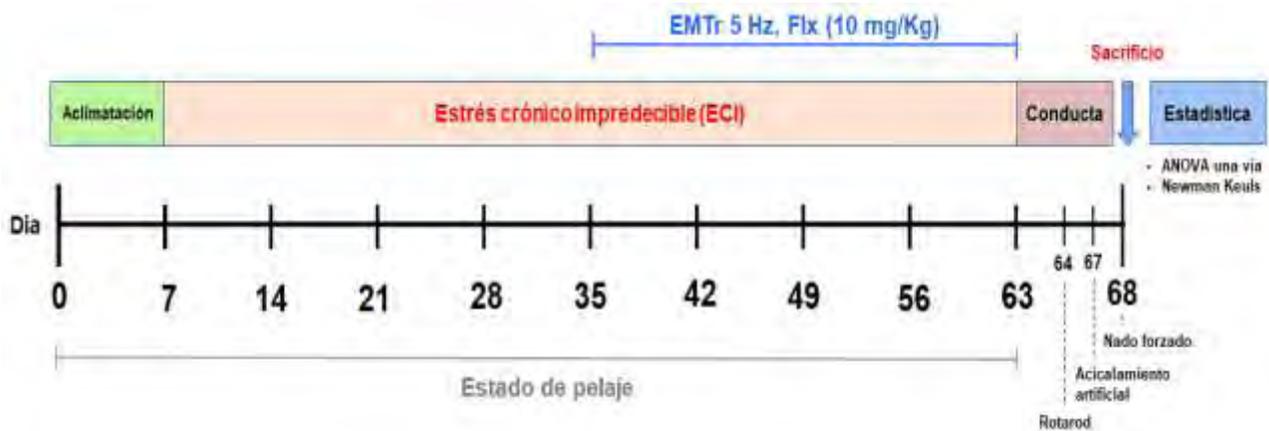


Fig. 2. Diseño experimental. Línea temporal donde se muestra la duración del protocolo de ECI, los momentos de la intervención terapéutica y el orden de la realización de las pruebas conductuales.

2. Animales.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa Balb/C y Swiss Webster de ocho semanas de edad. Los ratones fueron distribuidos de manera aleatoria en siete grupos ($n= 6-10$ individuos por grupo) (Tabla 1) los organismos fueron obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) y fueron manejados de acuerdo con los principios generales de cuidados de animales de laboratorio (Comité del consejo Nacional de investigación, 2011) y todos los procedimientos experimentales se hicieron con base a la NOM-062-ZOO-1999 y aprobados por el Comité de Ética del INPRFM.

Tabla 1. Grupos experimentales en las pruebas de conductas depresivas.

Grupo	ECI	Flx	NaCl	EMTr
Control	-	-	-	-
ECI	+	-	-	-
ECI+Flx	+	+	+	-
ECI+NaCl	+	-	+	-
ECI+EMTr	+	-	-	+
ECI+Sham	+	-	-	Sin pulsos
ECI+EMTr+Flx	+	+	+	+

Los animales fueron colocados por grupo, en cajas con medidas de 27 x 16 x 23 cm en condiciones de humedad y temperatura controladas, ciclos de luz-oscuridad cada doce horas. y con acceso libre al alimento y agua, a excepción de los periodos de exposición al protocolo de ECI según el grupo experimental.

3. Estrés Crónico Impredecible (ECI).

La exposición al ECI fue adaptada del protocolo original propuesto por Willner y colaboradores en 1992 (Willner, Muscat y Papp 1992) y del protocolo modificado de Vega Rivera y nuestro equipo de trabajo en el 2016 (Vega Rivera, *et al.* 2016). Los ratones fueron expuestos a dos o tres estresores diariamente durante ocho semanas (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo de exposición y día de aplicación de los distintos estresores.

Estresor	Tiempo (hrs)
Apagar luces	3
Restricción de movimiento	1
Caja en rotación (35-45 rpm)	1
Luz encendida	8
Frio (4 °C)	1
Ruido blanco	3
Luz estroboscópica	6
Caja inclinada (45 °)	3
Cama mojada	6
Hacinamiento	1
Olor a rata	3
Privación de comida	12

4. Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva (EMTr).

Se empleó un estimulador Mag Pro R30 y una bobina refrigerada, con los que se identificó el umbral motor (UM) por individuo, sin anestesia. Con referencia a este valor se obtuvo la intensidad para la exposición de los estímulos de cada una de las cepas (Balb/C UM= 30-35 %,

Swiss Webster UM=30-40 %). Los ratones fueron estimulados a partir de la cuarta semana del protocolo de ECI, se aplicaron treinta trenes de estimulación de 5 Hz (Armas-Castañeda *et al.* 2015) por día para cada sujeto en la CPFDLI, con el fin de revertir las conductas depresivas presentadas en los ratones. Cada tren incluyó 10 estímulos, con intervalos de 10 segundos entre trenes de estimulación. La bobina fue colocada sobre la cabeza del ratón y paralela a la columna vertebral. Para los ratones del grupo “Sham”, se empleó un bloque de acrílico de 6 cm de grosor para evitar que los pulsos magnéticos alcanzaran el cráneo de los ratones (Fig. 3).

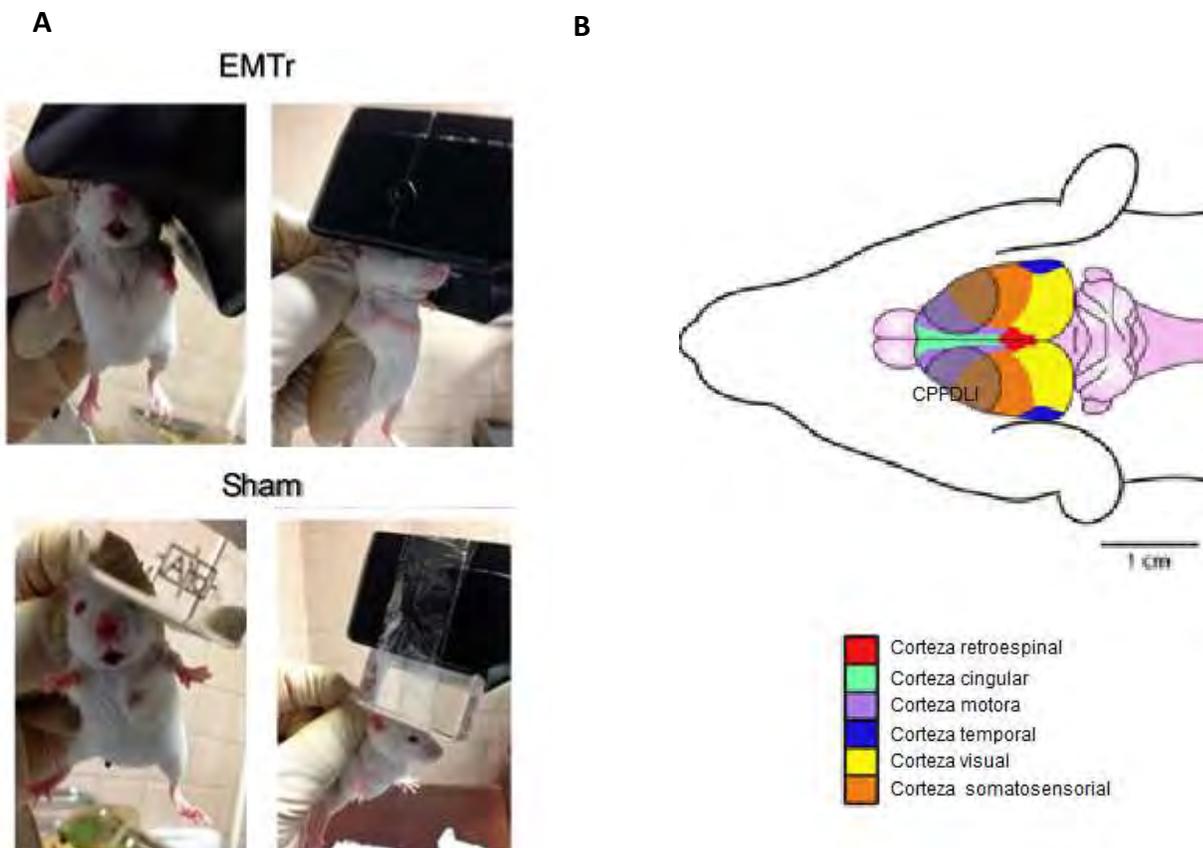


Fig 3. (A) Fotografías donde se muestra la posición en que fue colocada la cabeza de los ratones que recibieron la aplicación de la EMTr y los ratones “Sham”, en la CPFDL izquierda. (B) Esquema de cerebro de ratón donde se señala la posición de la CPFDLI. Tang et al. 2016 Modificación Tang, *et al.* 2016.

5. Fármacos.

Para el grupo correspondiente al control positivo farmacológico (ECI+Flx) y el grupo con la combinación de tratamientos (ECI+EMTr+Flx), se administró Fluoxetina (Flx) como tratamiento antidepresivo (10 mg/kg/día), y para el control vehículo, solución salina (0.9 % NaCl). En ambos casos, el fármaco o el vehículo se administraron por vía intraperitoneal, una vez al día a partir de la cuarta semana del protocolo de ECI durante 28 días.

6. Pruebas conductuales.

Para evaluar conductas tipo depresivas en los ratones bajo el protocolo de ECI y la exposición a los tratamientos antidepresivos, se utilizaron las siguientes pruebas conductuales: Rotarod, Prueba de acicalamiento artificial o “Splash test” (ST) y Nado forzado (NF), además, durante todo el experimento se evaluó el estado de pelaje de los individuos (Tabla 3). Todas las pruebas se realizaron en el periodo de actividad de los ratones (fase oscura) y media hora antes de iniciar cada prueba, los organismos fueron trasladados al lugar donde se hizo el registro con el fin de que se aclimataran al cuarto de conducta. El comportamiento de los animales en cada una de las pruebas fue videograbado, los datos resultantes del NF fueron analizados con el programa de registro conductual “Anymaze versión 5.14”, mientras que las pruebas de Rotarod y ST fueron analizadas manualmente.

Tabla 3. Pruebas conductuales para evaluar conductas tipo depresivas o relacionadas con la ansiedad que pueden ser modelados en ratón (Belzung y Lemoine 2011).

Síntomas en humanos	Endofenotipo del ratón	Prueba conductual/análisis.
Pérdida o ganancia de peso.	Pérdida o ganancia de peso.	Mediciones de peso antes y después del estrés
Retardo psicomotor.	Alteraciones en locomoción.	Campo abierto y Rotarod
Fatiga ó pérdida de energía.	Alteraciones en locomoción.	Actímetro, campo abierto
Disminución en la habilidad para pensar o concentrarse.	Déficit en memoria espacial y de trabajo	Laberinto elevado en cruz
Ansiedad.	Conductas tipo ansiosas.	Campo abierto. Laberinto elevado en cruz. Alimentación novedosa suprimida.
Pérdida de voluntad.	Desesperanza.	Nado forzado.
Pérdida de autocuidado, anhedonia.	Acicalamiento.	Deterioro del estado de pelaje, prueba de preferencia de sacarosa y de acicalamiento artificial.

6.1 Estado de pelaje (EP).

El EP de todos los organismos se registró semanalmente durante las nueve semanas del experimento. El EP de los ratones fue evaluado como una medida de las alteraciones inducidas por el ECI en la motivación hacia el comportamiento de autocuidado. En trabajos anteriores se ha reportado que ratones expuestos a ECI muestran una degradación progresiva de su EP, lo cual es uno de los índices más replicables de las alteraciones inducidas por el ECI y que ha sido validado farmacológicamente como un parámetro útil para estudiar el inicio de las terapias antidepresivas (Santarelli *et al.* 2003), (Surget *et al.* 2008), (Tanti *et al.* 2012). El puntaje del EP se basó en los parámetros propuestos por Tanti (Tanti *et al.* 2012), donde el valor de 0 representa un estado bueno (piel lisa y brillante, sin parches en el pelaje), el 0.5 uno intermedio (pelaje ligeramente mullido con algunos parches) y el 1, un estado muy malo (pelaje esponjoso en la mayor parte del cuerpo con ligeras manchas en la piel (Fig. 4).



Fig. 4. Valor general del estado de pelaje. EP= 0, pelaje en buen estado, EP= 0.5, pelaje con deterioro moderado y EP= 1, pelaje en mal estado.

6.2 Rotarod.

Veinticuatro horas después de terminado el protocolo de ECI y la aplicación de los tratamientos, los organismos fueron puestos a prueba en dos sesiones en el Rotarod, la primera sesión de habituación y la segunda de prueba para evaluar su coordinación motora. Se utilizó un protocolo

de aceleración continua con un aumento de la velocidad del cilindro de 0 a 20 revoluciones por minuto (rpm) como máximo. Al final el parámetro registrado fue el tiempo de permanencia en el Rotarod

6.3 Acicalamiento artificial.

La prueba de ST evalúa conductas de autocuidado y motivación como lo es el acicalamiento. Para ello se roció el pelaje dorsal de cada animal con una solución de Sacarosa al 30 %. Después de ello se dejó vaporizar dicha solución por un tiempo aproximado de uno a dos minutos. Posterior a ello, los organismos fueron grabados en su “caja hogar” por un periodo de 5 minutos, para contabilizar el tiempo total de acicalamiento y la latencia al primer episodio de acicalamiento.

6.4 Nado forzado.

Como última prueba se realizó el NF para evaluar “desesperanza” como una conducta tipo depresiva; se utilizó un cilindro de cristal con 30 cm de alto y 8 cm de diámetro, el cual se llenó aproximadamente a los 15 cm con agua a temperatura ambiente ($\pm 33^{\circ}\text{C}$). La prueba se realizó en una sola sesión con una duración de 6 minutos por organismo. El agua se cambió entre cada sujeto y el parámetro que se analizó fue el tiempo de desesperanza total (90 % inmovilidad por un periodo mínimo de 2500 ms), el número de episodios de desesperanza y el tiempo total de inmovilidad.

7. Estadística.

Para evaluar las diferencias en los distintos parámetros medidos entre los diferentes grupos experimentales, se realizaron ANOVAS de una vía, seguidas de la prueba *pos hoc* de Newman Keuls considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para evaluar las diferencias de los parámetros medidos entre los controles negativos (grupo ECI) de cada cepa, se utilizó una

prueba de T. El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa estadístico Graph Prisma 6.

VI. RESULTADOS.

1. Conductas de autocuidado evaluadas a través del estado de pelaje.

El estado del pelaje (EP) analizado al finalizar el protocolo de estrés en los ratones de la cepa Balb/C presentó un deterioro significativo en comparación con los ratones del grupo control (Ctrl) que no fueron expuestos al ECI (Fig. 5). ($p \leq 0.0001$). Sin embargo, en los grupos expuestos al ECI que recibieron el tratamiento farmacológico con Fluoxetina (Flx), se encontró una mejora en el EP en comparación con el grupo expuesto al ECI ($p \leq 0.001$). Un efecto similar al de la Flx fue causado por la EMTr a 5 Hz ($p \leq 0.01$) y por la combinación de ambos tratamientos (Flx+EMTr) ($p \leq 0.05$). Por su parte, el grupo vehículo de la Flx, tratado con NaCl y el grupo que no recibió la EMTr (Sham) no mostraron efecto positivo para revertir la afectación del EP. Estos resultados sugieren que la EMTr a 5Hz revierte las alteraciones del EP provocadas por el ECI, efecto que es similar al de la Flx (10 mg/kg) y que, al interaccionar ambos tratamientos, disminuye (Fig. 5 Izquierda). El ANOVA de una vía produjo los siguientes valores: $F_{6,55}=12.02$, $p < 0.0001$).

Respecto al EP de los ratones de la cepa Swiss Webster expuestos al ECI se observó un deterioro significativo en comparación con el grupo que no fue estresado ($p \leq 0.01$). Sin embargo, los grupos que fueron expuestos al ECI y que recibieron alguno de los tratamientos no revelaron disminución en el deterioro del EP con respecto al grupo únicamente con ECI, aunque, al comparar los ratones con Flx con aquellos que únicamente recibieron NaCl, si existe una mejora del EP por parte del grupo con el fármaco ($p \leq 0.0001$), al igual que al comparar los ratones estimulados con los ratones del grupo Sham ($p \leq 0.05$) tal como se puede observar en la figura 5 Derecha. El ANOVA de una vía produjo los siguientes valores: $F_{6,33}=12.71$, $p < 0.0001$). En conjunto, estos resultados indican que los ratones de las cepas Balb/C y Swiss

Webster presentan alteraciones en la condición de pelaje cuando se exponen a ECI. Sin embargo, los ratones de la cepa Swiss Webster mostraron menor afectación en la condición de pelaje cuando se compararon con los ratones de la cepa Balb/C ($t=3.57$, $df=13$, $p=0.0034$) aunque los tratamientos con Flx o con EMTr sólo redujeron las alteraciones en la condición del pelaje producidas por el estrés, en los ratones de la cepa Balb/C.

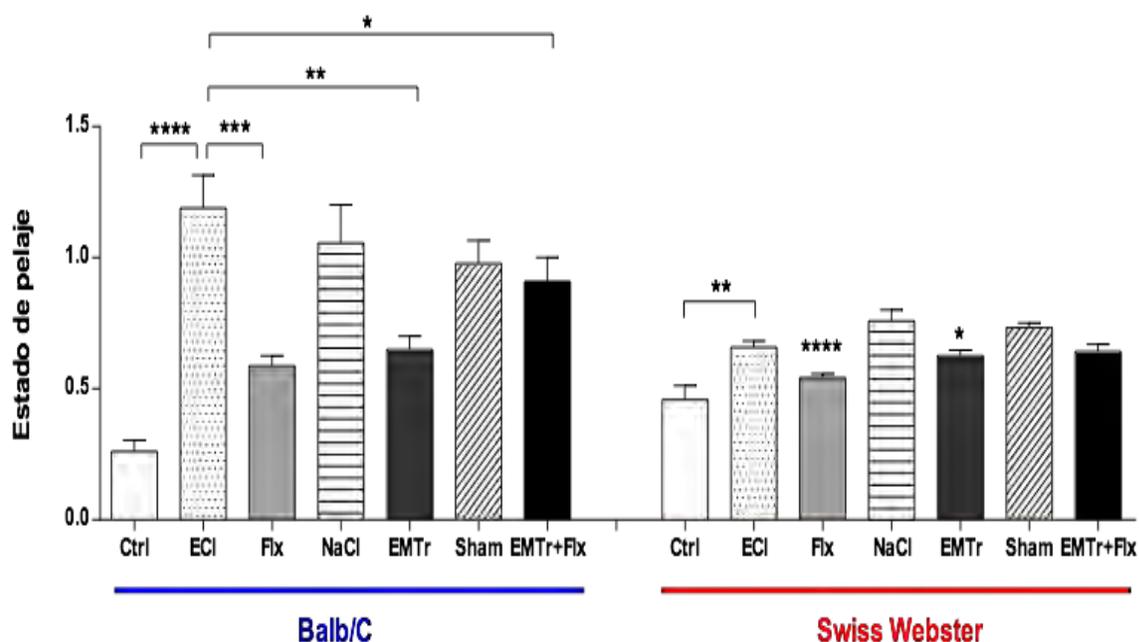


Fig. 5. Estado de pelaje de los ratones a través del tiempo, durante el protocolo de ECI (barra roja) y la aplicación del tratamiento farmacológico y EMTr (azul). A. Balb/C, B. Swiss Webster. Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n= 6-10$

2. Actividad motora en Rotarod.

En la prueba de Rotarod, los datos obtenidos de la cepa Balb/C muestran que los ratones que fueron expuestos al ECI sin ninguna intervención terapéutica, presentan un menor tiempo de permanencia en el aparato a comparación de los ratones que no fueron expuestos al estrés ($p \leq$

0.05), mientras que los ratones que recibieron el tratamiento con Flx aumentan el tiempo de permanencia en el Rotarod, en comparación con los ratones del grupo ECI ($p \leq 0.0001$) y NaCl ($p \leq 0.001$); de forma similar, los ratones tratados con EMTr también aumentan el tiempo de permanencia en comparación con el grupo ECI ($p \leq 0.001$) y Sham ($p \leq 0.001$), sin embargo, de manera interesante no se observa un aumento en el tiempo de permanencia en el grupo con ambos tratamientos (EMTr+Flx) tal como se puede observar en la Fig. 6 Izquierda. ANOVA una vía, $F_{6,49} = 3,293$, $p \leq 0.0001$. En cuanto a la cepa Swiss Webster, no se encontraron cambios estadísticamente significativos en el tiempo de permanencia en el rotarod entre los diferentes grupos (Fig. 7 B).

En general, estos datos nos sugieren que la exposición al ECI disminuye la capacidad motora en los ratones de las cepa Balb/C pero aparentemente no en la Swiss Webster, siendo los ratones de la cepa Balb/C los más sensibles al efecto del ECI en la capacidad motora, respecto a los ratones de la cepa Swiss Webster. ($t=2.210$ $gl=12$, $p=0.0473$) y que esta disminución en la actividad motora presentada en la cepa Balb/C es revertida por los grupos tratados con Flx y EMTr, pero no aquellos con la combinación de ambos tratamientos.

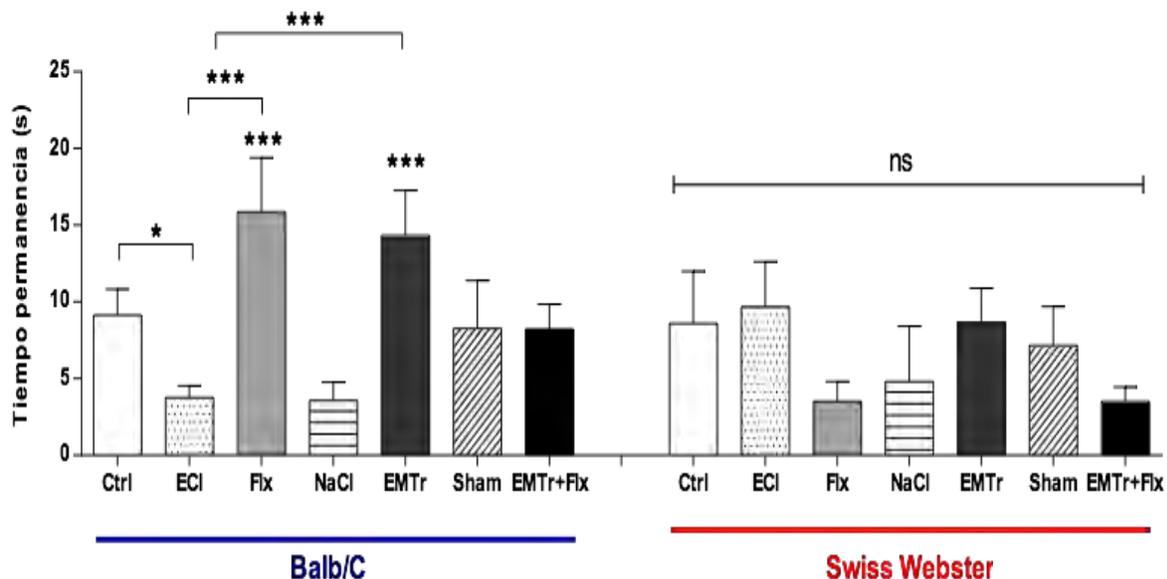


Fig 6. Tiempo de permanencia en el Rotarod y velocidad máxima alcanzada en el aparato por los ratones de cada cepa A. Balb/C, B. Swiss Webster. ANOVA una vía, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n = 6-10$

3. Conductas de acicalamiento con la prueba de Acicalamiento artificial.

Referente a las conductas hedónicas y de autocuidado, el ST revela que los ratones Balb/C que fueron sometidos al protocolo de ECI sin ninguna intervención terapéutica, tienen una mayor latencia para iniciar la conducta de acicalamiento, respecto al grupo Ctrl sin estrés ($p \leq 0.001$), este efecto es revertido en los grupos Flx ($p \leq 0.05$), EMTr ($p \leq 0.001$) y EMTr+Flx ($p \leq 0.05$), los cuales tienen una menor latencia a comparación del grupo ECI, tal como se observa en la Fig.7 A (ANOVA una vía: $F_{6, 53} = 17.40$, $p \leq 0.0001$). Referente a la duración total de acicalamiento, existe una cierta tendencia por parte de los ratones del grupo ECI a presentar un menor tiempo de acicalamiento a comparación del grupo Ctrl, sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa. No obstante, la aplicación de la EMTr aumenta significativamente el tiempo de acicalamiento respecto al grupo ECI ($p \leq 0.05$). y al grupo Sham ($p \leq 0.05$), concerniente a los ratones tratados con EMTr+Flx, se puede observar una tendencia a aumentar el tiempo de acicalamiento total a comparación del grupo ECI, sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo. (Fig.7 B) ANOVA una vía: $F_{6, 34} = 3.949$, $p = 0.0042$.

En cuanto a los ratones Swiss Webster, existe un incremento en la latencia al primer episodio de acicalamiento, por parte del grupo ECI a comparación del grupo Ctrl ($p \leq 0.05$), efecto que disminuye en los ratones con Flx ($p \leq 0.05$), EMTr ($p \leq 0.05$) y EMTr+Flx ($p \leq 0.05$) (Fig. 7 C) ANOVA una vía, Swiss Webster: $F_{6, 22} = 4.353$, $p = 0.004$. Mientras que referente al tiempo total de acicalamiento. no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Fig. 7 D).

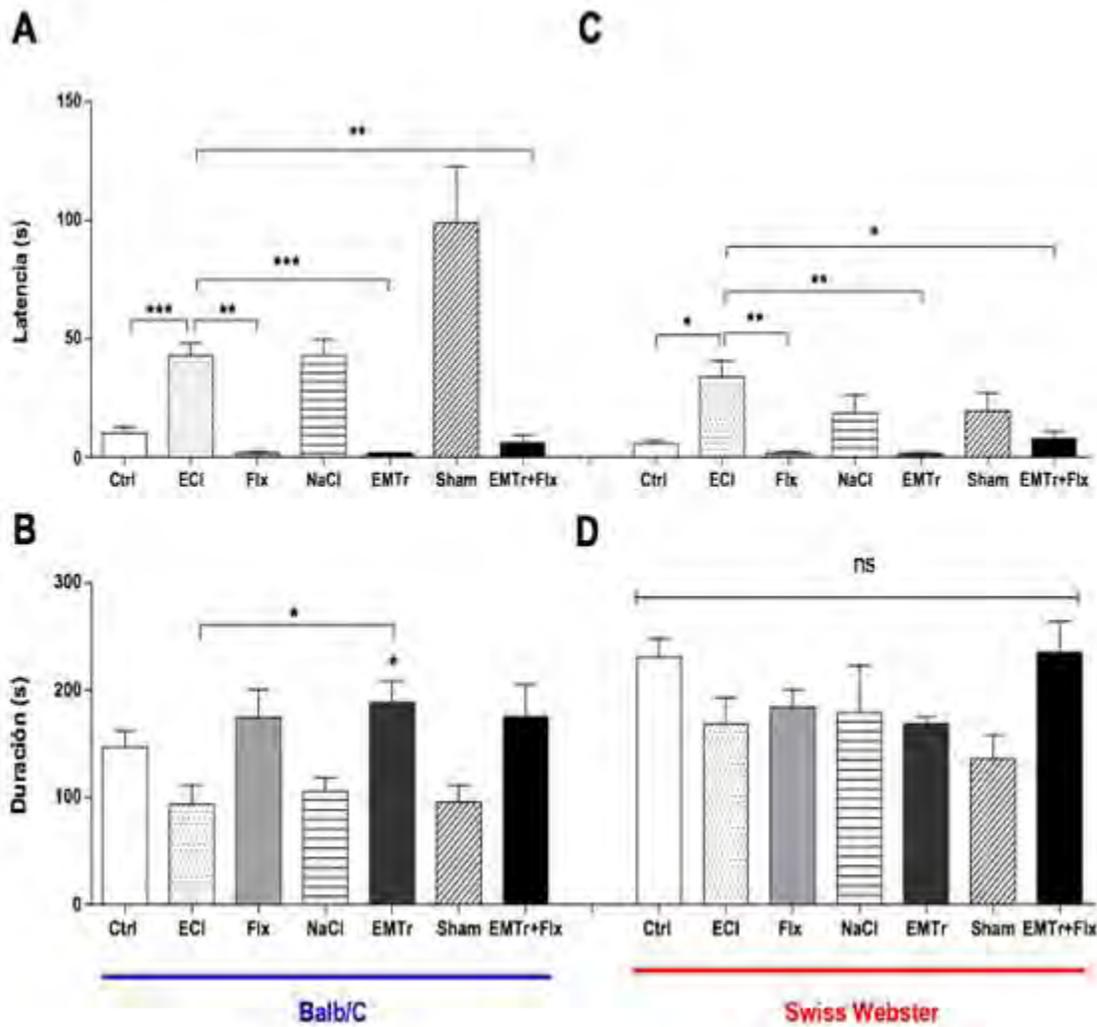


Fig. 7. Parámetros de la prueba de “Grooming artificial” Arriba: Latencia al primer episodio de acicalamiento. Abajo: Tiempo total de acicalamiento en ratones de la cepa Balb/C y Swiss Webster. Kruskal Wallis, $\alpha = 0.05$ y Newman Keuls, $\alpha = 0.05$ respectivamente. $n=6-10$

4. Desesperanza en Nado forzado (NF)

Los resultados de la prueba de NF en ratones Balb/C muestran que existe una reducción en la latencia al comienzo del primer episodio de inmovilidad por parte de los ratones estresados que no recibieron tratamiento, a comparación de los ratones control ($p \leq 0.05$), dicho efecto aparentemente es revertido por la EMTr a 5 Hz ($p \leq 0.01$), y el tratamiento combinado con Flx+EMTr ($p \leq 0.01$), además, también se encontró que los ratones estimulados incrementaron

significativamente su latencia al primer episodio de inmovilidad a comparación de los ratones Sham ($p \leq 0.001$), tal como se ve en la Fig. 8 A.

En cuanto al tiempo de inmovilidad total, se observa que existe un aumento por parte del grupo ECI, a comparación del grupo Ctrl ($p \leq 0.001$) y que este efecto se ve disminuido en los ratones tratados con Flx ($p \leq 0.001$) y EMTr ($p \leq 0.0001$). De igual manera, también se reporta una disminución en el tiempo de inmovilidad por parte del grupo con Flx a comparación del grupo NaCl ($p \leq 0.05$), al igual que ocurre por parte del grupo EMTr a comparación del grupo Sham ($p \leq 0.01$). (ANOVA una vía, $F = 6.638$, $p < 0,0001$. (Fig. 8 B)

Por otra parte, los resultados de los ratones Swiss Webster, nos sugieren que existe una cierta tendencia por parte de los ratones del grupo ECI a presentar una latencia menor al primer episodio de inmovilidad, a comparación de los ratones control, aunque esta disminución no es estadísticamente significativa, por el contrario, se puede observar que los ratones tratados con Flx ($p \leq 0.05$), EMTr ($p \leq 0.05$), y la combinación de ambos tratamientos (EMTr+Flx) ($p \leq 0.05$), aumentan la latencia a presentar el primer episodio de inmovilidad, a comparación de los ratones que fueron únicamente estresados (Fig. 8 C). Por su lado, referente al tiempo de inmovilidad total, en la Fig. 8 D, se puede observar que los ratones del grupo ECI presentan un incremento significativo en este parámetro a comparación de grupo Ctrl ($p \leq 0.01$) y que este aumento en la inmovilidad total es disminuido en los ratones tratados con Flx ($p \leq 0.01$), EMTr ($p \leq 0.01$). y EMTr+Flx ($p \leq 0.0001$). ANOVA una vía: $F_{6, 26} = 7.450$, $p = 0.0001$.

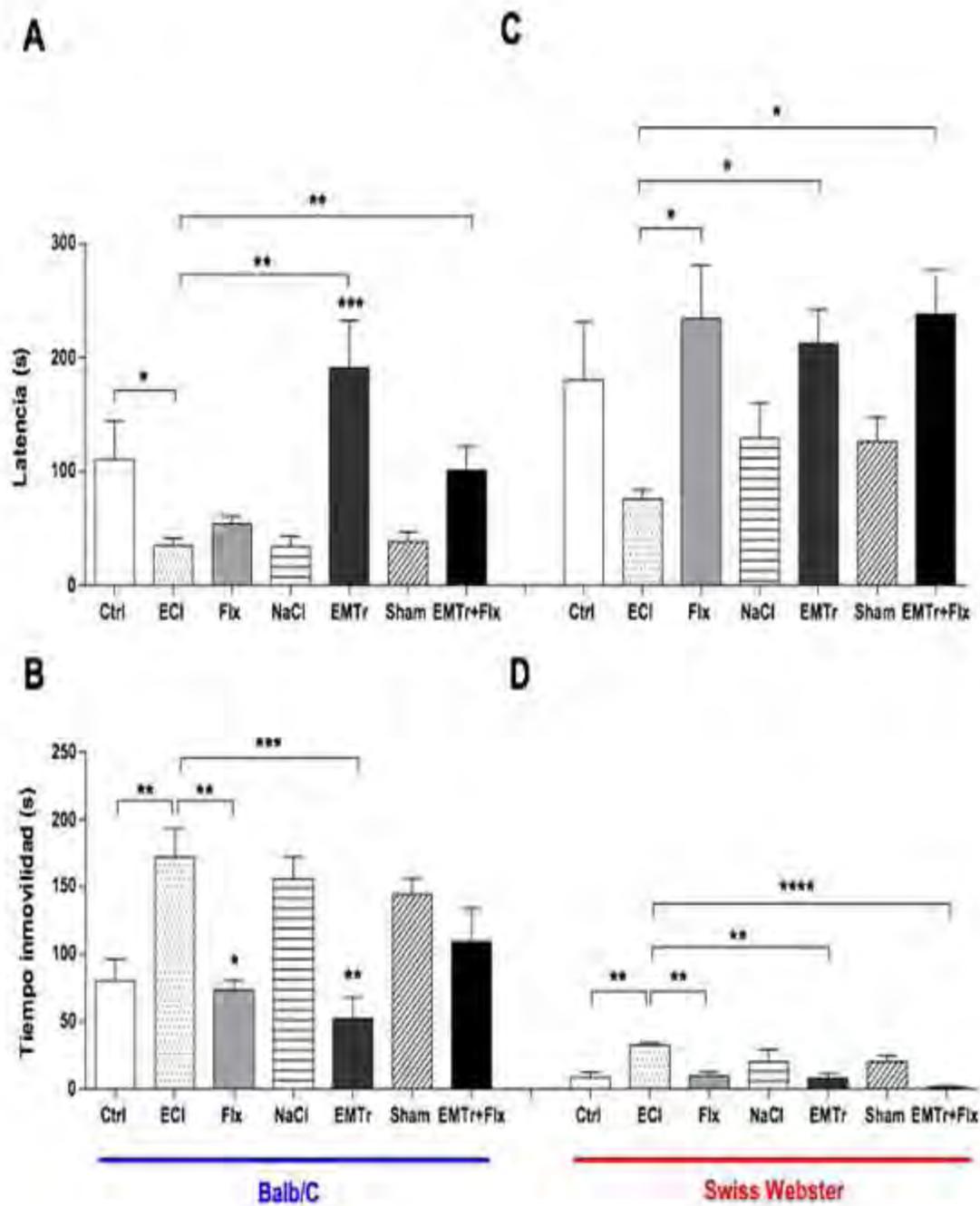


Fig. 8. Parámetros de nado forzado evaluados en ratones Balb/C y Swiss Webster. Arriba: Latencia al primer episodio de inmovilidad. Abajo: Tiempo total de inmovilidad. ANOVA de una vía, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n=6-10$.

VII. DISCUSIÓN.

La depresión es uno de los desórdenes afectivos más comunes que en los últimos años se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Dada la complejidad de esta enfermedad, existen muchas formas de intervención terapéutica para disminuir sus síntomas, sin embargo, existe un considerable porcentaje de la población de pacientes que no remite aún con estos tratamientos. Como alternativa a ello, la EMTr ha surgido como un nuevo método para disminuir los síntomas de la depresión, a tal grado que a partir del 2009 la FDA la aprobó como un efectivo tratamiento antidepresivo. En la clínica, los protocolos más estudiados se basan en altas frecuencias, a partir de los 10 hasta los 25 Hz, sin embargo, existen algunos estudios en humanos que revelan que la frecuencia de 5 Hz tiene la misma eficiencia terapéutica que algunas de las frecuencias más altas probadas (20 Hz) con la ventaja, de que se generan menos molestias al momento de la aplicación, así como que también se disminuye la probabilidad de la inducción de crisis convulsivas (Schulze-Rauschenbach 2005) Por otro lado, existen trabajos en humanos que indican que el genotipo de los individuos influye en la respuesta al tratamiento antidepresivo con EMTr (1, 15 y 20 Hz) (Gershon, Dannon, y Grunhaus 2003) .Sin embargo, no hay evidencia preclínica que explore este campo con EMTr a 5 Hz a pesar de la relevancia clínica de este protocolo. Es por lo que en este trabajo se evaluó y comparo el efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz en ratones de una cepa “outbred” (Balb/C) y una cepa “inbred” (Swiss Webster), así como también se comparó la sensibilidad de estas cepas, al desarrollo de conductas tipo depresivas a partir del protocolo de ECI.

1. Diferencias entre cepas a la susceptibilidad ECI y al efecto antidepresivo de la EMTr

Los ratones de la cepa Balb/C son más sensibles a los efectos del ECI en el desarrollo de conductas tipo depresivas (deterioro en el estado de pelaje, retardo psicomotor, abulia y anhedonia), a comparación de los ratones Swiss Webster. Esta diferencia en la sensibilidad al estrés y a la susceptibilidad para el desarrollo de conductas tipo depresivas, puede deberse al fondo genético de cada cepa, ya que los individuos de las cepas “inbred”, como la Balb/C, se caracterizan por ser individuos genéticamente idénticos, con poca variación genética, lo cual

los hace más susceptibles a los efectos de factores ambientales, tales como el estrés (Yalcin, Belzung, y Surget 2008). Por su parte, es bien conocido que las cepas del tipo “outbred”, como la Swiss Webster son cepas exogámicas que se caracterizan por una gran variedad genética, dentro de la cual puede haber subpoblaciones de ratones sensibles o no al estrés (Strekalova *et al.* 2004). De tal manera que la heterogeneidad genética de esta cepa puede fortalecer sus diferencias individuales y con ello brindarle a estos organismos determinada resistencia al estrés (Yalcin, Belzung, y Surget 2008). Por otro lado, la EMTr tiene un efecto antidepresivo en ambas cepas, sin embargo, este efecto se observa mejor en los ratones Balb/C, debido a que estos ratones reproducen más claramente conductas tipo depresivas, a comparación de los ratones Swiss Webster, tal como ya se ha reportado anteriormente con otras frecuencias de EMTr (Yalcin, Belzung, y Surget 2008).

2. Efecto del ECI y la EMTr en las conductas de autocuidado a través de la evaluación del EP.

El estado de pelaje fue evaluado semanalmente durante la exposición al protocolo de ECI y la administración de los tratamientos (Flx, EMTr), este parámetro es un buen indicador de conductas de motivación y autocuidado, el cual tiene validación farmacológica a través del uso de distintos fármacos antidepresivos (Santarelli *et al.* 2003) En nuestro trabajo, se observó que la exposición constante al estrés deteriora el EP en ambas cepas, siendo la cepa Balb/C la más sensible a este efecto, tal como lo reportaron Yalcin y colaboradores en el 2008, quienes utilizando las mismas cepas y encontraron un mayor deterioro del EP en ratones Balb/C expuestos a seis semanas de ECI, a comparación de los ratones Swiss Webster que también fueron estresados (Yalcin, Belzung, y Surget 2008). Por otro lado, nuestros datos también sugieren que la Flx y la EMTr son capaces de mejorar las conductas de autocuidado y de revertir el deterioro del EP causado por el ECI en ambas cepas. El efecto positivo de la Flx sobre el EP de ratones expuestos a estrés ya ha sido reportado previamente por otros autores (Santarelli *et al.* 2003) (Tanti *et al.* 2012), (Yalcin, Belzung, y Surget 2008), (Isingrini *et al.* 2010). Sin embargo, el efecto positivo de la EMTr, a 5 Hz, o con alguna otra frecuencia, sobre este parámetro aún no se ha reportado y podría sugerir el potencial efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz.

3. Efecto del ECI y la EMTr (5 Hz) en la actividad motora.

El cansancio excesivo, la fatiga y el retardo psicomotor, forman parte del cuadro clínico de la depresión, estas características podrían ser comparadas, de manera análoga, con la disminución de la actividad motora en modelos animales de depresión, la cual puede ser medida con ayuda del Rotarod (Deacon 2013). En esta prueba, nuestros datos apuntan que el estrés disminuye la actividad motora en los ratones Balb/C que no recibieron algún tipo de tratamiento. Esto es consistente con los datos obtenidos por Kurumaji en el 2011 (Kurumaji, Umino, y Nishikawa 2011) y con lo reportado por Wells en el 2017 (Wells *et al.* 2017), quienes llegan a este mismo resultado utilizando un protocolo de estrés crónico social en ratones evaluando su actividad motora a través de un actímetro. Por otro lado, nuestros datos también sugieren que la Flx y la EMTr revierten la disminución en la coordinación motora generada por el estrés, y que la combinación de ambos tratamientos parece anular este efecto positivo. En investigaciones previas, se ha señalado que la EMTr a distintas frecuencias tiene la capacidad de mejorar la actividad motora en distintos modelos de enfermedades del movimiento, tales como el Parkinson (Dong *et al.* 2015) y la discapacidad motora por accidente cerebro-vascular temprano (Yoon *et al.* 2015), en tales trabajos se señala que la EMTr a 1 y 10 Hz aumenta la velocidad y el tiempo de permanencia de los animales estimulados, en la prueba de Rotarod, tal como lo encontramos en nuestro trabajo, con la diferencia de que empleamos una frecuencia de 5 Hz, indicando que esta frecuencia al igual que las antes señaladas, mejora la actividad motora, y sugiere que la EMTr podría ser usada como una opción válida para el tratamiento de algunas patologías del movimiento.

4. Efecto del ECI y la EMTr en el desarrollo de anhedonia.

La anhedonia puede ser definida como la falta de capacidad para experimentar placer y puede ser asociada con la apatía y la ausencia de satisfacción ante estímulos placenteros (Grillo 2016). Para evaluar esta característica de la depresión en nuestro modelo, nosotros utilizamos la

prueba de “acicalamiento artificial” también conocida como “Splash test”, la cual considera la disminución del acicalamiento y el aumento en la latencia para realizar esta actividad, como un indicador de la pérdida de interés de actividades placenteras. En nuestros resultados encontramos que la exposición constante al estrés induce anhedonia, esto se ve reflejado en el aumento en la latencia de acicalamiento por parte del grupo ECI a comparación del grupo Ctrl, tanto en ratones Balb/C como en Swiss Webster, lo cual es consistente con lo reportado previamente por el equipo de trabajo de Tanti (Tanti *et al.* 2012) y Yalcin (Yalcin, Belzung, y Surget 2008) utilizando igualmente ratones Balb/C expuestos a ECI.

El efecto negativo que tiene el estrés sobre las conductas hedónicas y de motivación parece ser revertido por la administración de Flx, la aplicación de EMTr y el tratamiento conjunto de EMTr+Flx en ratones Balb/C, y únicamente la aplicación de Flx y de EMTr en los ratones Swiss Webster. Como fármaco antidepressivo, el efecto de la Flx en la disminución de la anhedonia y el mejoramiento en las conductas de autocuidado ya ha sido ampliamente estudiado, tanto en investigaciones con humanos (Yalcin, Belzung, y Surget 2008), como a nivel preclínico, en el último caso se ha utilizado la prueba de ST (Yoon *et al.* 2015), (Enginar, Hatipoğlu, y Firtina 2008), y otros paradigmas conductuales (Isingrini *et al.* 2010). Por otro lado, el efecto positivo de la EMTr sobre la disminución de la anhedonia en modelos animales de depresión ha sido confirmada por otros estudios, la mayoría empleando protocolos de estimulación de 15 Hz (Feng *et al.* 2012) (Chen *et al.* 2015) y un solo trabajo utilizando frecuencias de 5 Hz (Peng *et al.* 2018). Por otro lado, nuestros resultados apuntan que el estrés genera un efecto diferencial entre cepas, dado que los ratones Balb/C son más sensibles al desarrollo de anhedonia, puesto que presentaron una mayor latencia y menos tiempo de acicalamiento, que los ratones Swiss Webster, datos similares fueron publicados por Yalcin y colaboradores en el 2008, en su estudio comparativo sobre la respuesta al ECI y a distintos fármacos antidepressivos en ratones de las dos cepas ya mencionadas, con la diferencia de que en el trabajo previamente mencionado no se reportaron cambios significativos en los parámetros de la prueba de ST en la cepa Swiss Webster a diferencia de nuestros resultados, en los cuales el ECI si indujo anhedonia en esta cepa de ratones, esto puede ser explicado por las diferencias en el ECI, ya que en nuestro trabajo el protocolo duro más tiempo y se utilizaron distintos tipos de estresores con mayor intensidad.

5. Efecto del ECI y la EMTr en el desarrollo de desesperanza.

La desesperanza es una conducta generada en modelos animales, análoga a la abulia en la depresión, es decir la pérdida de voluntad característica de pacientes con esta enfermedad. En este trabajo, se utilizó la prueba de NF para evaluar este comportamiento; los resultados obtenidos de ello apuntan a que el ECI induce desesperanza tanto en ratones Balb/C como en Swiss Webster, tal como se reporta en la literatura existente sobre el protocolo (Porsolt *et al.* 2001), (Petit-Demouliere, Chenu, y Bourin 2005), (Monteiro *et al.* 2015), (Nollet, Guisquet, y Belzung 2013) Por otro lado, en nuestro estudio también se corroboró el efecto antidepresivo de la Flx, tal como lo indican numerosos estudios roedores expuestos al ECI (Shen *et al.* 2016), (Petit-Demouliere, Chenu, y Bourin 2005). Respecto a la EMTr, encontramos que los ratones que recibieron este tratamiento, disminuyen las conductas de desesperanza generadas por el ECI, lo cual es consistente con lo reportado por Peng y colaboradores en el 2017, quien también reporta una reducción en el tiempo de inmovilidad en la prueba de NF (Peng *et al.* 2018). Otros autores también han reportado estos mismos resultados, pero en ratas Sprague Dawley y con distintas frecuencias de estimulación, tales como 10 Hz (Peng *et al.* 2017), 15 Hz (Feng *et al.* 2012) y 25 Hz (Fleischmann *et al.* 1995), lo cual puede sugerir que este efecto antidepresivo de la EMTr se da solo a altas frecuencias, siendo 5 Hz la frecuencia mínima para causarlo.

6. Efecto antidepresivo de la combinación de EMTr (5 Hz) y Flx.

En este estudio también se evaluó el efecto antidepresivo de la combinación de la EMTr y la Flx. Nuestros resultados indican que individualmente estos dos tratamientos tienen un efecto muy similar en la disminución de conductas tipo depresivas, tal como se ha reportado en otras investigaciones en humanos (Marcolin 2004). Sin embargo, en nuestros experimentos, el tratamiento combinado parece tener el mismo efecto que los tratamientos individuales. Esta idea puede ser apoyada por los datos publicados por Rossini y colaboradores en el 2005, los cuales señalan que la combinación de distintos fármacos (Velafaxina, Sertralina y Citalopram) con la EMTr a 15 Hz no mejoran su efecto antidepresivo, pero si acelera la respuesta a los

fármacos por parte de pacientes con depresión mayor (David *et al.* 2005). En contraste con ello, también existen algunas investigaciones que reportan que el tratamiento combinado de EMTr (15 Hz) y Quetiapina disminuye las conductas tipo depresivas en ratas expuestas a estrés crónico, aún más que los tratamientos individuales (Chen *et al.* 2015). Esta diferencia en los resultados puede ser debida a las distintas frecuencias de estimulación en los protocolos y a los diversos fármacos utilizados.

VIII. CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos de este trabajo sugieren que la EMTr a 5Hz genera un efecto antidepresivo comparable al de la Flx, tanto en ratones de la cepa Balb/C como en ratones de la cepa Swiss Webster. Siendo la cepa Balb/C la más sensible al desarrollo de estas conductas debido a su sensibilidad intrínseca al estrés. Por una parte, estos datos confirman que la carga y heterogeneidad genética aunado a factores ambientales como el estrés crónico, son factores importantes para el desarrollo de la depresión. Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían apoyar la evidencia clínica que existe sobre la eficacia de la EMTr a 5 Hz en el tratamiento de esta enfermedad. Aunado a ello, este trabajo también aporta información metodológica sobre las ventajas de utilizar cepas de ratones con diferente variabilidad genética en el estudio de los efectos de la EMTr en modelos animales de depresión, ya que en nuestro estudio fue más claro observar el efecto antidepresivo de la EMTr en los ratones Balb/C debido a su mayor sensibilidad al ECI que en los ratones Swiss Webster, en los cuales también se observó este efecto antidepresivo pero no en todas las pruebas aplicadas. También, en este trabajo se obtuvieron datos preclínicos que sugieren que el tratamiento combinado de la EMTr 5 Hz con la administración de Flx no aumentan su efecto antidepresivo a comparación de los tratamientos por separado, tal como se observa en los pacientes con depresión tratados con ambas intervenciones terapéuticas.

Finalmente cabe mencionar que una de las limitaciones de este trabajo es que únicamente se exploraron los efectos conductuales de la EMTr a 5 Hz, siendo aún desconocidos los

mecanismos neuroplásticos subyacentes al efecto antidepresivo de esta técnica. En este sentido, se reconoce la necesidad de investigar los posibles mecanismos de acción de la EMTr, por lo cual se propone explorar en futuros trabajos, el efecto de la EMTr a 5 Hz en distintos mecanismos celulares alterados en la depresión tales como la neurogénesis hipocámpica, dado la relevancia de este proceso en la neurobiología de esta enfermedad y en la regulación del efecto antidepresivo de distintos fármacos tales como la Flx.

IX. PERSPECTIVAS

1. Antecedentes.

Se ha sugerido que el efecto antidepresivo de la EMTr está asociado con distintos cambios plásticos a nivel neuronal (Kim *et al.* 2006), Existen estudios que demuestran que pulsos de 10 Hz inducen potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo de modelos de depresión y que este aumento en el LTP puede estar relacionado con el efecto antidepresivo de la estimulación (Kim *et al.* 2006). De igual manera, se sabe que la EMT induce neurogénesis hipocámpica tanto en condiciones fisiológicas (Ueyama *et al.* 2011) como en enfermedades psiquiátricas y bajo condiciones de estrés, tal como lo señala Feng y su equipo de trabajo en el 2012, quienes reportan que el empleo de estímulos de alta frecuencia (15 Hz) incrementa la proliferación celular en el hipocampo, los niveles de BDNF y la fosforilación de ERK1/2, en un modelo murino de depresión inducido por ECI (Feng *et al.* 2012). De forma similar, y utilizando el mismo modelo, Chen y colaboradores demostraron que la aplicación conjunta de Quetiapina con EMTr (15 Hz) promueve la proliferación e incrementan la expresión de la proteína ERK1/2 en su estado fosforilado en el hipocampo (Chen *et al.* 2015). Por el contrario, el equipo de Czéh en el 2002, reportan que la aplicación de EMTr a 20 Hz no produce cambios en la neurogénesis hipocámpica en ratas expuestas a estrés crónico psicosocial, pero si demuestran que existe una atenuación del sistema hipotalámico-pituitario-adrenocortical en estos animales (Czéh *et al.* 2002). Los resultados de estos estudios, si bien no son totalmente consistentes, sugieren que la génesis de nuevas neuronas en el hipocampo es un posible mecanismo por el cual la EMTr genera un efecto antidepresivo en algunos modelos de enfermedades psiquiátricas.

Observación que concuerda con la hipótesis neurogénica de la depresión mayor, la cual postula que existe un declive en la neurogénesis y una reducción en el volumen del hipocampo en el cerebro adulto, hecho que se ha demostrado contribuye a la patofisiología de la depresión (Sahay y Hen 2007),

Por otro lado, a pesar de que se tiene documentado el efecto antidepresivo de la EMTr, (tal como lo demostramos en este trabajo) se conoce de manera parcial, el efecto pro-neurogénico de la EMTr. Si bien, hay algunos trabajos que exploran esta área (Chen *et al.* 2015), los datos referente a ello son escasos y dirigidos únicamente a la EMTr a altas frecuencias, por lo que resulta importante generar más información acerca de la relación que tiene la neurogénesis hipocámpica en el efecto antidepresivo de este tipo de intervención a frecuencias mínimas (5 Hz) debido a las ventajas clínicas que la EMTr a 5 Hz genera, tal como ya se mencionó anteriormente. Es por ello que el objetivo de esta segunda fase de experimentación es evaluar el proceso de neurogénesis hipocampal asociado al efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz en un modelo de depresión inducido por ECI en ratones Balb/C.

2. Material y métodos.

Para cumplir con el objetivo propuesto en esta fase de experimentación, se emplearon los ratones Balb/C que se utilizaron en las pruebas conductuales de la primera fase de este trabajo, estos ratones fueron eutanizados mediante decapitación, dos horas después de la prueba de NF. Posteriormente se obtuvieron sus cerebro los cuales fueron seccionado en forma coronal y transversal para obtener cortes con hipocampos ventrales y dorsales de 40 μm de grosor siguiendo el método propuesto por Egeland y colaboradores (Egeland *et al.* 2017). Posteriormente, se realizaron inmunohistoquímicas para marcar células positivas a Doblecortina (DCX), un marcador de neuronas inmaduras, y a la proteína Ki67, un marcador de proliferación celular. división celular. Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, y fueron observados al microscopio para cuantificar el número de células positivas a Ki67 y a DCX. Estas últimas fueron clasificadas de acuerdo a su morfología, según lo reportado por Plümpe y colaboradores (Plümpe *et al.* 2006). Los datos obtenidos de estos experimentos son los siguientes:

3. Resultados preliminares.

DCX como marcador de neuronas inmaduras.

Los datos obtenidos de esta primera inmunohistoquímica muestran que existe una disminución en el número total de células positivas a DCX en los ratones que fueron expuestos al protocolo de ECI sin ningún tipo de intervención terapéutica, a comparación del grupo Ctrl ($p \leq 0.05$), mientras que, por el contrario, los ratones tratados con Flx aumentan el número total de células positivas a DCX, en comparación con el grupo ECI ($p \leq 0.001$), e inclusive, en comparación que el grupo Ctrl ($p \leq 0.05$). Un efecto similar se observa con los ratones que recibieron la EMTr, en los cuales existe un aumento en el número total de células positivas DCX, a comparación del grupo ECI ($p \leq 0.05$). y Ctrl. ($p \leq 0.05$), tal como se puede observar en la Figura 1. ANOVA una vía. $F_{(5,23)} = 6.294$, $p = 0.0008$.

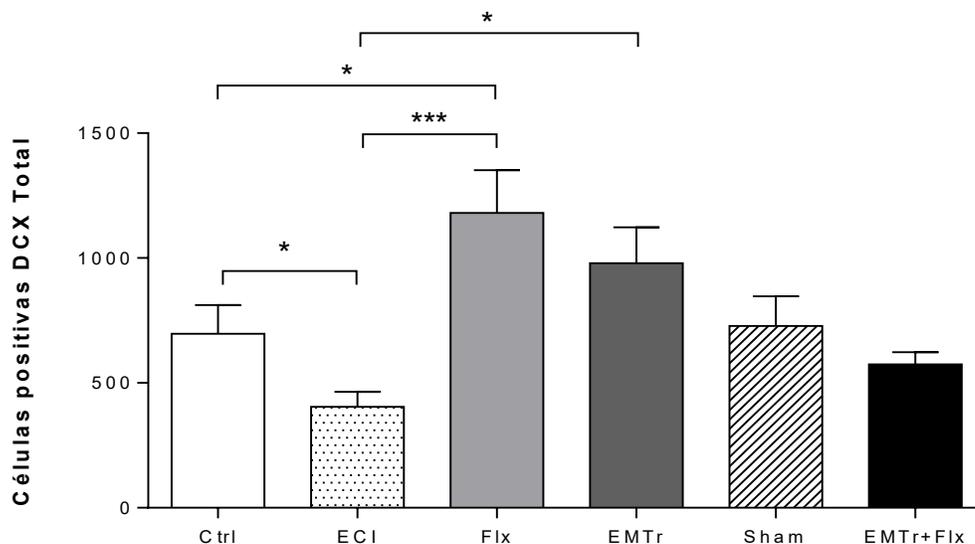


Fig. 1. Células totales positivas a DCX por tratamiento en ratones Balb/C. ($F_{5,24} = 6.025$, $p < 0.0010$). ANOVA una vía, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n=6$

Referente al número de células positivas a DCX cuantificadas por región del hipocampo (ventral y dorsal), los resultados obtenidos muestran que existe un aumento significativo de células

positivas a DCX en el hipocampo dorsal de los ratones tratados con Flx ($p \leq 0.001$) y con EMTr ($p \leq 0.05$), pero no en los demás grupos, aunque se muestra una tendencia al incremento de estas células en el hipocampo dorsal. Por otro lado, al comparar el número de células positivas a DCX en el hipocampo ventral entre los distintos grupos experimentales, no se observan diferencias significativas. Mientras que, al compararlo en el hipocampo dorsal, encontramos que los ratones tratados con Flx incrementan el número de células positivas a DCX a comparación del grupo ECI ($p \leq 0.001$) y Ctrl ($p \leq 0.01$). De igual manera, se observó un aumento en el número de células positivas a DCX en esta región hipocampal, por parte del grupo EMTr a comparación del grupo ECI ($p \leq 0.05$), tal como se puede observar en la Fig. 2. ANOVA de dos vías $F_{(5,53)} = 1.738$, $p = 0.1421$.

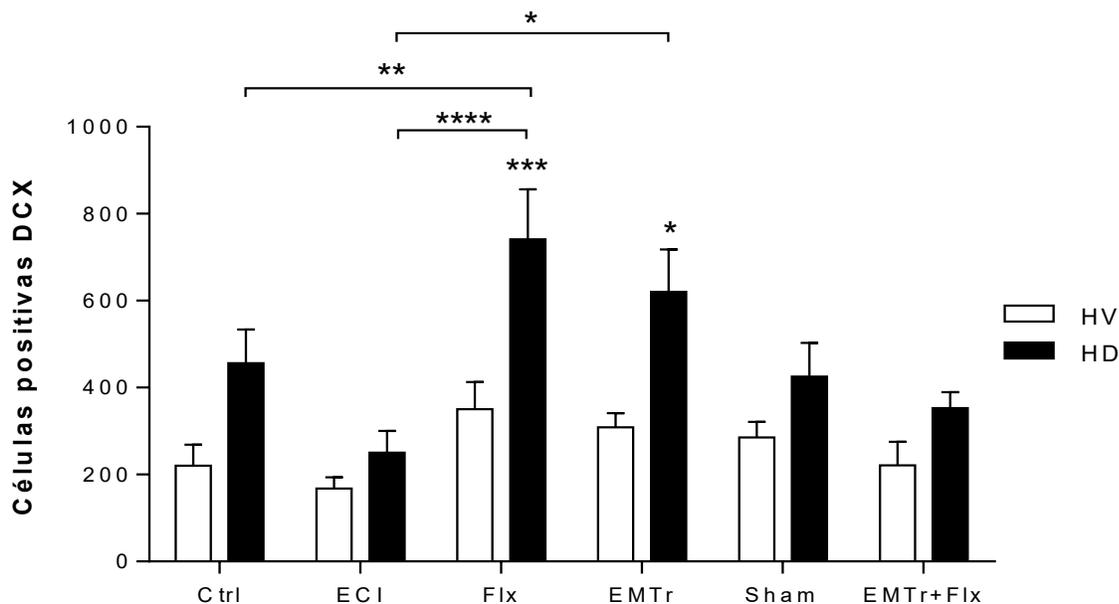


Fig. 2. Células positivas a DCX por región hipocampal en ratones Balb/C. HV: Hipocampo ventral, HD: Hipocampo dorsal. ($F_{5, 54} = 1.495$, $p = 0.2067$). ANOVA dos vías, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n=6$

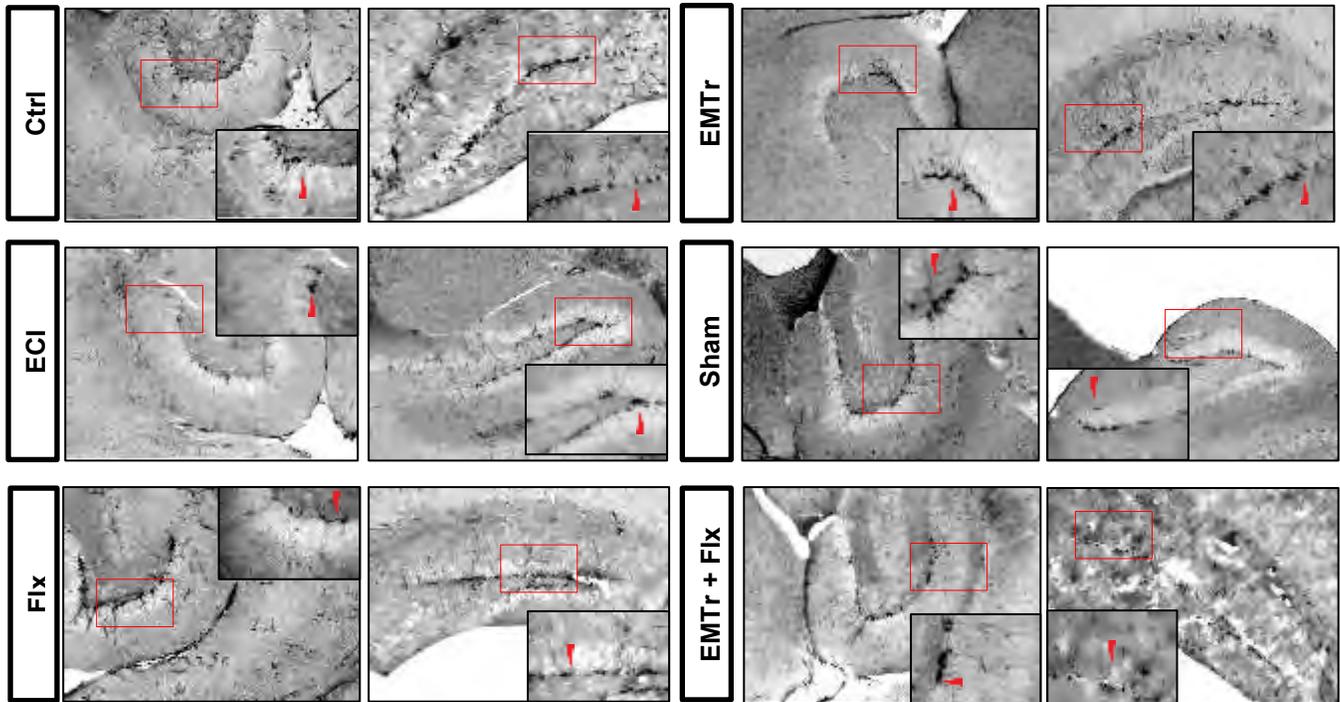


Fig. 3. Fotografías inmunohistoquímica DCX 1:2000 de los diferentes grupos experimentales. Izquierda: hipocampo ventral (HV). Derecha: hipocampo dorsal (HD). El recuadro rojo indica la zona donde el campo fue ampliado a 40x y la flecha roja indica el marcaje a DCX.

Respecto a la clasificación de estas células positivas a DCX en categorías (Categoría uno : soma sin ramificaciones o con pocas neuritas, categoría dos: célula con axón, pocas dendritas, y categoría tres: célula con múltiples ramificaciones, axón y árbol dendrítico bien definido) los datos muestran que la categoría uno es la más abundante en la mayoría de los grupos, a comparación de las categorías dos y tres (Ctrl C1 vs Ctrl C2: $p \leq 0.05$, Ctrl C1 vs Ctrl C3: $p \leq 0.05$, Flx C1 vs Flx C2: $p \leq 0.0001$, Flx C1 vs Flx C3: $p \leq 0.01$, EMTr C1 vs EMTr C2: $p \leq 0.0001$, EMTr C1 vs EMTr C3: $p \leq 0.01$, EMTr+Flx C1 vs EMTr+Flx C2: $p \leq 0.05$) a excepción de los grupos ECI y Sham, donde el número de células positivas a DCX de las tres categorías parece ser similar. Por otro lado, estos datos también nos demuestran que existe un aumento en el número de células positivas a DCX de la categoría uno, por parte de los ratones tratados con Flx, a comparación del grupo ECI ($p \leq 0.001$) y Ctrl ($p \leq 0.05$). De igual manera, también se puede observar que el grupo Flx además aumenta el número de células positivas a DCX de la categoría tres, a comparación del grupo ECI ($p \leq 0.001$)

Un efecto similar se observa en los ratones tratados con EMTr, los cuales incrementan el número de células positivas a DCX de la categoría uno, pero no de las demás categorías, a comparación de los ratones del grupo ECI ($p \leq 0.01$). ANOVA de dos vías. $F_{(10,83)} = 1.168$, $p=0.3242$.

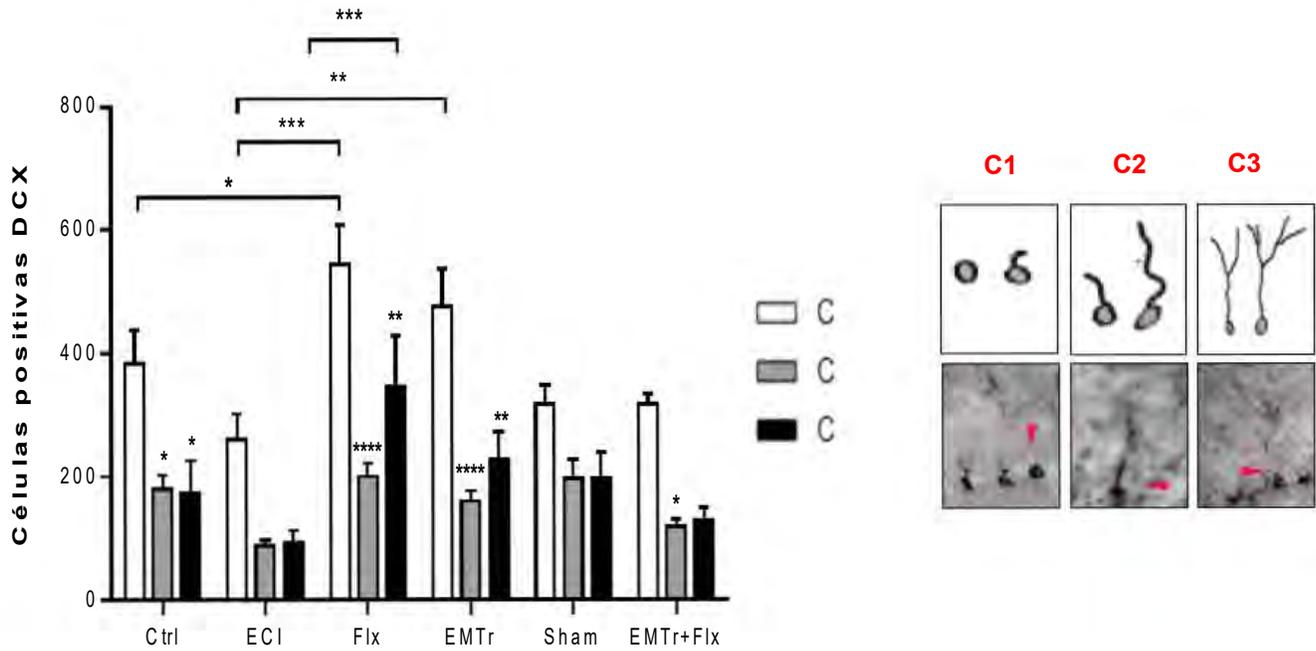


Fig. 4. Izquierda. Células positivas a DCX clasificadas por categoría morfológica en ratones Balb/C (Modificado de Ortiz-López, Pérez-Beltrán, y Ramírez-Rodríguez 2016). Derecha. Imágenes representativas de cada una de las categorías morfológicas. C1: Categoría uno (soma sin ramificaciones), C2: Categoría dos (Soma con axón y pocas dendritas), C3: Categoría tres (Soma con axón y árbol dendrítico bien desarrollado). ($F_{10,85} = 1.339$, $p = 0.2234$). ANOVA dos vías, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n=6$

Ki67 como marcador de proliferación celular.

Los resultados obtenidos de la inmunohistoquímica con Ki67 nos muestran que existe una reducción en la proliferación celular en los ratones que fueron expuestos a estrés sin ningún tratamiento, a comparación de los ratones Ctrl ($p \leq 0.01$), y que esta reducción en la proliferación celular se ve revertida por la Flx ($p \leq 0.05$). y por la EMTr ($p \leq 0.0001$). De igual forma, nuestros datos muestran que existe un aumento en la proliferación celular en el grupo tratado con Flx, a

comparación del grupo vehículo ($p \leq 0.05$), y en el grupo tratado con EMTr a comparación del grupo Sham ($p \leq 0.001$), tal como se puede observar en la figura 5. ANOVA una vía. $F_{(6,32)} = 9.816$, $p < 0.0001$.

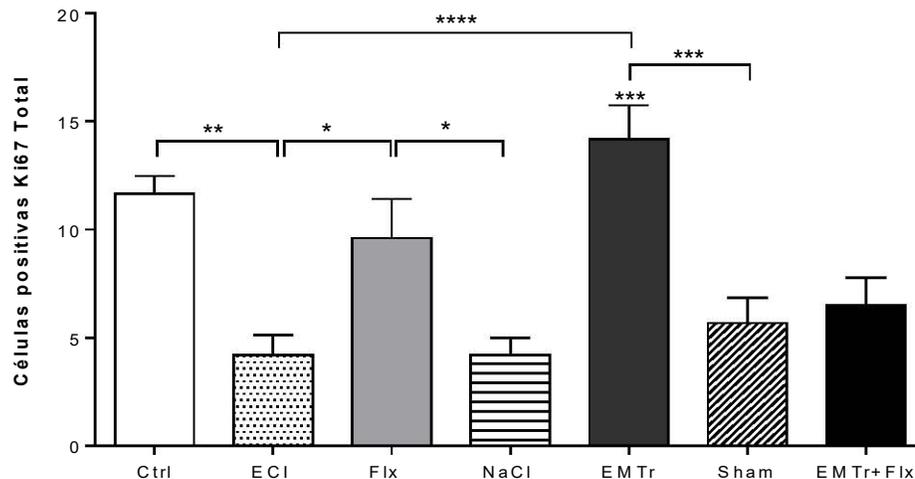


Fig. 5. Células totales positivas a Ki67 por tratamiento en ratones Balb/C. ($F_{6,33} = 9.474$, $p < 0.0001$). ANOVA una vía, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n=6$

Respecto al número de células positivas a Ki67 por región del hipocampo, los resultados obtenidos señalan que existe un incremento en la proliferación celular en el hipocampo dorsal, a comparación del hipocampo ventral, en los ratones tratados con EMTr ($p \leq 0.01$). Mientras que en los demás grupos se puede observar una tendencia similar. Sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo. En cuanto al número de células positivas a Ki67 en el hipocampo ventral, nuestros datos muestran que existe una disminución en la proliferación celular en los ratones del grupo ECI, a comparación de los ratones del grupo Ctrl ($p \leq 0.05$), y que este efecto se ve revertido por la Flx ($p \leq 0.05$), y la EMTr ($p \leq 0.01$). De igual forma, también encontramos que existe un aumento en el número de células positivas a Ki67 en el grupo Flx, a comparación del grupo NaCl, ($p \leq 0.05$), y en el grupo EMTr, a comparación del grupo Sham ($p \leq 0.01$). En cuanto al número de células positivas a Ki67 en el hipocampo dorsal, nuestros datos indican que existe un decremento en la división celular en los ratones expuestos únicamente al protocolo de ECI, a comparación de los ratones Ctrl ($p \leq 0.01$), y que esta disminución en la división celular se ve revertida por la EMTr ($p \leq 0.0001$), pero aparentemente no por la Flx. Finalmente, también encontramos un incremento en el número de células positivas

a Ki67 en el grupo EMTr, en relación con el grupo Sham ($p \leq 0.0001$), tal como se puede observar en la figura 6. ANOVA de dos vías. $F_{(6,61)} = 0.3835$, $p = 0.8868$.

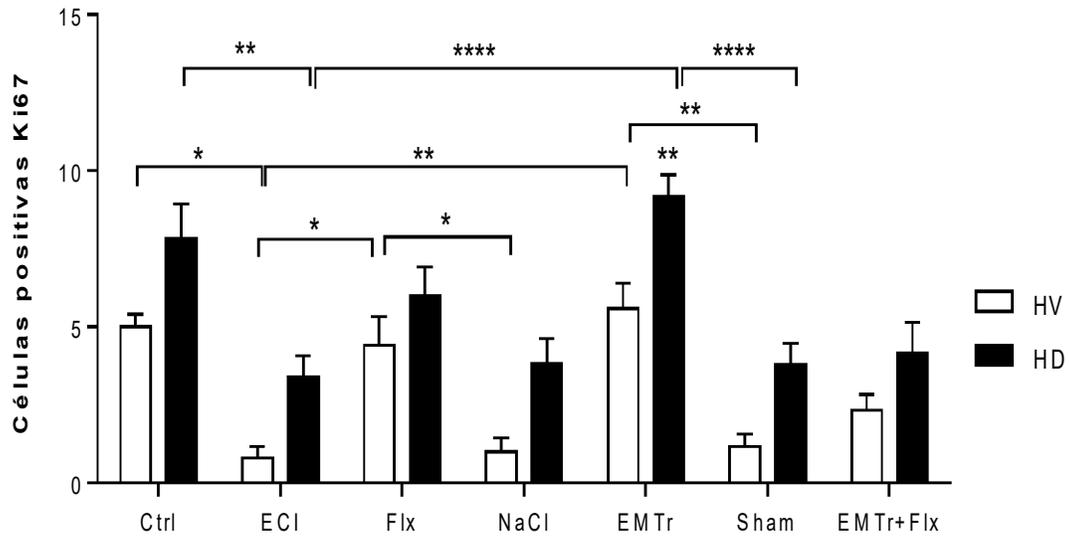


Fig. 6. Células positivas a Ki67 por región hipocampal en ratones Balb/C. HV: Hipocampo ventral, HD: Hipocampo dorsal. ($F_{6,62} = 0.4395$, $p = 0.8496$). ANOVA dos vías, Newman Keuls, $\alpha = 0.05$, $n=6$

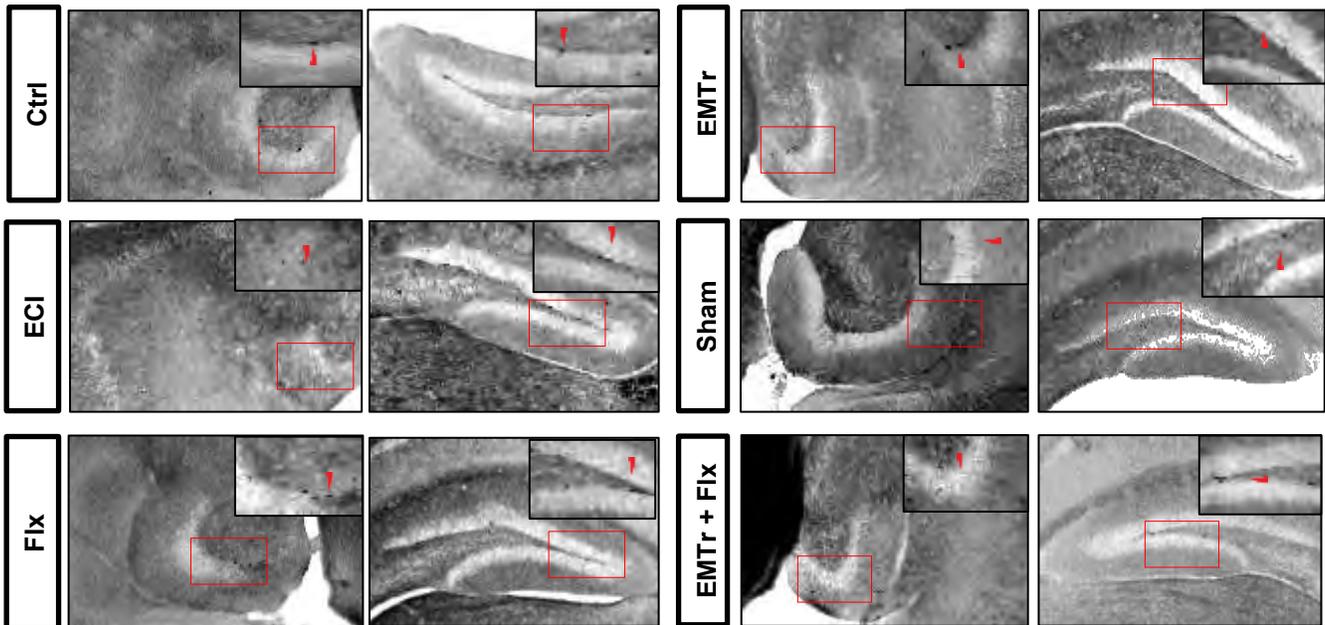


Fig. 7. Fotografías inmunohistoquímica Ki67 1:1500 de los diferentes grupos experimentales. Izquierda: hipocampo ventral (HV). Derecha: hipocampo dorsal (HD). El recuadro rojo indica la zona donde el campo fue ampliado a 40x y la flecha roja indica el marcaje a Ki67.

4. Conclusiones preliminares.

Los datos obtenidos de estas primeras inmunohistoquímicas apuntan a que la EMTr a 5Hz, así como la Flx, aumentan la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo, así como que también presentan un efecto pro-neurogénico y que coincide con los datos conductuales obtenidos en las pruebas anteriores y que da indicios de que la neurogénesis en el hipocampo puede estar involucrada en el efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz.

Estos primeros datos también sugieren que la exposición constante al estrés produce una disminución en la neurogénesis hipocámpal y en la proliferación celular, y que este efecto puede estar relacionado con la generación de conductas tipo depresivas inducidas por el protocolo de ECI.

Por otro lado, nuestros datos también indican que la mayoría de las células positivas a DCX que fueron cuantificadas, pertenecen a la categoría uno (neuronas en sus primeros estadios),

de igual manera, parece ser que el efecto pro-neurogénico de la Flx como de la EMTr, afecta principalmente a esta población de células, aunque cabe resaltar que la Flx también incrementa el número de células positivas a DCX pertenecientes a la categoría tres.

Respecto al número de células positivas a DCX y Ki67, de acuerdo con las diferentes regiones del hipocampo, nuestros datos sugieren que el efecto pro-neurogénico generado por la Flx y la EMTr se da principalmente en el hipocampo dorsal, al igual que el efecto positivo de la EMTr en el aumento la proliferación celular.

Finalmente, se reconoce las limitaciones de estos primeros datos, ya que se requiere el empleo de más marcadores que nos permitan identificar distintos estadios celulares y fases de la neurogénesis, tales como NeuN para neuronas maduras, Calbindina para integración sináptica, CldU para sobrevivencia y c-fos para activación neuronal. Aunado a ello también se propone analizar otros componentes celulares relacionados con la depresión, tales como las células gliales. De esta manera podremos obtener una perspectiva más amplia acerca de cómo la EMTr a 5 Hz es capaz de modular la neurogénesis hipocampal, así como la activación de la microglía, astrocitos y oligodendrocitos, para explicar su efecto terapéutico en la depresión.

X. BIBLIOGRAFIA.

Abraham, W. C. 2003. "How Long Will Long-Term Potentiation Last?" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358 (1432): 735–44.

doi:10.1098/rstb.2002.1222.

Alonso, R, G Griebel, G Pavone, J Stemmelin, G Le Fur, and P Soubrié. 2004. "Blockade of CRF1 or V1b Receptors Reverses Stress-Induced Suppression of Neurogenesis in a Mouse Model of Depression." *Molecular Psychiatry* 9 (3): 278–86.

doi:10.1038/sj.mp.4001464.

Armas-Castañeda, Gabriela, Josefina Ricardo-Garcell, Francisco Romo-Nava, Gerhard Heinze-Martin, and Jorge Julio González-Olvera. 2015. "Transcranial Magnetic

Stimulation: Antidepressant Efficacy and Three-Month Follow-Up.” *Brain Stimulation* 8 (2): 343. doi:10.1016/j.brs.2015.01.108.

Belzung, Catherine, and Maël Lemoine. 2011. “Criteria of Validity for Animal Models of Psychiatric Disorders: Focus on Anxiety Disorders and Depression.” *Biology of Mood & Anxiety Disorders* 1 (1). BioMed Central Ltd: 9. doi:10.1186/2045-5380-1-9.

Benjet, Corina, Dra Psicol, and Guilherme Borges. 2004. “La Depresión Con Inicio Temprano Prevalencia, Curso Natural y Latencia Para Buscar Tratamiento” 46 (5): 417–24.

Borges, Guilherme, and Psychiatric Survey. 2007. “Days Lost . R Esults From the M Exican Survey Of” 30 (5). doi:10.1002/npr.10051.

Brunelin, J, E Poulet, C Boeue, H Zeroug-Vial, T D’Amato, and M Saoud. 2007. “Efficacité de La Stimulation Magnétique Transcrânienne (RTMS) Dans Le Traitement de La Dépression: Revue de La Littérature. = Efficacy of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (RTMS) in Major Depression: A Review.” *L’Encéphale: Revue de Psychiatrie Clinique Biologique et Thérapeutique* 33 (2): 126–34. doi:10.1016/S0013-7006(07)91542-0.

Casellas, J. 2011. “Inbred Mouse Strains and Genetic Stability: A Review.” *Animal* 5 (1): 1–7. doi:10.1017/S1751731110001667.

Chen, Yi Huan, Rui Guo Zhang, Fen Xue, Hua Ning Wang, Yun Chun Chen, Guang Tao Hu, Ye Peng, Zheng Wu Peng, and Qing Rong Tan. 2015. “Quetiapine and Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Ameliorate Depression-like Behaviors and up-Regulate the Proliferation of Hippocampal-Derived Neural Stem Cells in a Rat Model of Depression: The Involvement of the BDNF/ERK Signal Pathway.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 136. Elsevier Inc.: 39–46. doi:10.1016/j.pbb.2015.07.005.

Chervyakov, Alexander V., Andrey Yu. Chernyavsky, Dmitry O. Sinityn, and Michael A. Piradov. 2015. “Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation.” *Frontiers in Human Neuroscience* 9 (June): 1–14. doi:10.3389/fnhum.2015.00303.

Chia, Ruth, Francesca Achilli, Michael F.W. Festing, and Elizabeth M.C. Fisher. 2005. “The

Origins and Uses of Mouse Outbred Stocks.” *Nature Genetics* 37 (11): 1181–86.
doi:10.1038/ng1665.

Cordero Andrey, Sequeira, Fornaguera Trías Jaime, and Artículo DE Revisión. 2009.
“Neurobiología de La Depresión.” *Revista Mexicana de Neurociencia*, 462–78.

Czéh, Boldizsár, Tobias Welt, Anja K. Fischer, Angelika Erhardt, Wolfram Schmitt, Marianne B. Müller, Nicola Toschi, Eberhard Fuchs, and Martin E. Keck. 2002. “Chronic Psychosocial Stress and Concomitant Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation: Effects on Stress Hormone Levels and Adult Hippocampal Neurogenesis.” *Biological Psychiatry* 52 (11): 1057–65. doi:10.1016/S0006-3223(02)01457-9.

David, Denis Joseph Paul, Caroline E. Renard, Pascale Jolliet, Martine Hascoët, and Michel Bourin. 2003. “Antidepressant-like Effects in Various Mice Strains in the Forced Swimming Test.” *Psychopharmacology* 166 (4): 373–82. doi:10.1007/s00213-002-1335-4.

Deacon, Robert M.J. 2013. “Measuring Motor Coordination in Mice.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 75: 1–8. doi:10.3791/2609.

Dong, Qiaoyun, Yanyong Wang, Ping Gu, Rusheng Shao, Li Zhao, Xiqi Liu, Zhanqiang Wang, and Mingwei Wang. 2015. “The Neuroprotective Mechanism of Low-Frequency RTMS on Nigral Dopaminergic Neurons of Parkinson’s Disease Model Mice.” *Parkinson’s Disease* 2015. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2015/564095.

Double-blind, Major Depressive Disorder A, Sham-controlled Trial, David Rossini, Lorenzo Magri, D Psy, Adelio Lucca, Silvia Giordani, Enrico Smeraldi, and Raffaella Zanardi. 2005. “Does RTMS Hasten the Response to Escitalopram, Sertraline, or Venlafaxine in Patients With Major Depressive Disorder? A Double-Blind, Randomized, Sham-Controlled Trial,” no. December: 1570–76.

Egeland, M, C Guinaudie, A Du Preez, K Musaelyan, P A Zunszain, C Fernandes, C M Pariante, and S Thuret. 2017. “Depletion of Adult Neurogenesis Using the Chemotherapy Drug Temozolomide in Mice Induces Behavioural and Biological Changes Relevant to Depression.” *Translational Psychiatry* 7 (4). Nature Publishing Group: e1101.
doi:10.1038/tp.2017.68.

- Enginar, Nurhan, Iclal Hatipoğlu, and Meftun Firtina. 2008. "Evaluation of the Acute Effects of Amitriptyline and Fluoxetine on Anxiety Using Grooming Analysis Algorithm in Rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 89 (3): 450–55. doi:10.1016/j.pbb.2008.02.001.
- Fa, L. 2002. "Bases Genéticas de La Vulnerabilidad a La Depresión Genetic Foundations of Vulnerability to Depression" 25.
- FDA. 2011. "Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Class II Special Controls Guidance Document: Electrocardiograph Electrodes," 1–15.
- Feng, Shu fang, Tian yao Shi, Fan-Yang, Wua ning Wang, Yun chun Chen, and Qing rong Tan. 2012. "Long-Lasting Effects of Chronic RTMS to Treat Chronic Rodent Model of Depression." *Behavioural Brain Research* 232 (1). Elsevier B.V.: 245–51. doi:10.1016/j.bbr.2012.04.019.
- Figure, Supplementary. 1984. "No Title No Title_2015" 8 (c): 1–4. doi:10.15713/ins.mmj.3.
- Fleischmann, Amos, Katrina Prolov, Jacob Abarbanel, and R. H. Belmaker. 1995. "The Effect of Transcranial Magnetic Stimulation of Rat Brain on Behavioral Models of Depression." *Brain Research* 699 (1): 130–32. doi:10.1016/0006-8993(95)01018-Q.
- George, Mark S., Ziad Nahas, Monica Molloy, Andrew M. Speer, Nicholas C. Oliver, Xing Bao Li, George W. Arana, S. Craig Risch, and James C. Ballenger. 2000a. "A Controlled Trial of Daily Left Prefrontal Cortex TMS for Treating Depression." *Biological Psychiatry* 48 (10): 962–70. doi:10.1016/S0006-3223(00)01048-9.
- George, Mark S, Ziad Nahas, Monica Molloy, Andrew M Speer, Nicholas C Oliver, Xing-bao Li, George W Arana, S Craig Risch, and James C Ballenger. 2000b. "P RIORITY C OMMUNICATIONS A Controlled Trial of Daily Left Prefrontal Cortex TMS for Treating Depression *" 3223 (00).
- Gershon, Ari A., Pinhas N. Dannon, and Leon Grunhaus. 2003. "Transcranial Magnetic Stimulation in the Treatment of Depression." *American Journal of Psychiatry* 160 (5): 835–45. doi:10.1176/appi.ajp.160.5.835.
- Grillo, Luigi. 2016. "A Possible Role of Anhedonia as Common Substrate For" 2016. doi:10.1155/2016/1598130.

- Gur, Eitan, Bernard Lerer, Louis D. Van De Kar, and Michael E. Newman. 2004. "Chronic RTMS Induces Subsensitivity of Post-Synaptic 5-HT1A receptors in Rat Hypothalamus." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 7 (3): 335–40. doi:10.1017/S1461145703003985.
- Hansen, R A, G Gartlehner, K N Lohr, B N Gaynes, and T S Carey. 2005. "Efficacy and Safety of Second-Generation Antidepressants in the Treatment of Major Depressive Disorder." *Ann.Intern.Med* 143 (1539–3704 (Electronic)): 415–26.
- Ikedo, Tetsuro, Masaru Kurosawa, Chikao Morimoto, Shigeo Kitayama, and Nobuyuki Nukina. 2013. "Multiple Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Neuropsychiatric Disorders." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436 (2). Elsevier Inc.: 121–27. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.017.
- Isingrini, Elsa, Vincent Camus, Anne Marie Le Guisquet, Maryse Pingaud, Séverine Devers, and Catherine Belzung. 2010. "Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice." *PLoS ONE* 5 (4). doi:10.1371/journal.pone.0010404.
- Jung, P., and U. Ziemann. 2009. "Homeostatic and Nonhomeostatic Modulation of Learning in Human Motor Cortex." *Journal of Neuroscience* 29 (17): 5597–5604. doi:10.1523/JNEUROSCI.0222-09.2009.
- Kim, Eun Joo, Woon Ryoung Kim, Sang Eun Chi, Kang Hee Lee, Eun Hye Park, Jeong Ho Chae, Soon Kwon Park, Hyun Taek Kim, and June Seek Choi. 2006. "Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Protects Hippocampal Plasticity in an Animal Model of Depression." *Neuroscience Letters* 405 (1–2): 79–83. doi:10.1016/j.neulet.2006.06.023.
- Klomjai, Wanalee, Rose Katz, and Alexandra Lackmy-Vallée. 2015. "Basic Principles of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) and Repetitive TMS (RTMS)." *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 58 (4). Elsevier Masson SAS: 208–13. doi:10.1016/j.rehab.2015.05.005.
- Kohn, Robert, Itzhak Levav, José Miguel, Caldas De Almeida, Benjamín Vicente, Laura Andrade, Jorge J Caraveo-anduaga, and Shekhar Saxena. 2005. "Los Trastornos

Mentales En América Latina y El Caribe : Asunto Prioritario Para La Salud Pública.”
Revista Panamericana de Salud Pública 18 (401): 229–40. doi:10.1590/S1020-49892005000900002.

Kuroda, Yuko, Nobutaka Motohashi, Hiroshi Ito, Shigeo Ito, Akihiro Takano, Toru Nishikawa, and Tetsuya Suhara. 2006. “Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on [11C]Raclopride Binding and Cognitive Function in Patients with Depression.” *Journal of Affective Disorders* 95 (1–3): 35–42. doi:10.1016/j.jad.2006.03.029.

Kurumaji, Akeo, Masakazu Umino, and Toru Nishikawa. 2011. “Effects of Novelty Stress on Hippocampal Gene Expression, Corticosterone and Motor Activity in Mice.” *Neuroscience Research* 71 (2). Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society: 161–67. doi:10.1016/j.neures.2011.06.006.

Layard, R. 2006. “The Depression Report: A New Deal for Depression and Anxiety Disorders” june. http://eprints.lse.ac.uk/818/1/DEPRESSION_REPORT_LAYARD.pdf.

Little, Alison. 2009. “Treatment-Resistant Depression.” *American Family Physician* 80 (2): 167–72. doi:10.1136/thx.2008.108217.

Loo, Colleen K., and Philip B. Mitchell. 2005. “A Review of the Efficacy of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) Treatment for Depression, and Current and Future Strategies to Optimize Efficacy.” *Journal of Affective Disorders* 88 (3): 255–67. doi:10.1016/j.jad.2005.08.001.

Lucki, Irwin, Ashutosh Dalvi, and Arthur J. Mayorga. 2001. “Sensitivity to the Effects of Pharmacologically Selective Antidepressants in Different Strains of Mice.” *Psychopharmacology* 155 (3): 315–22. doi:10.1007/s002130100694.

Magavi, Leela R., Irving M. Reti, and Roma A. Vasa. 2017. “A Review of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Adolescents with Treatment-Resistant Depression.” *International Review of Psychiatry* 0 (0). Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group: 1–10. doi:10.1080/09540261.2017.1300574.

Malaguti, Alessia, David Rossini, Adelio Lucca, Lorenzo Magri, Cristina Lorenzi, Adele Pirovano, Christina Colombo, Enrico Smeraldi, and Raffaella Zanardi. 2011. “Role of

COMT, 5-HT 1A, and SERT Genetic Polymorphisms on Antidepressant Response to Transcranial Magnetic Stimulation.” *Depression and Anxiety* 28 (7): 568–73. doi:10.1002/da.20815.

Malhi, G S, J Moore, and P McGuffin. 2000. “The Genetics of Major Depressive Disorder.” *Current Psychiatry Reports* 2 (2): 165–69. doi:10.1007/s11920-010-0150-6.Overview.

Marcolin, M A. 2004. “Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Is as Effective as Fluoxetine in the Treatment of Depression in Patients with Parkinson’s Disease,” 1171–75. doi:10.1136/jnnp.2003.027060.

Monteiro, Susana, Susana Roque, Daniela de Sá-Calçada, Nuno Sousa, Margarida Correia-Neves, and João José Cerqueira. 2015. “An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice.” *Frontiers in Psychiatry* 6 (FEB): 1–11. doi:10.3389/fpsy.2015.00006.

Nestler, Eric J, Michel Barrot, Ralph J Dileone, Amelia J Eisch, Stephen J Gold, and Lisa M Monteggia. 2002. “Neurobiology of Depression (Review Summaries)” 34: 13–25.

Nollet, Mathieu, Anne-Marie Le Guisquet, and Catherine Belzung. 2013. “Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice.” *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna (Editor-in-Chief) ... [et Al.]* Chapter 5 (June): Unit 5.65. doi:10.1002/0471141755.ph0565s61.

Nollet, Mathieu, Anne-Marie Le Guisquet, and Catherine Belzung. 2013. “Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice.” *Current Protocols in Pharmacology*, no. June: 1–17. doi:10.1002/0471141755.ph0565s61.

Ortiz-López, Leonardo, Carlos Pérez-Beltran, and Gerardo Ramírez-Rodríguez. 2016. “Chronic Administration of a Melatonin Membrane Receptor Antagonist, Luzindole, Affects Hippocampal Neurogenesis without Changes in Hopelessness-like Behavior in Adult Mice.” *Neuropharmacology* 103: 211–21. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.030.

Peng, Zheng wu, Fen Xue, Cui hong Zhou, Rui guo Zhang, Ying Wang, Ling Liu, Han fei Sang, Hua ning Wang, and Qing rong Tan. 2017. “Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Inhibits Sirt1/MAO-A Signaling in the Prefrontal Cortex in a Rat Model of Depression and

Cortex-Derived Astrocytes.” *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer US, 1–14. doi:10.1007/s11010-017-3193-8.

———. 2018. “Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Inhibits Sirt1/MAO-A Signaling in the Prefrontal Cortex in a Rat Model of Depression and Cortex-Derived Astrocytes.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 442 (1–2). Springer US: 59–72. doi:10.1007/s11010-017-3193-8.

Petit-Demouliere, Benoit, Franck Chenu, and Michel Bourin. 2005. “Forced Swimming Test in Mice: A Review of Antidepressant Activity.” *Psychopharmacology* 177 (3): 245–55. doi:10.1007/s00213-004-2048-7.

Philip, Noah S, S Louisa Carpenter, Samuel J Ridout, George Sanchez, Sarah E Albright, Audrey R Tyrka, Lawrence H Price, and Linda L Carpenter. 2015. “5 Hz Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation to Left Prefrontal Cortex for Major Depression.” *Journal of Affective Disorders* 186. Elsevier: 13–17. doi:10.1016/j.jad.2014.12.024.

Plümpe, Tobias, Dan Ehninger, Barbara Steiner, Friederike Klempin, Sebastian Jessberger, Moritz Brandt, Benedikt Römer, Gerardo Ramirez Rodriguez, Golo Kronenberg, and Gerd Kempermann. 2006. “Variability of Doublecortin-Associated Dendrite Maturation in Adult Hippocampal Neurogenesis Is Independent of the Regulation of Precursor Cell Proliferation.” *BMC Neuroscience* 7: 1–14. doi:10.1186/1471-2202-7-77.

Porsolt, Roger D., Geneviève Brossard, Carine Hautbois, and Sylvain Roux. 2001. “Rodent Models of Depression: Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice.” *Current Protocols in Neuroscience*, 1–10. doi:10.1002/0471142301.ns0810as14.

Ridding, Michael C., and John C. Rothwell. 2007. “Is There a Future for Therapeutic Use of Transcranial Magnetic Stimulation?” *Nature Reviews Neuroscience* 8 (7): 559–67. doi:10.1038/nrn2169.

Riggs, Lacey M, Steven J Nieto, Genesis Dayrit, Norma N Zamora, Kristi L Shawhan, Bryan Cruz, Brandon L Warren, and San Bernardino. 2014. “Social Defeat Stress Induces a Depression-like Phenotype in Adolescent Male C57BL/6 Mice” 17 (3): 247–55.

doi:10.3109/10253890.2014.910650.Social.

- Sahay, Amar, and René Hen. 2007. "Adult Hippocampal Neurogenesis in Depression." *Nature Neuroscience* 10 (9): 1110–15. doi:10.1038/nn1969.
- Santarelli, Luca, Michael Saxe, Cornelius Gross, Alexandre Surget, Fortunato Battaglia, Stephanie Dulawa, Noelia Weisstaub, et al. 2003. "Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants." *Science (New York, N.Y.)* 301 (5634): 805–9. doi:10.1126/science.1083328.
- Schulze-Rauschenbach, S. C. 2005. "Distinctive Neurocognitive Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation and Electroconvulsive Therapy in Major Depression." *The British Journal of Psychiatry* 186 (5): 410–16. doi:10.1192/bjp.186.5.410.
- Shen, Jun, Junjian Zhang, Min Deng, Yue Liu, Yuan Hu, and Lei Zhang. 2016. "The Antidepressant Effect of Angelica Sinensis Extracts on Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression Is Mediated via the Upregulation of the BDNF Signaling Pathway in Rats." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016. doi:10.1155/2016/7434692.
- Strekalova, Tatyana, Rainer Spanagel, Dusan Bartsch, Fritz A. Henn, and Peter Gass. 2004. "Stress-Induced Anhedonia in Mice Is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration." *Neuropsychopharmacology* 29 (11): 2007–17. doi:10.1038/sj.npp.1300532.
- Subiabre, Alexies Dagnino. 2012. "Modelos Animales Para El Estudio Del Estrés Y Las Conductas Depresivas." *Revista de Farmacología de Chile* 5 (1): 19–26.
- Surget, Alexandre, Michael Saxe, Samuel Leman, Yadira Ibarguen-Vargas, Sylvie Chalon, Guy Griebel, René Hen, and Catherine Belzung. 2008. "Drug-Dependent Requirement of Hippocampal Neurogenesis in a Model of Depression and of Antidepressant Reversal." *Biological Psychiatry* 64 (4): 293–301. doi:10.1016/j.biopsych.2008.02.022.
- Tanti, Arnaud, Quentin Rainer, Frederic Minier, Alexandre Surget, and Catherine Belzung. 2012. "Differential Environmental Regulation of Neurogenesis along the Septo-Temporal Axis of the Hippocampus." *Neuropharmacology* 63 (3). Elsevier Ltd: 374–84. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.04.022.

- Thielscher, Axel, and Thomas Kammer. 2004. "Electric Field Properties of Two Commercial Figure-8 Coils in TMS: Calculation of Focality and Efficiency." *Clinical Neurophysiology* 115 (7): 1697–1708. doi:10.1016/j.clinph.2004.02.019.
- Ueyama, Eiko, Satoshi Ukai, Asao Ogawa, Masakiyo Yamamoto, Shunsuke Kawaguchi, Ryouhei Ishii, and Kazuhiro Shinosaki. 2011. "Chronic Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Increases Hippocampal Neurogenesis in Rats." *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 65 (1): 77–81. doi:10.1111/j.1440-1819.2010.02170.x.
- Vega-Rivera, Nelly Maritza, Leonardo Ortiz-López, Ariadna Gómez-Sánchez, Julian Oikawa-Sala, Erika Monserrat Estrada-Camarena, and Gerardo Bernabé Ramírez-Rodríguez. 2016. "The Neurogenic Effects of an Enriched Environment and Its Protection against the Behavioral Consequences of Chronic Mild Stress Persistent after Enrichment Cessation in Six-Month-Old Female Balb/C Mice." *Behavioural Brain Research* 301. Elsevier B.V.: 72–83. doi:10.1016/j.bbr.2015.12.028.
- Wan, Deborah. 2012. "A Global Crisis." *World Federation of Mental Health*, 1–32.
- Wassermann, Eric M. 1998. "Risk and Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation: Report and Suggested Guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, June 5–7, 1996." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 108: 1–16. doi:10.1016/S0168-5597(97)00096-8.
- Wells, Audrey M., Elysia Ridener, Clinton A. Bourbonais, Woori Kim, Harry Pantazopoulos, F. Ivy Carroll, Kwang-Soo Kim, Bruce M. Cohen, and William A. Carlezon. 2017. "Effects of Chronic Social Defeat Stress on Sleep and Circadian Rhythms Are Mitigated by Kappa-Opioid Receptor Antagonism." *The Journal of Neuroscience* 37 (32): 7656–68. doi:10.1523/JNEUROSCI.0885-17.2017.
- Willner, Paul. 2016. "The Chronic Mild Stress (CMS) Model of Depression: History, Evaluation and Usage." *Neurobiology of Stress* 6. Elsevier Inc: 78–93. doi:10.1016/j.ynstr.2016.08.002.
- Willner, Paul, Richard Muscat, and Mariusz Papp. 1992. "Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression." *Neuroscience and Biobehavioral*

Reviews. doi:10.1016/S0149-7634(05)80194-0.

World Health Organization. 1992. "The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders." *International Classification* 10: 1–267. doi:10.1002/1520-6505(2000)9:5<201::AID-EVAN2>3.3.CO;2-P.

Yalcin, Ipek, Catherine Belzung, and Alexandre Surget. 2008. "Mouse Strain Differences in the Unpredictable Chronic Mild Stress: A Four-Antidepressant Survey." *Behavioural Brain Research* 193 (1): 140–43. doi:10.1016/j.bbr.2008.04.021.

Yan, Hua-Cheng, Xiong Cao, Manas Das, Xin-Hong Zhu, and Tian-Ming Gao. 2010. "Behavioral Animal Models of Depression." *Neuroscience Bulletin* 26 (4): 327–37. doi:10.1007/s12264-010-0323-7.

Yoon, Kyung Jae, Yong-Taek Lee, Pil-Wook Chung, Yun Kyung Lee, Dae Yul Kim, and Min Ho Chun. 2015. "Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Behavioral Recovery during Early Stage of Traumatic Brain Injury in Rats." *Journal of Korean Medical Science* 30 (10): 1496. doi:10.3346/jkms.2015.30.10.1496.

Zanardi, Raffaella, Lorenzo Magri, David Rossini, Alessia Malaguti, Silvia Giordani, Cristina Lorenzi, Adele Pirovano, Enrico Smeraldi, and Adelio Lucca. 2007. "Role of Serotonergic Gene Polymorphisms on Response to Transcranial Magnetic Stimulation in Depression." *European Neuropsychopharmacology* 17 (10): 651–57. doi:10.1016/j.euroneuro.2007.03.008.

Zhao, Lin, Huicong Ren, Shina Gu, Xiaodan Li, Cuihong Jiang, Juan Li, Mengmeng Zhang, et al. 2018. "RTMS Ameliorated Depressive-like Behaviors by Restoring HPA Axis Balance and Prohibiting Hippocampal Neuron Apoptosis in a Rat Model of Depression." *Psychiatry Research* 269. Elsevier B.V.: 126–33. doi:10.1016/j.psychres.2018.08.017.