



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ**

**ESTUDIO DE LA PERSISTENCIA DEL EFECTO TIPO ANTIDEPRESIVO DE LA
ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL REPETITIVA (5HZ) EN UN MODELO
MURINO DE DEPRESIÓN: IMPLICACIÓN DE LA NEUROPLASTICIDAD**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:
EUNICE RAZIEL ROCHA MARTÍNEZ**

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. MÓNICA FLORES RAMOS
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ**

**DR. DANIEL REYES HARO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2020



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.

AGRADECIMIENTO

Deseo aprovechar estas líneas para ofrecer mi gratitud a todas las personas que han hecho posible la realización de esta meta, un sueño con larga espera, pero que ha valido en su totalidad el esfuerzo y el tiempo invertidos en él, por el crecimiento obtenido, desde lo académico hasta lo personal.

Primero me gustaría agradecer al Dr. Gerardo Ramírez, mi tutor académico, por permitirme realizar el presente proyecto de investigación, a pesar de contar con poco tiempo para poder terminarlo. No sólo me abrió las puertas de su laboratorio, sino que me permitió desarrollarme en un ambiente profesional y cálido al mismo tiempo. Muchas gracias Doctor.

Quiero agradecer también a todas las personas que forman parte del laboratorio de Neurogénesis de INPRFM. A Q.F.B. Leonardo Ortiz, por la paciencia al explicarme las técnicas y su forma tan linda de amenizar las horas de trabajo. A la Dra. Edith Cabrera, no sólo por su ayuda, sino también por sus consejos y su amistad. A M.C. David Meneses y a Lic. En Psic. Andrea Granados, por tomarse el tiempo para que pudiera entender mi proyecto y sobre todo por la amistad que hemos forjado. A Q.F. Bt. Enrique Lugo, por su apoyo en momentos de extremo cansancio, por su amistad y cariño. A Q.F.B. Jorge Vásquez, por sus consejos, ayuda y amistad. A Med. Cir. Mabel Limón, a M.C. Natalia Hernández, Q.F.B. Guadalupe Reyes y a cada uno de los que forman el equipo de trabajo del laboratorio de Neurogénesis por ser personas extraordinarias no sólo al realizar sus labores, sino por la calidad humana que poseen, gracias. Me gustaría también dedicar unas palabras a los animales de laboratorio que dieron su vida para que pudiera realizar esta investigación, jamás podrán leer este texto, pero no está de más agradecer su servicio a la humanidad, gracias.

A Daniela Montes, Maestra en Ciencias (Neurobiología), y a Elías Perrusquia, que siempre me apoyaron, tanto en la maestría, como emocionalmente en momentos complicados, eternamente estaré agradecida por su cariño, paciencia y ayuda.

Al Dr. Victor Bautista de Lucio, gran amigo y ejemplo de vida que mucho tiempo antes de entrar a la maestría, me permitió adentrarme en el mundo de la ciencia, de igual manera quiero agradecer al M.C. Luis Antonio Bautista, por las largas charlas que tuvimos que abrieron mi mente y corazón, al Dr. Ángel Salas por los conocimientos que compartió conmigo y a todo el equipo de trabajo del Dr. Victor, con los que tuve la fortuna de convivir.

Gracias también a la Dra. Maricela Luna, por ayudarme en el proceso de reiniciar la maestría y por las palabras de aliento en ese periodo; a veces pueden parecer cosas pequeñas, pero regalos como esos, son los que impulsan a seguir. Al Dr. Erick Escartín de la FESI que, de igual forma, me ayudó en el proceso y por escucharme cuando ni siquiera yo sabía qué pasaba. A la Dra. Nuri Aranda, por siempre ser tan atenta y paciente al realizar mis trámites académicos. Y a todos los profesores de los que tuve el honor de aprender. Así mismo, me gustaría agradecer al equipo de videoconferencia, integrado por la Lic. Lourdes Lara, el Lic. Juan José García y el Lic. Daniel Villarreal, por toda su amabilidad y servicio, ya que, sin ellos nada de esto sería posible. Y a todas las personas que trabajan diariamente y que hacen que funcionen de manera adecuada cada una de las sedes donde tuve el placer de aprender durante el desarrollo de esta maestría.

A Adriana Peniche, que no sólo ha sido mi maestra, sino también una amiga muy querida que está en los momentos más felices y también los más sombríos. A Fernando Martínez, amigo casi hermano que siempre tiene las palabras precisas para levantarme. A Marco Varela, por aligerarme el peso en ciertas circunstancias y por tanto aprendizaje juntos.

De manera muy especial, agradezco a mis padres por siempre estar conmigo, por el apoyo y por el cariño... los amo. Y a mi hermana, Abigail, cuando leas esto quiero que sepas que la luz que me guía en todo momento, eres tú, te amo hermana.

Para finalizar quiero extender mi agradecimiento a todas las personas que, aunque mi memoria no hizo justicia, mi corazón sí. Gracias a lo intangible por manifestarse en todo lo bueno que pasa en mi vida. Con todo mi corazón, mente y alma, gracias por todo.

Agradecimientos especiales:

- Al Instituto de Neurobiología, sede principal del programa de Maestría en ciencias (Neurobiología), por la apertura a estudiantes con sedes externas que permite realizar este posgrado a distancia.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico recibido en los semestres correspondientes a la beca a la que me permitió acceder, para realizar mis estudios de posgrado. (CVU: 959188)
- A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por permitirme iniciar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.
- A la Facultad de Psicología, por abrirme las puertas para continuar con mis estudios.
- Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), lugar donde fue realizada esta Tesis de maestría, por la oportunidad para desarrollar los conocimientos y habilidades referentes a este trabajo y por permitirme ser parte del laboratorio de Neurogénesis.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mi *alma máter*, por todos los regalos en conocimiento y oportunidades que me ha otorgado a lo largo de mi vida académica.

DEDICATORIA

A mi madre, Brenda Martínez Villicaña,
por su amor, su cuidado, apoyo y aliento.

A mi padre, Miguel Rocha Quiroz,
por todo su esfuerzo y apoyo.

A mi bisabuela, Dolores Juárez Herrera,
por su ejemplo de fortaleza y su cariño.

A mi hermana, Abigail Rocha,
por su amor, apoyo, compañía
y por existir.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	0
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES	6
Depresión.....	6
Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva (EMTr)	10
Efectos de la EMTr en el tratamiento del desorden de depresión mayor	11
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
Generales:	21
Particulares:	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
Diseño experimental y animales de experimentación	23
Protocolo de Estrés Crónico Impredecible (ECI)	26
Aplicación del tratamiento: Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva a 5 Hz.....	27
Evaluación del estado de pelaje (EP)	28
Pruebas conductuales.....	29
Rotarod:.....	29
Campo abierto:.....	30
Nado forzado:	31
Técnica de impregnación de Golgi Cox	32
Análisis estadístico	34
RESULTADOS.....	35
Efecto de la EMTr sobre la motricidad	
evaluada en el rotarod y en el campo abierto	35
Efecto de la EMTr sobre la condición del pelaje (auto cuidado)	37
Efecto de la EMTr sobre la desesperanza evaluada en el nado forzado.....	39
Efecto de la EMTr sobre las espinas dendríticas de las células granulares del giro dentado del hipocampo	
después de las sesiones de mantenimiento	41

DISCUSIÓN	44
La EMTr a 5 Hz produce efectos tipo antidepresivos que se sostienen	
Mantenimiento mejora efecto.....	44
La EMTr a 5 Hz favorece la maduración de las espinas dendríticas en las células granulares del giro	
dentado del hipocampo	46
CONCLUSION	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ABREVIATURAS

ACTH: Adrenocorticotropina

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CRF: Factor de liberación de corticotropina

Ctrl: Grupo control

CUMS: Estrés crónico impredecible (siglas en inglés)

DSMIV: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

ECI: Estrés crónico impredecible

EMTr CM: grupo estimulado con EMTr con sesiones de mantenimiento

EMTr SM: Grupo estimulado con EMTr sin sesiones de mantenimiento

EMTr: Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva

EP: Estado de pelaje

FI: Frecuencia de inmovilidad

GC: Glucocorticoides

GR: Receptores a glucocorticoides

HAMD17: Escala de depresión de Hamilton

HPA: eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales

Hz: Hertz

L.I: Latencia de inmovilidad

LDLPFC: Corteza prefrontal dorsolateral izquierda

NF: Nado forzado

OMS: Organización Mundial de la Salud

PVN: Núcleo paraventricular del Hipotálamo

RDLPFC: Corteza prefrontal dorsolateral derecha

Rpm: revoluciones por minuto

Sham CM: Grupo con tratamiento de EMTr simulado con sesiones de mantenimiento

Sham SM: Grupo con tratamiento de EMTr simulado sin sesiones de mantenimiento

Sham: Grupo con tratamiento de EMTr simulado

TTI: Tiempo total de inmovilidad

UM: Umbral motor

RESUMEN

La estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr) es un método con creciente uso a nivel clínico, debido a los resultados positivos obtenidos a partir de la aplicación de esta terapia para aminorar la sintomatología de la depresión, pero como todo método de relativo uso reciente, existen aún puntos importantes para ser estudiados, uno de los cuales es el tiempo en que persisten los efectos de este tratamiento una vez que las sesiones de aplicación han finalizado.

Objetivo: El propósito del presente trabajo fue evaluar la persistencia del efecto tipo antidepresivo de la EMTr con frecuencia de 5 Hz, aplicada a ratones hembra de la cepa Balb/C, previamente expuestos a estrés crónico impredecible para simular conducta tipo depresiva.

Métodos: Se realizó una comparación entre 5 grupos de ratones hembra de la cepa Balb C (Control, estimulado sin mantenimiento, estimulado con mantenimiento, simulado sin mantenimiento y simulado con mantenimiento). A excepción del grupo Control, los grupos fueron expuestos a estrés crónico impredecible para instaurar conducta tipo depresiva. Dos de estos grupos fueron tratados con aplicaciones diarias de lunes a viernes de EMTr a 5 Hz por 4 semanas (estimulado con mantenimiento -EMTr CM- y estimulado sin mantenimiento-EMTr SM). El grupo EMTr CM recibió sesiones de mantenimiento por 5 semanas más. Para evaluar el desarrollo de la conducta tipo depresiva, se realizó un seguimiento semanal del estado de pelaje por medio de puntajes asignados a 7 zonas del ratón (cabeza, cuello, espalda, patas delanteras, patas traseras, cola y abdomen) para determinar el nivel de autocuidado en cada grupo. Se aplicaron las pruebas conductuales de rotarod, campo abierto y nado forzado en dos ocasiones, la primera al término de las sesiones de tratamiento y la segunda ocasión al término de las sesiones de mantenimiento, para determinar la evolución de los síntomas de la conducta tipo depresiva con sesiones de mantenimiento y sin ellas. Como parte final, se realizó la técnica de impregnación de Golgi-Cox en las muestras de cerebro obtenidas del sacrificio de los sujetos de estudio, específicamente en el giro dentado del hipocampo, con el fin de cuantificar espinas dendríticas maduras (tipo mushroom) en cada uno de los grupos de estudio, ya que se ha visto que hay cierta relación entre la disminución de las espinas dendríticas en el giro dentado en presencia de un proceso depresivo.

Resultados: La prueba de rotarod y la de campo abierto mostraron que, al no presentar diferencias estadísticamente significativas, ni la exposición a estrés crónico impredecible (ECI) ni la manipulación hecha durante la aplicación de las sesiones de EMTr, provocaron daño motor que pudiera incapacitar a los ratones a realizar la prueba de nado forzado o bien que les impidiera asearse. Por otro lado, el índice de estado de pelaje indicó una mejor conducta de autocuidado en los ratones que estuvieron bajo tratamiento con EMTr a 5 Hz, y en los ratones con sesiones de mantenimiento comparado con los ratones en los grupos simulados (Sham SM y Sham CM), incluso el grupo estimulado con mantenimiento (EMTr CM) presentó un estado de pelaje en mejores condiciones comparado con el grupo estimulado sin mantenimiento (EMTr SM). En la técnica de impregnación de Golgi-Cox se observó un mayor número de espinas dendríticas en el grupo EMTr CM vs el grupo EMTr SM y al comparar las espinas dendríticas de tipo mushroom, se observó una diferencia matemática donde en el grupo EMTr SM, el porcentaje fue menor comparado con el grupo EMTr CM.

Conclusiones: Por medio de estas comparaciones, encontramos que las sesiones de mantenimiento aminoran en mayor medida los síntomas tipo depresivos que fueron evaluados por medio de la aplicación de pruebas conductuales y por medio de la observación hecha a partir de las muestras histológicas impregnadas con la técnica de Golgi-Cox, por lo cual concluimos que la aplicación de sesiones de mantenimiento es importante para obtener mejores resultados con la aplicación de EMTr a una frecuencia de 5 Hz.

ABSTRACT

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a method with increasing use at clinical level, due to the positive results obtained from the application of this therapy to reduce the symptoms of depression, but like any method of relative recent use, there are still important points to be studied, one of which is the time in which the effects of this treatment persist once the application sessions have ended.

Objective: The purpose of the present work was to evaluate the persistence of the antidepressant effect of the rTMS with a frequency of 5 Hz, applied to female mice of the Balb / C strain, previously exposed to unpredictable chronic stress to simulate depressive-like behavior.

Methods: A comparison was made between 5 groups of female mice of the Balb C strain (Control, stimulated without maintenance, stimulated with maintenance, sham without maintenance and sham with maintenance). With the exception of the Control group, the groups were exposed to unpredictable chronic stress to establish depressive-like behavior. Two of these groups were treated with daily applications from Monday to Friday of rTMS at 5 Hz for 4 weeks (stimulated with maintenance -rTMS WM- and stimulated without maintenance-rTMS WoM-). The rTMS WM group received maintenance sessions for a further 5 weeks. To assess the development of depressive-like behavior, a weekly monitoring of the coat status was carried out by means of scores assigned to 7 areas of the mouse (head, neck, back, front legs, hind legs, tail and abdomen) to determine the level of self-care in each group. The rotarod, open field and forced swimming behavioral tests were applied on two occasions, the first at the end of the treatment sessions and the second time at the end of the maintenance sessions, to determine the evolution of the symptoms of depressive-type behavior. with and without maintenance sessions. As a final part, the Golgi-Cox impregnation technique was performed on the brain samples obtained from the sacrifice of the study subjects, specifically in the dentate gyrus of the hippocampus, in order to quantify mature dendritic spines (mushroom type) in each one of the study groups, since it has been seen that there is a certain relationship between the decrease in dendritic spines in the dentate gyrus in the presence of a depressive process.

Results: The rotarod test and the open field test showed that, since they did not present statistically significant differences, neither the exposure to chronic unpredictable stress (CUS) nor the manipulation done during the application of the rTMS sessions, caused motor damage that could incapacitate the mice to perform the forced swim test or to prevent them from grooming. On the other hand, the coat status index indicated a better self-care behavior in the mice that were under treatment with rTMS at 5 Hz, and in the mice with maintenance sessions compared to the mice in the sham groups (Sham WoM and Sham WM), even the group stimulated with maintenance (rTMS WM) presented a coat state in better condition compared to the group stimulated without maintenance (rTMS WoM). In the Golgi-Cox impregnation technique, a greater number of dendritic spines was observed in the rTMS group vs the rTMS WoM group and when comparing the mushroom-type dendritic spines, a mathematical difference was observed in the rTMS WoM group, in which the percentage was lower compared to the rTMS WM group.

Conclusions: Through these comparisons, we found that the maintenance sessions reduce to a greater extent the depressive-type symptoms that were evaluated by applying behavioral tests and observing the histological samples impregnated with the Golgi-Cox technique, therefore we conclude that the application of maintenance sessions is important to obtain better results with the application of rTMS with a frequency of 5 Hz.

***Dime amigo,
¿la vida es triste
o soy triste yo?***

– Amado Nervo

INTRODUCCIÓN

La Depresión es un concepto universal cada vez más recurrente debido a que nombra a una de las enfermedades mentales que más se presenta en la población a nivel mundial.

Las personas que presentan este padecimiento, en palabras de E. Kraepelin, “se muestran, sin causa aparente, amodorrados y torvos, desanimados o con una apatía irrazonable; así comienza la melancolía...” y justo esta última palabra fue la atribuida por Hipócrates como primer acercamiento al concepto de depresión, y no sólo dándole una identidad, sino también describiéndolo clínica y objetivamente (s. IV a.C.). Sumados a los síntomas antes mencionados puede observarse también en los pacientes depresivos, como éstos “...sufren mal humor, desaliento e insomnio y suelen despertar de repente de un sueño sobresaltado... Tienden a cambiar de idea rápidamente; se hacen autoritarios, mezquinos y ruines para pasar al poco tiempo a ser simples, extravagantes y generosos, pero no por virtud del espíritu sino por lo mutable de la enfermedad” [*Kraepelin, Citado por Lewis, 1934, en Ávila, A. (1990)*]. Cabe resaltar la importancia de la cita anterior, dado que, a pesar de haber transcurrido ya 25 siglos desde la primer descripción hecha por Hipócrates, ésta encaja con la definición actual [*Zilboorg, 1941,1944 en Ávila, A., 1990*], y para ejemplificarlo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la depresión se define como un trastorno mental frecuente, incapacitante [*OMS, 2019*], caracterizado por tristeza, y/o irritabilidad y acompañado de cambios psicofisiológicos como perturbación del sueño y apetito, retardo motor que puede ser observado en los movimientos corporales o al hablar, disminución en el deseo sexual, pérdida de la capacidad para percibir placer (anhedonia), llanto, y en sus estadios más severos, como en el caso del desorden de depresión mayor, pueden existir pensamientos suicidas, e incluso llegar hasta la muerte [*Belmaker, R.H., Agam, G., 2008*], ya que, desde la visión del psiquiatra K. Schneider, la depresión es un “hundimiento vital” [*K. Schneider, 1920 en Aguirre, A. 2008*] y por esta razón, “el depresivo desea la muerte, como forma de poner fin a su sufrimiento.” [*Alonso, F. 1988 citado en Aguirre, A. 2008*].

La relevancia del estudio de esta enfermedad no sólo se basa en la gravedad de los síntomas que conlleva, sino por las cifras relacionadas a la cantidad de personas que la padecen, ya que,

acorde con la Organización Mundial de la Salud, se calcula que la depresión afecta a más de 300 millones de personas en el mundo [OMS, 2019], es la principal causa mundial de discapacidad y contribuye de forma importante a la carga mundial general de morbilidad, puesto que en su estado más grave, como ya se ha mencionado, puede llevar al suicidio [Belmaker, R.H., Agam, G., 2008].

De acuerdo con el número y la intensidad de los síntomas, los episodios depresivos pueden clasificarse como leves, moderados o graves. Para los episodios depresivos de tipo leve, la terapia psicológica suele ser suficiente como tratamiento, pero para episodios considerados moderados o graves se requiere de la suma de terapias junto con la farmacológica (Fig. 1).

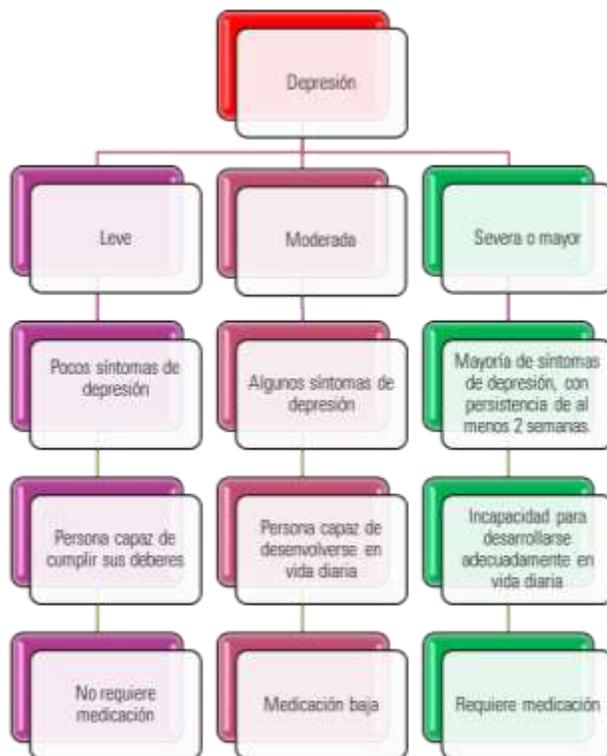


Fig. 1. Clasificación de Depresión de acuerdo a su intensidad. El mapa conceptual muestra la clasificación de la depresión de acuerdo a su intensidad y síntomas, así como los tratamientos generalmente usados para cada intensidad. [Mapa propio basado en información de García Higuera, J.A., 2013; Belmaker, R.H., Agam, G., 2008; Feng, S., et al., 2012; Ontario Health Technology Assessment Series, 2004]

La depresión es un desorden heterogéneo con una alta variabilidad en su curso, ya que existen gran cantidad de factores de riesgo involucrados en el desarrollo de esta patología donde podemos incluir factores biológicos como el género, ya que se ha observado que la incidencia de depresión es mayor en mujeres que en hombres [Olmedilla-Zafra, A., Ortega-Toro, E., 2008; Lehtinen, M., 1994; Belmaker, R.H., Agam, G., 2008], teniendo al menos en Estados Unidos, más del 12 % de la población en hombres y 20% aproximadamente de la población en mujeres

[Belmaker, R.H., Agam, G., 2008]. De manera similar, en México la prevalencia corresponde a 10.4% en el caso de las mujeres y 5.4% en hombres, lo que corresponde a una proporción de 2:1 [Rafful, C. et al., 2012], así mismo, se encuentran involucrados factores genéticos, respuesta neurobiológica al estrés, alteraciones en la liberación de neurotransmisores, así como factores psicológicos y sociales como por ejemplo la personalidad del sujeto, alguna experiencia vivida, sucesos estresantes, género o bien condición socioeconómica como pobreza o incluso violencia). Debido a la naturaleza compleja de la depresión, existen inconsistencias en la respuesta a los tratamientos [Belmaker, R.H., Agam, G., 2008] y no todos los pacientes con esta enfermedad responden favorablemente a los medicamentos [Feng et al., 2012] por esta razón científicos y clínicos se han dado a la tarea de buscar alternativas al tratamiento farmacológico.

Una alternativa terapéutica para la depresión mayor es la Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva, (o EMTr) [Ontario Health Technology Assessment Series, 2004; Cui, M., et al., 2019], una técnica no invasiva que permite la estimulación cerebral y ha dado resultados en el trastorno de depresión mayor, tanto como tratamiento único como adyuvante [Philip, N., Carpenter, S. L., et al., 2015], aunado a esto, es una opción que produce beneficios clínicos sin los efectos adversos asociados con el tratamiento farmacológico [Carpenter, L. L., et al., 2012].

Pero, a pesar de los hallazgos favorables con respecto a la EMTr, aún falta profundizar el estudio de este tratamiento para conocer la mejor manera de aplicarlo y obtener resultados para mejorar a largo plazo, la vida de los pacientes con este mal.

ANTECEDENTES

Depresión

Desde los años 60's la depresión ha sido denominada "desorden de depresión mayor" de acuerdo a los criterios encontrados en el Manual de diagnóstico y estadística [DSMIV-2000] dentro de los cuales se encuentran el estado de humor de tristeza, irritabilidad, baja autoestima, sentimiento de desesperanza, falta de interés en general, culpabilidad, disminución o aumento de apetito, pérdida o aumento de peso, insomnio, o hipersomnia, sensación de falta de energía, fatiga, incremento de agitación, anhedonia (incapacidad para percibir y sentir placer) y algunos

otros síntomas de tipo conductuales como son poco poder de concentración e incluso, pensamientos recurrentes de muerte y suicidio [Nestler, P., 2002]

Aunque varios estudios epidemiológicos muestran entre un 40 y 50% de riesgo de padecer depresión proviene de factores genéticos [Fava, M. y Kendler, K. S., 2000; Nestler E. J., et al., 2002] también están involucrados factores no genéticos en el desarrollo de este desorden mental, tales como trauma emocional, infecciones virales, procesos al azar ocurridos durante el desarrollo cerebral, incluso estrés, que se describe como una respuesta biológica ante una agresión o estímulo peligroso [Selye, 1974; Rom & Reznick, 2016] y que es comúnmente relacionado con el desorden de depresión, no como único factor necesario para provocarla, pero sí como uno que la acompaña frecuente [Nestler, P., 2002].

Como fue mencionado, de acuerdo al número de síntomas que se presenten y la duración de los mismos, la depresión se puede clasificar en leve, moderada y severa. En la depresión moderada y la severa (esta última conocida como desorden de depresión mayor), es necesario el uso de terapia farmacológica. Dentro de los fármacos de elección encontramos a los antidepresivos tricíclicos, que tienen su acción por medio de la inhibición de la recaptura de la serotonina y norepinefrina por sus transportadores y los inhibidores de la monoamina oxidasa que su propio nombre explica su mecanismo de acción [Nestler, P., 2002].

Desafortunadamente no todos los pacientes bajo prescripción de estos antidepresivos obtienen los resultados deseados, aun con las dosis adecuadas y el tiempo adecuado de administración (que puede ser semanas o meses).

La depresión es un desorden que, dada su naturaleza heterogénea, debe estudiarse desde una perspectiva ecosistémica (persona-medio), es por ello que no han sido dilucidadas todas las razones por las que la terapéutica empleada en el desorden de depresión mayor no surte efecto como se desea, ya que, hablando desde el punto de vista biológico, existen muchas regiones cerebrales implicadas en la sintomatología de esta enfermedad, esto se conoce gracias a estudios de imagenología cerebral *in vivo*, que han demostrado alteraciones en el flujo sanguíneo en áreas del cerebro en pacientes con depresión como la corteza prefrontal, corteza cingulada, estriado, amígdala e hipocampo entre otras [Drevets, 2001; Liotti, 2001], regiones que también se han visto afectadas en estudios en pacientes con depresión mayor, realizados *post mortem* [Zhu et al., 1999; Manji et al., 2001].

Uno de los circuitos involucrados en el desarrollo de la depresión es el sistema límbico Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HPA por sus siglas en inglés). Este sistema, en donde se integran aspectos emocionales, cognitivos y neuroendocrinos, media la respuesta al estrés [Lucassen, et al., 2006]. La cadena de acciones que desempeña este circuito es la siguiente: El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) secreta Factor de liberación de corticotropina (CRF), este factor estimula a la hipófisis que sintetiza y libera adrenocorticotropina (ACTH), esta última estimulará a las adrenales para sintetizar y liberar cortisol en humanos, o bien corticosterona en roedores (glucocorticoides o GC), generando cambios metabólicos y en consecuencia, cambios en el comportamiento de manera dramática (Fig. 2)

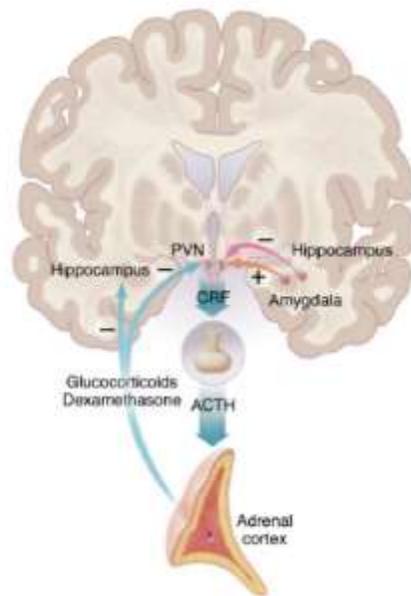


Fig. 2. Esquema de regulación del Eje HPA. [Tomado de Nestler, et al., 2002]

El eje HPA se controla por medio de varias estructuras cerebrales, dentro de éstas se encuentra el hipocampo que inhibe al CRF hipotalámico. En particular los glucocorticoides (cortisol o corticosterona), ejercen un poderoso efecto de *feedback* en el eje HPA, esto es, a menor concentración de glucocorticoides, mayor inhibición hipocampal del eje HPA, al mismo tiempo, aumentan procesos cognitivos ya que estimulan al Hipocampo. Por el contrario, cuando hay un incremento de los glucocorticoides por arriba de la concentración normal y por tiempo prolongado (por ejemplo, en estrés crónico) se genera daño hipocampal, a consecuencia de la excitotoxicidad que produce la hipercortisolemia en las neuronal piramidales del hipocampo, y esto pasa por la hipersecreción de cortisol, secundaria a una hipersecreción de CRF

hipotalámico auto-mantenida por la hipofuncionalidad del hipocampo que ha sido dañado a causa de la hipercortisolemia y de la hiposensibilidad de los receptores a glucocorticoides (GR), lo que explicaría la hiperactividad del eje HPA en la depresión, así, con altos niveles de glucocorticoides, el hipocampo no puede desempeñar correctamente su papel para inhibir al eje HPA ocasionando a su vez una sobreproducción de GC [Yang, et al., 2015; Nestler, et al., 2002; Duval, et al., 2010]. Se ha observado que en presencia de estrés crónico (como muchas veces se presenta en el desorden de depresión) lo anterior causa una reducción en las ramificaciones de las dendritas y pérdida de espinas dendríticas secundarias de tipo *mushroom* donde las neuronas reciben *inputs* sinápticos glutamatérgicos [McEwen, 2000; Sapolsky, 2000; Nestler, 2002]. La hipercortisolemia que resulta del estrés, también reducen el nacimiento (neurogénesis) de células granulares en el giro dentado del hipocampo adulto [Fuchs and Gould, 2000; Duval, et al., 2010]. Ya que el hipocampo está relacionado con el sistema límbico y con la formación de memoria, cuando existe estrés crónico y depresión ocurre pérdida de capacidades cognitivas, así como alteraciones en el estado del ánimo, como consecuencia de la alteración en la neuroplasticidad hipocámpica [Ramírez-Rodríguez, G., et al, 2011].

La neuroplasticidad, que se define como la habilidad del sistema nervioso a responder a estímulos intrínsecos o extrínsecos por medio de la reorganización en su estructura, función y conectividad [Cramer et al., 2011; Levy, et al., 2018], se ha visto afectada cuando existe depresión ya que se ha observado en animales experimentales, que puede llevar a una atrofia en el hipocampo [Pittenger & Duman, 2008; Sapolsky, 2000], esta atrofia ocasiona una interrupción en la conectividad hipocámpica con la corteza prefrontal [Cao, et al., 2012]. De igual forma, se ha observado que el estrés crónico causa atrofia en las dendritas de las neuronas piramidales en CA3 del hipocampo [Magariños et al., 1996]. Estudios como el de Bessa et al de 2009, apuntan a que el efecto de los antidepresivos está más relacionado a la remodelación dendrítica y contactos sinápticos (remodelación neuronal), que a la neurogénesis, ya que al analizar cortes coronales de cerebro de ratas, inmersos en solución de Golgi-cox y observar el número de espinas dendríticas y su forma en el giro dentado del hipocampo, encontraron que, curiosamente, aunque la densidad de espinas dendríticas no fue alterada con la administración de antidepresivos (CP 156,526, un antagonista del receptor de la hormona liberadora de corticotropina tipo 1 y SSR 1494515, un antagonista del receptor de vasopresina de arginina tipo 1b), sí se observó un cambio en la relación entre espinas tipo *mushroom* (capaces de crear conexiones sinápticas) y espinas dendríticas delgadas, lo que sugiere la posibilidad de un

cambio en maduración de las dendritas, es decir una modificación en la conectividad sináptica. Otro hallazgo importante fue que los antidepresivos restauran las conexiones sinápticas y estos ajustes ocurrieron independientemente del estado neurogénico [Bessa, et al., 2009].

Tratamiento de la depresión

Aunque los fármacos antidepresivos tricíclicos y los antidepresivos que inhiben la recaptura de serotonina han demostrado que pueden revertir los efectos causados por el estrés, para obtener dichos efectos es necesario un tiempo prolongado de consumo de los mismos de entre dos a cuatro semanas. Por el contrario, la Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva, un tratamiento alternativo al farmacológico para la depresión mayor, ha demostrado tener resultados positivos en la clínica, ya que estudios han revelado, que esta terapia favorece algunas etapas del proceso neurogénico en el hipocampo [Ueyama, E., et al., 2011; Ramírez-Rodríguez, G., et al, 2011] pero aún no es claro, si también podría generar cambios en la remodelación neuronal.

Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva (EMTr)

En el siglo XVIII, Galvani estimuló eléctricamente fibras musculares y nerviosas de extremidades de ranas, sentando un antecedente de la posibilidad de que las fibras nerviosas, y no solo las musculares como se pensaba, podrían transmitir electricidad [Piccolino, 2006], pero fue hasta 1831, que Michael Faraday descubre el principio de inducción electromagnética dando la oportunidad de usar campos magnéticos para generar corrientes eléctricas, que más tarde serían usados para estimular tejido nervioso [Janicak, P., Dokucu, M. E., 2015], así, basado en el principio de Faraday, en 1985, Barker y colaboradores diseñaron y construyeron el primer estimulador electromagnético para uso humano [Janicak, P., Dokucu, M. E., 2015; Túnez Fiñana, I., Pascual Leone, A., 2014] que dará pie a la terapia conocida hoy en día como estimulación magnética transcraneal (o EMT por sus siglas en español)

La EMT (TMS, por sus siglas en inglés) es una alternativa a la terapia farmacológica de la depresión que, como ya se ha mencionado, se basa en el principio de inducción electromagnética de Michael Faraday (1831). Es una técnica neurofisiológica en la que, por

medio de una bobina, se suministran pulsos electromagnéticos sobre la cabeza del sujeto, que penetran a través de la piel y el cráneo hasta llegar al cerebro induciendo a su vez, una corriente eléctrica secundaria sobre las estructuras cerebrales que producirán potenciales de membrana neuronales [Túnez Fiñana, I., Pascual Leone, A., 2014]. Esta tecnología es considerada no invasiva, y prácticamente indolora, así mismo, no incluye los efectos adversos que muchas veces se presentan con los tratamientos farmacológicos ni efectos cognitivos adversos [Túnez Fiñana, I., Pascual Leone, A., 2014; Carpenter, L. L., et al., 2012; Janicak, P., Dokucu, M. E., 2015].

Dentro de los usos que se la ha dado a esta técnica, tenemos los estudios de localización del lenguaje y otros procesos cognitivos, los tratamientos para la enfermedad de Parkinson, y la epilepsia, así como tratamiento para desórdenes psiquiátricos [Wassermann, E. M., 1998; Túnez Fiñana, I., Pascual Leone, A., 2014], que incluyen a la depresión mayor, que es una de las enfermedades en las que se ha visto, esta técnica, en particular la EMTr (Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva), que consiste en la aplicación de trenes de pulsos, o bien, la emisión de pulsos repetidos sobre una misma área cerebral lo que permite estimular y modular de forma sostenida la actividad en una zona en específico de la corteza cerebral [Túnez Fiñana, I., Pascual Leone, A., 2014; Klomjai, W. et al., 2015], a partir de diversas frecuencias, las más utilizadas para el tratamiento de la depresión mayor van entre los 5 y 20 Hz. (5, 10, 15 y 20 Hz) [George et al., 2000; Magavi, L. R., et al., 2017; Wassermann, 1998; Armas-Castañeda et al., 2015; Feng, S., et al., 2012]. Aunque es poco común, existen estudios hechos con frecuencia a 5 Hz, y en los mismos se ha encontrado evidencia de la eficacia del tratamiento aún con esta frecuencia baja [Philip, N., Carpenter, S. L., et al., 2015; Armas-Castañeda et al., 2015].

Efectos de la EMTr en el tratamiento del desorden de depresión mayor

Aunque no se sabe por completo el mecanismo por el cual la EMTr surte efecto en el tratamiento del desorden de depresión mayor, estudios sugieren que su efecto está relacionado con que favorece la liberación de neurotransmisores (por ejemplo, la disminución del contenido de dopamina en corteza frontal y aumento de la misma en el estriado e hipocampo) [Shachar B., 1997; Lisanby, S.H., Belmaker, R.H., 2000; Strafella et al., 2001; Cho et al., 2012; Chervyakov, A. V., et al., 2015], tiene efectos de la neuroprotección ya que por ejemplo, protege contra muerte

neuronal inducida por isquemia transitoria, así como tener efecto en el flujo sanguíneo y el metabolismo cerebral) [Fujiki et al., 2003; Ogiue-Ikeda et al., 2005; Feng et al., 2008; Chervyakov, A. V., et al., 2015] y produce efectos neurotróficos, en particular, favorece la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro, (BDNF por sus siglas en inglés). El BDNF es conocido por tener funciones dentro de las que podemos incluir mejoras en la supervivencia neuronal luego de daño cerebral, neurogénesis, migración y diferenciación neuronal, crecimiento de dendritas y axones y formación de sinapsis [Chervyakov, A. V., et al., 2015; Lisanby, S.H., Belmaker, R.H., 2000; Muller et al., 2000]. Aunado a esto, se ha visto que tiene efectos en la plasticidad sináptica [Chervyakov, A. V., et al., 2015] que se manifiestan en cambios en la excitabilidad neuronal en el balance iónico alrededor de la población estimulada [Kuwabara et al., 2012].

Hallazgos realizados en el laboratorio de Neurogénesis del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, sugieren que, las sesiones de EMTr a 5 Hz de frecuencia, con intensidad de pulso de estimulación del 100% en trenes de 2 segundos de duración con 10 pulsos por tren, con un total de 30 trenes a un intervalo de 10 segundos entre cada tren dando un total de 30 trenes o bien 300 pulsos por día y administrados por 28 días consecutivos (8,400 pulso en total) al ser aplicadas sobre la corteza prefrontal dorsolateral izquierda o LDLPFC por sus siglas en inglés dado que en esta región cerebral se ha observado baja actividad durante la depresión [Koenings & Grafman, 2009] esto en ratones de la cepa Balb C, previamente expuestos a un paradigma de estrés crónico impredecible o ECI, que es un modelo de estrés psicológico que será explicado más adelante, tienen impacto en la conducta de los ratones estimulando el acicalamiento en la prueba de *splash test*, realizada para medir el comportamiento de acicalamiento que se ve reducido en presencia de síntomas tipo depresivos [Tanti, et al., 2012; Ducottet and Belzung, 2004] y reduciendo el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, prueba ampliamente usada para medir la desesperanza en sujetos con depresión "[Lee, et al., 2017; Porsolt, et al., 1977] (Fig 3.a); así mismo, se observó, por medio de inmunohistoquímica por libre flotación que se produce un aumento de la glía radial, la proliferación, las neuronas maduras y las fibras musgosas en el hipocampo (Fig. 3.b) lo que sugiere un efecto pro-neurogénico dado por la EMTr, relación parcialmente conocida y a su vez, sugiere una relación entre neurogénesis y un efecto a favor de disminuir la anhedonia, evaluada a partir del *splash taste*, y reducción en el estado de desesperanza, evaluado por medio de la prueba de nado forzado [Meneses, 2018].

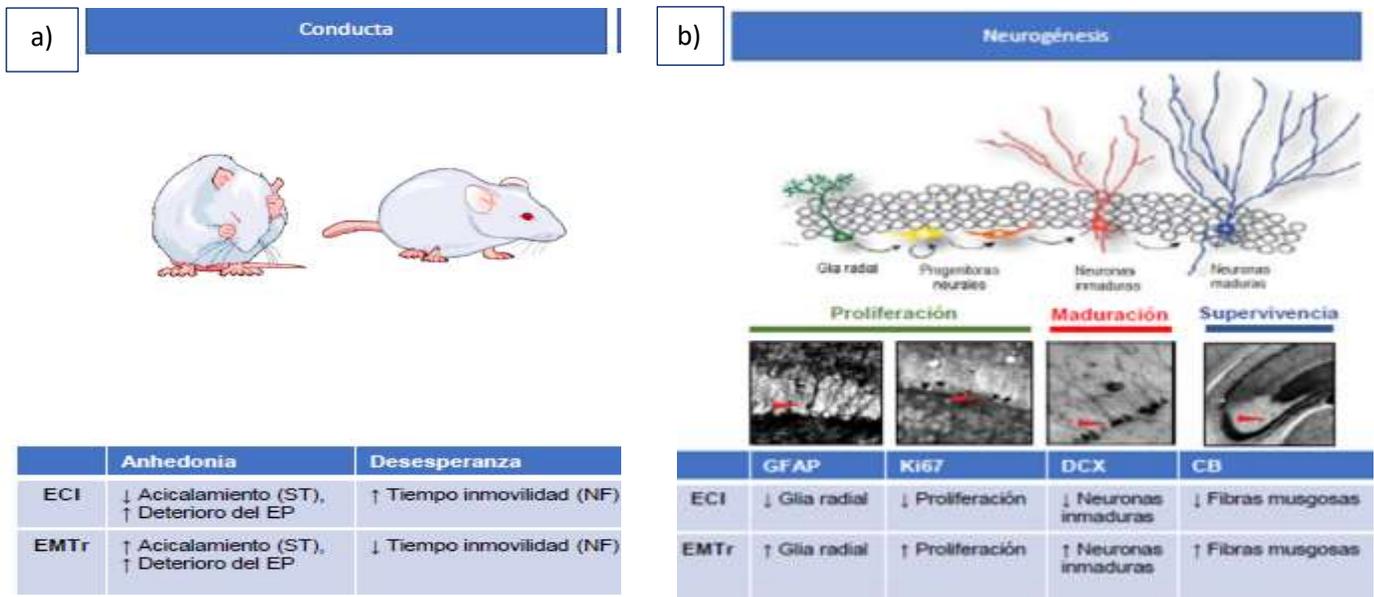


Fig. 3. Efecto de las sesiones de EMTr a 5Hz de frecuencia en ratones previamente expuestos a ECl. a) Observación en la conducta. b) Neurogénesis. [Tomado de *Meneses, D., 2018.En proceso*]

Los efectos observados en el estudio anterior que la EMTr provoca (esto es, al término de la aplicación de las sesiones de tratamiento durante por lo menos 2 semanas o bien lo que se conoce como tratamiento crónico), sugieren gran potencial terapéutico sobre la depresión mayor [Janicak, P., Dokucu, M. E., 2015], pero en vista de que la depresión es un mal que puede tener recaídas recurrentes, uno de los objetivos clínicos es que dichos efectos perduren más allá del periodo en que se aplica el tratamiento crónico, lamentablemente hay pocos estudios en los que se evalúa el efecto de largo plazo de la EMTr [Somani, A., 2019]. Por ejemplo, O’Readon y colaboradores, aplicaron sesiones de mantenimiento, sobre la corteza prefrontal dorso lateral izquierda (LDLPC, por sus siglas en inglés) de 10 adultos diagnosticados con depresión mayor, que respondieron al tratamiento crónico con EMTr, con las siguientes características: umbral motor del 100% (o bien, UM por sus siglas en español, que se define como la intensidad mínima de poder de salida del estimulador, que puede producir un potencial evocado motor o bien, una respuesta motora), con frecuencia de 10 Hz, en sesiones que consistieron en 40 trenes de 5 segundos por tren, con intervalos de 25 segundos con un total de 2000 pulsos por sesión, por un periodo entre los 6 meses y los 6 años de duración. Las sesiones se suministraban en promedio 1 a 2 veces por semana. Como resultado obtuvieron por medio de la escala de depresión de Hamilton (o HAMD17), a 7 de 10 pacientes con efectos positivos para el tratamiento de depresión mayor que se sostuvo en 3 casos sin otro tipo de

tratamiento por 9 meses a 5 años [O'Keefe, J. P., et al., 2005; Rachid, 2017]. Por su parte, Richieri et al., 2013, aplicó sesiones de mantenimiento a pacientes con depresión resistente a fármacos que respondieron al tratamiento crónico con EMTr administrado durante 6 semanas (5 sesiones por semana). Los pacientes que respondieron favorablemente al tratamiento con EMTr (n=59), fueron invitados al experimento donde 37 de los mismos recibieron sesiones de mantenimiento (3 sesiones la primera semana, 2 sesiones la segunda y tercera semana, luego 1 sesión por semana por dos semanas, posteriormente una sesión cada dos semanas por dos meses y, por último, 1 sesión por mes durante 2 meses, con las siguientes características: Umbral motor al 120% en cada corteza prefrontal dorsolateral izquierda -LDLPFC-; frecuencia alta de 10Hz: trenes de 5 s ; intervalo entre trenes de 25 s ; 2000 pulsos en total por sesión. En corteza prefrontal dorso lateral derecha-RDLPFC-; frecuencia de 1 Hz; trenes de 180 s; intervalo entre trenes de 30 s; 720 pulsos por sesión). Los resultados de este estudio se muestran en la siguiente figura (fig.4).

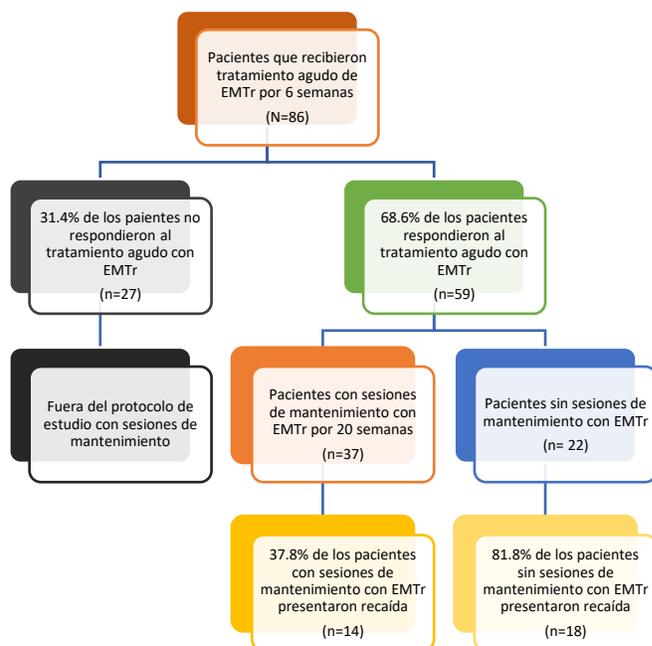


Fig. 4. Diagrama de flujo que muestra la distribución y el número de pacientes incluidos en este estudio. Se muestra en los cuadros amarillos los resultados en porcentaje, de recaída de los pacientes que fueron sometidos a sesiones de mantenimiento (lado izquierdo) y se compara con aquellos que no tuvieron sesiones de mantenimiento (lado derecho). Diagrama modificado y traducido del artículo de Richieri, R. et al., 2013.

Como se observa en el diagrama anterior, los resultados indican que el grupo con mantenimiento, presenta un rango de recaída menor (37.8%) comparado con el grupo que no recibió sesiones de mantenimiento (81.8%) [Richieri, R. et al., 2013].

A diferencia de Richieri et al., 2013, Phillip y colaboradores realizaron un estudio en pacientes con depresión de tipo recurrente con episodios de al menos 4 semanas de duración, pero no más de 3 años, que no tomaban antidepresivos. Fueron incluidos hombres y mujeres con edad entre los 18 y los 70 años con severidad moderada de síntomas como mínimo y con por lo menos 17 síntomas de 20 dentro de la escala de Hamilton para rango de depresión (HAMD17). El estudio fue distribuido en 3 fases, una de detección previa al estudio que duró una semana, la segunda que consistió en el tratamiento crónico de EMTr que se aplicó 5 días de la semana durante 6 semanas (dando un total de 30 sesiones), con las siguientes características: umbral motor a 120%; 10 pulsos por segundo; 3000 pulsos totales por sesión; y la tercera fase que consistió en las sesiones de mantenimiento, suministradas una vez por mes con las mismas características que las sesiones de tratamiento crónico. Acorde con los resultados obtenidos en dicho estudio, los investigadores concluyen que no hay diferencia significativa entre los pacientes que tuvieron sesiones de mantenimiento y aquellos que no las tuvieron luego de un periodo de tratamiento crónico con EMTr [Phillip, N., Dunner, D. L., et al. 2015] (fig. 5).

Resumen del puntaje total de HAM-D-17, rangos de pacientes que responden y los que no responden durante la fase de mantenimiento.

Población al azar HAM-D- 17	Línea Base	Semana 6 Fin de tx EMTr	Semana 9 Fin de reducción paulatina de sesiones	Semana 13	Semana 17	Semana 21	Semana 25	Semana 29	Semana 33	Semana 37	Semana 41	Semana 45	Semana 49	Semana 53
N- grupo con sesiones de EMTr	23	23	22	21	18	16	15	14	13	14	13	10	11	10
Pacientes que responden al tx n (% de la N de línea base)		22(95.7)	16(69.6)	16(69.6)	13(56.5)	12(52.2)	10(43.5)	10(43.5)	10(43.5)	11(78.6)	10(43.5)	9(39.1)	10(43.5)	10(43.5)
Pacientes que remiten n (%)		19(82.6)	12(52.2)	11(47.8)	9(39.1)	7(30.4)	5(21.7)	6(26.1)	6(26.1)	8(34.8)	7(30.4)	7(30.4)	7(30.4)	9(39.1)
N-grupo en observación (sin sesiones de EMTr)	26	26	24	21	18	16	14	10	8	8	7	8	7	6
Pacientes que responden al tx n (% de la N de línea base)		26(100)	19(73.1)	12(46.2)	11(42.4)	10(38.5)	10(38.5)	6(23.3)	5(19.2)	7(26.9)	4(15.4)	4(15.4)	6(23.1)	5(19.2)
Pacientes que remiten n (%)		23(88.5)	9(34.6)	5(19.2)	5(19.2)	7(26.9)	6(23.1)	2(7.7)	4(15.4)	4(15.4)	3(11.5)	4(15.4)	3(11.5)	4(15.4)

Fig. 5. Resultados obtenidos a lo largo del estudio. Se muestra en la tabla el número y porcentaje de los pacientes que responden al tratamiento, y aquellos que remiten con el tratamiento agudo y la fase de mantenimiento tanto para el grupo expuesto a EMTr (primeras 3 líneas), como para el grupo en observación, esto es, sin sesiones de mantenimiento, únicamente con el tratamiento agudo con EMTr (últimas 3 líneas). Tomado y modificado de Phillip, N., Dunner, D. L.,

Como se puede ver en la tabla de la figura 5, al término de la semana 53, que fue la última en que se proporcionaron sesiones de mantenimiento (1 sesión por mes por 12 meses), 9 de los 10 sujetos que concluyeron el ensayo con sesiones de mantenimiento, remitieron. Por otro lado, 4 de los 6 sujetos que permanecieron en observación, remitieron sin ayuda de las sesiones de mantenimiento. La diferencia entre los dos grupos estudiados en el artículo de Phillip, muestran una diferencia matemática, pero no presentan diferencia estadística significativa.

Midiendo la probabilidad de retratamiento por recidiva en los pacientes en este estudio, se realizó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier, donde se compara la probabilidad de supervivencia en el eje de las "y", en una escala de 1 a 0 donde a mayor cercanía a 0, es menor probabilidad de requerir retratamiento, contra el tiempo medido en días de retratamiento (eje de las "x"). Como se puede observar, el grupo representado con la línea azul continua que es el sometido a sesiones de mantenimiento, muestra un mayor tiempo en que se presenta la necesidad de que los pacientes entren en retratamiento ya que se acerca más a 0 a lo largo de los días, comparado con el grupo representado con la línea roja discontinua que corresponde a los pacientes en observación (fig. 6)

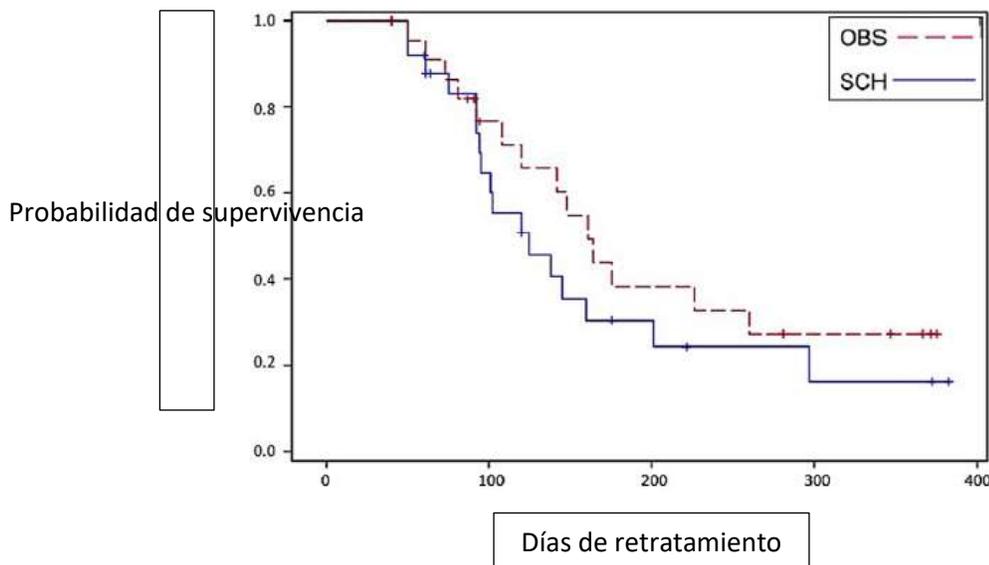


Fig. 6. Curva de supervivencia para el tiempo en que se presente el primer retratamiento. Se muestra en la curva de Kaplan-Meier de supervivencia, la diferencia entre el tiempo en que necesitan retratamiento los pacientes del grupo bajo sesiones de mantenimiento (Sch-línea azul continua) y el tiempo requerido para retratamiento para los pacientes en observación (OBS- línea roja discontinua). Tomado y traducido de Phillip, N., Dummer, D. L., et al. 2015.

Sumado a esto, el mismo grupo de estudio del antecedente anterior [Phillip, N., Dunner, D. L., et al. 2015], compararon el efecto que la EMTr a 5 Hz puede tener contra el efecto de la EMTr a 10 Hz de frecuencia y, de la misma forma que Su, T.P., et al., 2005, observaron que no hay diferencia significativa en los resultados entre una frecuencia baja (5 Hz) y otra alta (10, 20 Hz) aplicadas en la LDLPFC. Profundizando, Armas-Castañeda ha reportado no sólo los efectos EMTr a 5 Hz en pacientes con diagnóstico de depresión y ansiedad, sino la persistencia de dicho efecto durante los tres meses siguientes (medidos con escala de Hamilton) luego de la última sesión de tratamiento agudo con EMTr (5 Hz, 30 trenes, 100% de Umbral Motor) [Armas-Castañeda, G., et al., 2015].

Gracias a los estudios realizados hasta el día de hoy tenemos nociones de los beneficios de largo plazo de la EMTr como tratamiento para la depresión mayor, en una modalidad de mantenimiento mínimo. Sin embargo, la información no llega a ser concluyente, lo cual puede deberse a diversas diferencias entre los estudios como son, las frecuencias usadas, los intervalos entre las sesiones o bien las características de la aplicación de las sesiones de EMTr como se ejemplificó anteriormente. En el mismo sentido, los anteriores trabajos, al ser estudios clínicos, tienen ciertas limitantes para poder profundizar en el conocimiento a nivel fisiológico, con este propósito, algunos trabajos preclínicos han tratado de elucidar si los efectos benéficos de la EMTr en la depresión, perduran o se pierden después de que cesa el tratamiento, entre ellos se encuentra el trabajo publicado por Feng et al., en 2012 en el que usando 84 ratas de la cepa Sprague-Dawley expuestas a ECI compararon el efecto a largo plazo de la EMTr con 15 Hz aplicada de manera crónica, con un pulso de intensidad de estimulación del 100% del poder máximo del estimulador, con trenes de 15 segundos de duración, con 60 pulsos por tren a un intervalo de 15 segundos entre cada tren y dando un total de 1000 pulsos por día, distribuidos en 17 trenes no sucesivos, aplicados por 21 días consecutivos (21,000 pulsos en total); contra el efecto a largo plazo de la venlafaxina (antidepresivo bicíclico inhibidor débil, no selectivo, de la recaptura de norepinefrina y serotonina, así como inhibidor débil de la recaptura de dopamina, indicado en el tratamiento de la depresión resistente a antidepresivos clásicos [Rodríguez-Carranza, 2009]) disuelta en carboximetilcelulosa de sodio al 0,9% y administrada por vía oral. La comparación fue realizada entre 7 grupos de 12 ratas cada uno: sham (sin ningún tratamiento ni aplicación de ECI), sham+rTMS (sin ECI pero con sesiones de EMTr a 15 Hz), sham+Ven (Sin ECI, pero con tratamiento de venlafaxina), CUMS (ECI, por sus siglas en inglés), CUMS+rTMS (ECI+ EMTr), CUMS+ven (ECI+venlafaxina), CUMS+rTMS+Ven

(ECI+EMTr+venlafaxina); por medio de diversas pruebas, incluida la prueba de sacarosa para definir operacionalmente la condición de anhedonia. Previo a la prueba de sacarosa, las ratas fueron sometidas a exposición forzada a una solución de sacarosa al 1% para eliminar neofobia a la misma, esto por 48 horas. Luego, les presentaron 2 botellas a las ratas, una de ellas con una solución al 1% de sacarosa y la otra botella con agua, durante 24 horas. Durante la prueba, se les dio a las ratas 2 botellas, una con agua y la otra con una solución de sacarosa al 1% durante 1 hora, la posición de las botellas fue cambiada cada media hora (izquierda-derecha) y al final de la prueba se midió la cantidad de agua y de solución en las botellas, y se calculó el índice de preferencia a la sacarosa como % de consumo de sacarosa entre la suma del consumo de sacarosa y el consumo de agua ($\% \text{preferencia de sacarosa} = \frac{\text{consumo de sacarosa}}{[\text{consumo de sacarosa} + \text{consumo de agua}]}$), esta prueba se realizó semanalmente. La figura siguiente (Fig. 7), muestra el índice de preferencia de sacarosa de cada grupo a lo largo de 8 semanas en presencia de ECI (que se aplicó desde la semana de línea base-baseline- hasta la semana 8). En la semana 2 observaron diferencias en el índice de preferencia a sacarosa donde los grupos con ECI mostraron un menor índice con respecto a los grupos sham. A partir de la semana 3 hasta la semana 6, se aplicaron los tratamientos de la forma antes mencionada (EMTr, venlafaxina o combinados). Al término de la aplicación de los tratamientos, los grupos tratados aún en presencia de ECI, presentaron mayor índice de preferencia a la sacarosa comparado con las semanas anteriores al tratamiento y con el grupo que solo fue estresado y no se le aplicó tratamiento alguno (representado como CUMS en la gráfica). Dos semanas después de finalizados los tratamientos, a pesar de que se observó un índice de preferencia a la sacarosa 15% menor que durante el tratamiento, se observó mayor índice de preferencia a la sacarosa que el grupo CUMS (éste último con un 15% de preferencia). El índice de preferencia a la sacarosa, como se mencionó anteriormente, es indicadora de comportamiento anhedónico, que es un síntoma característico en el desorden de depresión mayor, los resultados de este estudio mostraron que el tratamiento crónico de EMTr con 15 Hz suprimen significativamente este comportamiento, además de que el efecto existe aún dos semanas después de terminar el tratamiento sugiriendo un efecto tipo antidepresivo de la EMTr, a largo plazo [Feng et al., 2012].

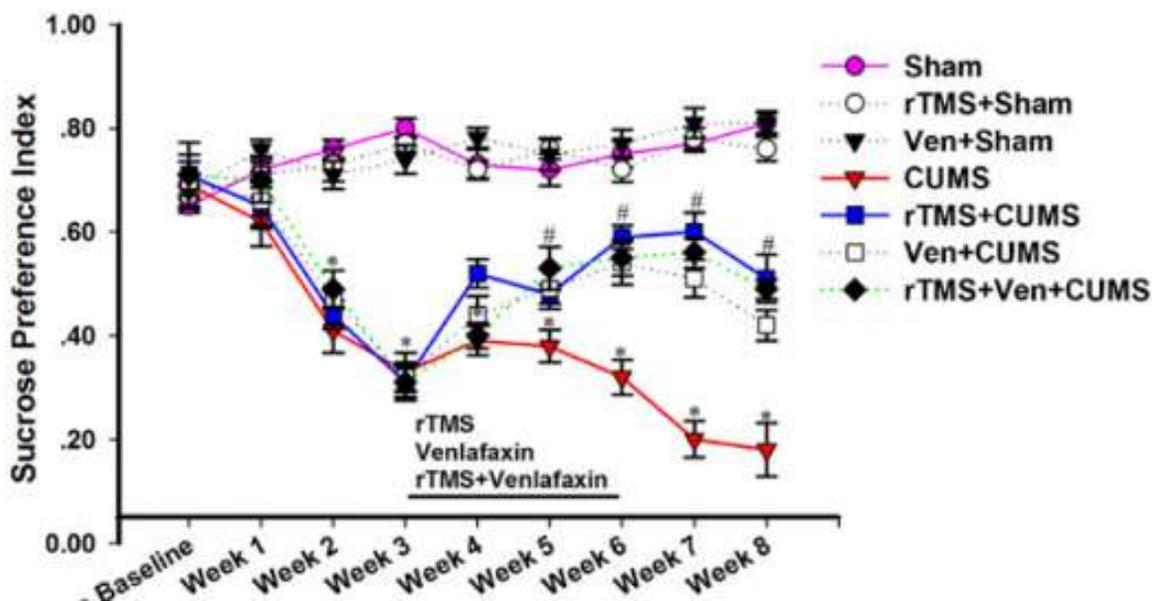


Fig. 7. Índice de preferencia de sacarosa. El gráfico muestra los cambios en el índice de preferencia de sacarosa de cada grupo a lo largo de 8 semanas, de las cuales 3 semanas tuvieron tratamiento (EMTr, venlafaxina o combinados), de la semana 3 a la semana 6 y dos semanas más sin tratamiento (semana 7 y 8). El ECI se mantuvo durante las 8 semanas. * $p < 0.05$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs ECI. Tomado de Feng et al., 2012.

Efectos similares se encontraron en la prueba de nado forzado realizada por este mismo grupo de investigadores. Para esta prueba, colocaron a los ratones en un tanque con agua de 55 cm de altura por 35 de diámetro llenado con agua a 23 ° C y una profundidad de 15 cm, esto durante 5 minutos. El parámetro de tiempo de inmovilidad, que se muestra en la figura 8, fue considerado a partir de que tres de las extremidades de la rata estuvieran inmóviles y la cuarta extremidad solo exhibiera movilidad mínima. La prueba de nado forzado realizada en este estudio mostró un comportamiento de inmovilidad mayor en los grupos expuestos a ECI (o CUMS como se muestra en la figura), tanto en la sexta semana como en la octava semana, lo que indica un comportamiento tipo depresivo acentuado en los grupos bajo ECI versus los grupos sham. Como se observa en la gráfica (Fig. 8), la EMTr y Venlafaxina no afectan el tiempo de inmovilidad en los grupos Sham (sin tratamiento), pero ambos métodos disminuyen significativamente el tiempo de inmovilidad en los grupos bajo ECI ($p < 0.05$), además, se puede observar que la combinación de éstos, no tiene efecto adicional comparado con los grupos con los mismos tratamientos aplicados por separado, lo que indica que tanto la EMTr como la venlafaxina son terapias con efecto similar pero que no interaccionan si se aplican en conjunto. Relacionado a la persistencia del efecto a lo largo del tiempo, en la semana 8 se registra que, a pesar de ya

no estar bajo la EMTr, los que estuvieron en tratamiento tanto con venlafaxina como con EMTr, mantienen su tiempo de inmovilidad por debajo del grupo bajo ECI sin tratamientos, lo que indica que, en cuanto al efecto a largo plazo, la EMTr es similar a los resultados con venlafaxina.

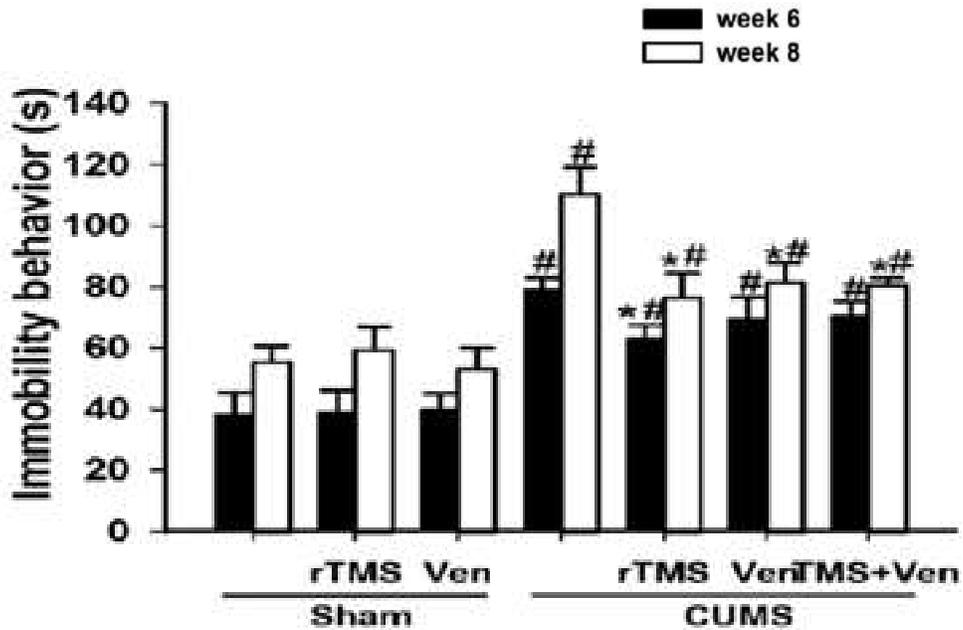


Fig. 8. Prueba de Nado forzado. Se muestra el tiempo de inmovilidad que presentan los diversos grupos de estudio (n=12 para cada grupo), en la sexta semana (barras blancas) y en la octava semana (barras negras). Los resultados se expresan en error estándar de la media. #p<0.05 vs grupo Sham; *p<0.05 vs grupo CUMS. Tomado de *Feng et al., 2012*.

Los antecedentes antes expuestos muestran el panorama de la información relacionada con la persistencia de los efectos de la EMTr y cómo aún esta información es limitada en aspectos como la estandarización en protocolo de administración, es decir, la frecuencia a usar, así como el número de pulsos, la intensidad y el lapso en que deben ser aplicadas las sesiones, ya sea como tratamiento crónico o bien, saber si es necesario el mantenimiento del tratamiento y, de ser así, por cuánto tiempo y de qué manera distribuir dichas sesiones, teniendo como objetivo, utilizar de la mejor manera esta técnica y así aumentar la calidad de vida a largo plazo, de las personas que padecen el trastorno de depresión mayor.

JUSTIFICACIÓN

Dado que la EMTr representa una buena alternativa para tratar la depresión y que es ampliamente usada en la clínica, es pertinente aportar información acerca del plazo en el que persiste su efecto antidepresivo, lo cual será posible a través del estudio de los mecanismos por medio de los cuales se logran dichos resultados, siendo la remodelación dendrítica, un candidato a ser el fenómeno involucrado en los resultados a partir de la aplicación de la EMTr, por estar este fenómeno involucrado en la neuroplasticidad que es una habilidad que se encuentra afectada cuando existe un trastorno de depresión, lo que provoca alteraciones en la conectividad entre el hipocampo y la corteza prefrontal, zonas relacionadas con la correcta ejecución de capacidades cognitivas y emocionales.

HIPÓTESIS

El efecto antidepresivo de la aplicación de sesiones de EMTr con frecuencia a 5 Hz a ratones previamente expuestos a ECI, continúa un mes después de haber cesado las sesiones de tratamiento aplicadas de manera crónica (una sesión diaria de lunes a viernes durante 4 semanas), como consecuencia de la maduración de las espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo.

OBJETIVOS

Generales:

- Evaluar si la EMTr a 5 Hz requiere de aplicaciones de mantenimiento para sostener su efecto tipo antidepresivo.
- Determinar si el efecto tipo antidepresivo de la EMTr a 5 Hz tiene relación con la maduración de las espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo.

Particulares:

- Verificar el efecto tipo antidepresivo de la EMTr a 5 Hz aplicado de manera crónica (5 sesiones por semana durante 4 semanas), en roedores expuestos previamente a ECI por medio de la evolución del comportamiento de autocuidado evaluado a partir del índice del estado de pelaje (EP) y la comparación de los grupos de estudio al evaluar la conducta de desesperanza con la prueba de nado forzado (NF).
- Evaluar la existencia de alteraciones motoras en los sujetos por la presencia de ECI o por la aplicación de EMTr con las pruebas de campo abierto y la prueba rotarod.
- Evaluar la existencia de modificaciones en las espinas dendríticas de las neuronas del giro dentado del hipocampo como consecuencia de la EMTr a 5 Hz una vez finalizado el tratamiento crónico y las sesiones de mantenimiento (a las quince semanas de estudio) por medio de la técnica de impregnación de Golgi-Cox.
- Evaluar si la persistencia del efecto tipo antidepresivo y las modificaciones en la neuroplasticidad causadas por la EMTr a 5 Hz, reflejadas en la remodelación dendrítica, requiere de sesiones de mantenimiento aplicadas durante un mes más, luego de finalizado el tratamiento (disminución gradual del número de sesiones semanales EMTr a 5 Hz durante 5 semanas luego del tratamiento crónico).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental y animales de experimentación

Para el desarrollo de este proyecto, se usaron ratones hembra de la cepa Balb/C, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) con peso promedio de 20 gramos, cuyo alojamiento fue separados por grupos, en cajas de policarbonato, las cuales se colocaron en un cuarto a temperatura ambiente (25°C aproximadamente), con ciclo invertido luz/oscuridad de 12 h (la luz se apaga a las 6 a.m. y se enciende a las 6 p.m.) y acceso a agua y comida *at libitum*. La N corresponde a 35 ratones, distribuidos de manera aleatoria en 5 grupos (n=7), (Fig. 9).

Grupo	Estatus del sujeto	ECI	EMTr (5Hz)	Mantenimiento	Sujetos por grupo (n)
1	Control	-	-	-	7
2	EMTr S/M	+	+	-	7
3	EMTr C/M	+	+	+	7
4	Sham S/M	+	Con exposición sin pulso	-	7
5	Sham C/M	+	Con exposición sin pulso	Exposición sin pulso	7

Fig. 9. Grupos experimentales. Cuadro representativo de los grupos experimentales para este proyecto. Grupo 1= Control (sin ECI ni a tratamiento); Grupo 2= EMTr 5Hz sin mantenimiento; Grupo 3= EMTr 5 Hz con mantenimiento; Grupo 4= Sham sin mantenimiento; Grupo 5= Sham con mantenimiento.

Dado que la incidencia de la depresión es mayor en mujeres que en hombres (proporción de 2:1), se decidió usar ratones hembra de la cepa Balb/C, con el objetivo de imitar en medida de lo posible, a la población más afectada en humanos. Las ratonas fueron expuestas al protocolo de ECI durante 15 semanas (de la semana 1 a la semana 15) previa aclimatación durante una semana considerada como la semana 0 (*Fig. 10*). Lo anterior permite establecer en los sujetos de estudio conductas tipo depresivas para posteriormente poder analizar el efecto antidepresivo que el tratamiento con EMTr a 5 Hz de frecuencia y sus sesiones correspondientes de mantenimiento tiene sobre los grupos de estudio. Para este estudio, el ECI se aplicó desde la semana 1 a la semana 5, e inmediatamente después se inició el tratamiento con EMTr (5Hz).

Las sesiones de EMTr se aplicaron de acuerdo con el umbral motor que se determinó para cada ratón antes de la primera aplicación de EMTr y con las características que serán explicadas en el apartado “Aplicación del tratamiento: Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva a 5 Hz”. Una vez terminado el mes de tratamiento con EMTr a 5 Hz (de semana 5 a semana 9) se realizó el primer set de pruebas conductuales (que a partir de ahora será llamado Batería 1 de pruebas conductuales), para evaluar el estado conductual de los sujetos de estudio hasta ese momento (rotarod, campo abierto y nado forzado, realizadas en ese orden para conservar la jerarquía de menor a mayor impacto o esfuerzo para incrementar la habituación y minimizar interferencias entre las pruebas [*You, et al., 2019*]). El estado de pelaje también fue considerado y éste se midió una vez por semana de manera ininterrumpida hasta finalizar la semana de las últimas pruebas conductuales (semana 15). Durante la batería 1 de pruebas conductuales (semana 9 a 10) no se colocaron estresores ya que las pruebas conductuales *per se* son un reto para los roedores.

Al término de la primera semana de aplicación de las pruebas conductuales, se dieron las sesiones de mantenimiento de EMTr a 5 Hz (con las mismas características que las sesiones de tratamiento, las cuales serán mencionadas más adelante) durante 5 semanas más (semana 10 a semana 15). Las sesiones de mantenimiento de la EMTr se aplicaron en presencia de ECI de la siguiente manera: semana 10 a 11, cuatro sesiones (de lunes a jueves); semana 11 a 12, tres sesiones (de lunes a miércoles); semana de 12 a 13, dos sesiones (lunes y martes); semana 13 a 14 y de 14 a 15, una sesión (lunes únicamente). Nuevamente, al finalizar el mes de las sesiones de mantenimiento, se aplicó una nueva serie de pruebas conductuales a los cinco

grupos de ratones (misma batería que anterior, semana 15 a 16, llamada a partir de este momento, batería 2 de pruebas conductuales). Concluidas las pruebas conductuales, se procedió al sacrificio de los ratones de los cinco grupos evaluados, para obtener muestras de cerebro y sangre (Fig. 10).

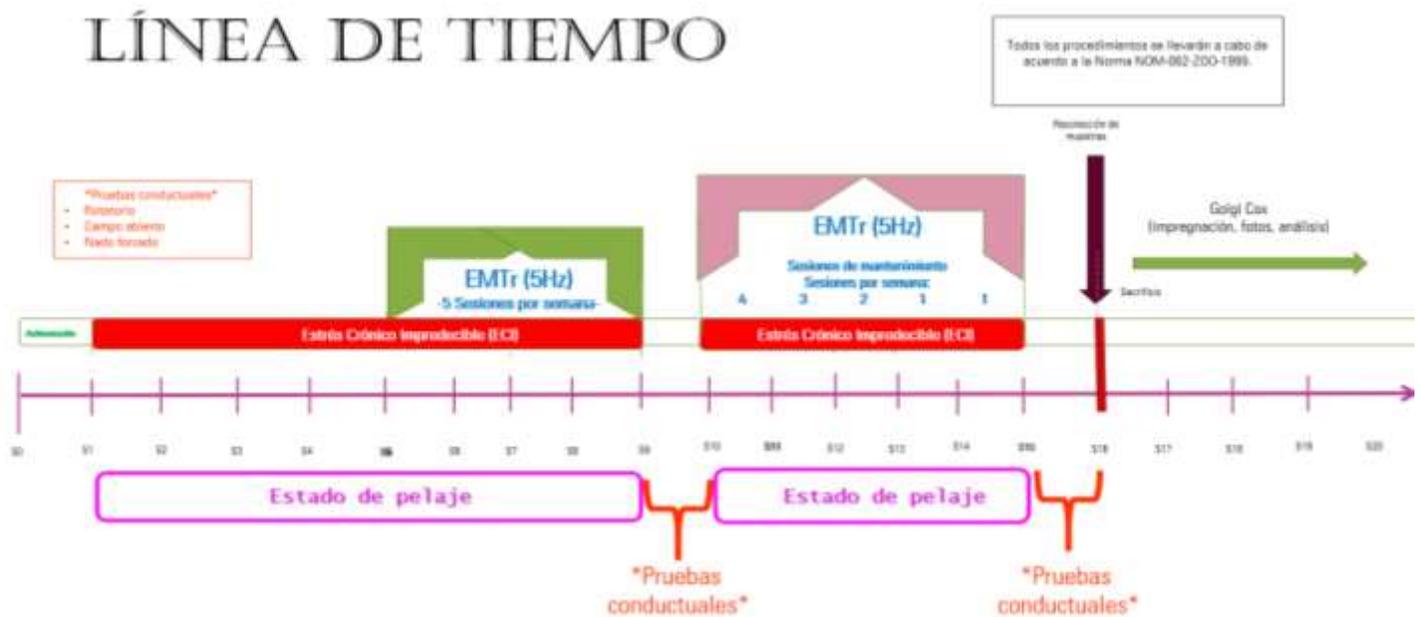


Fig. 10. Estrategia experimental. Línea de tiempo que indica los tiempos en los que se aplicó el estrés crónico impredecible, la EMTr y los momentos en los que se aplicaron las pruebas conductuales. También, se señala el momento en el que se realizó la impregnación de metales con la técnica de Golgi-Cox, para el desarrollo del presente proyecto.

Todos los procedimientos se llevarán a cabo de acuerdo a la Norma NOM-062-ZOO-1999 y en concordancia con lo establecido por el Comité de Ética del INPRFM.

Protocolo de Estrés Crónico Impredecible (ECI)

El protocolo de ECI que se utiliza para este proyecto es una variación de lo realizado por Willner y colaboradores [Willner, P. et al., 1992], que es el protocolo original y del protocolo propuesto por Vega-Rivera [Vega-Rivera, N. M., et al., 2016]. Este modelo de depresión es ampliamente usado debido a que cumple con el criterio de validez aparente, que se refiere a la existencia de similitud con el fenómeno en humanos, entre lo que se observa en el trastorno y el procesos del mismo; el criterio de validez predictiva, que se refiere a si un modelo discrimina o refleja de manera eficiente los efectos que determinadas manipulaciones originan en condición humana y por último, cumple con el criterio de validez de constructo, que se refiere a que el modelo presente consistencia teórica y mida aquello que se pretende medir o simular, en este caso para simular la depresión [Escorihuela & Fernández, 1998] y a partir de esto, poder evaluar el tratamiento de EMTr con una frecuencia de 5 Hz, con sesiones de mantenimiento y sin ellas. Para lograr lo anterior, los ratones fueron expuestos a 2 o 3 estresores por día elegidos al azar entre los propuestos en el siguiente cuadro (Fig. 11) y esto se repite durante 15 semanas.

Los estresores ocupados son los que se muestran en la siguiente figura (Fig. 11) con sus respectivas horas de aplicación para cada uno.

Estresores	Horas de presencia de estresor
✓Oscuridad Continua	3
✓Caja con rotación	1
✓Ruido blanco	3
✓Caja inclinada a 45'	3
✓Cama mojada	6
✓Hacinamiento	1
✓Privación de comida	12
✓Olor a rata	3
✓Luz estroboscópica	6
✓Restricción de movimiento	1
✓Luz continua	8
✓Frío (5°C)	1

Fig. 11. ECI-estresores. La tabla muestra los distintos estresores que pueden ser aplicados para el establecimiento de las conductas tipo depresivas y el lapso de tiempo en que cada uno fue aplicado.

Aplicación del tratamiento: Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva a 5 Hz

La aplicación de la EMTr a 5 Hz, se realiza empleando un estimulador Mag Pro R30 y una bobina refrigerada para roedores con las siguientes características de estimulación: Intensidad de pulso de estimulación del 100% del poder máximo del estimulador, con trenes de duración de 2 segundos, 10 pulsos por tren, 30 trenes con intervalo entre cada tren de 10 segundos, dando un total de 300 pulsos por día [Armas-Castañeda, G. et al., 2015]. Previo al inicio de la aplicación de la EMTr, se determinó el umbral motor (UM) para obtener la intensidad de exposición de los estímulos adecuada para cada individuo. En el caso de los sujetos de este proyecto, el UM se calculó entre 24 y 32%. La estimulación comenzó a partir de la 5ª semana de haber sido iniciado el protocolo de ECI (Semana 5 en la línea de tiempo). La zona a estimular es la corteza prefrontal izquierda, ya que se ha visto que su estimulación con una frecuencia baja (5 Hz) induce un efecto antidepresivo en ratones [Meneses, 2018-en proceso-], (Fig. 12).

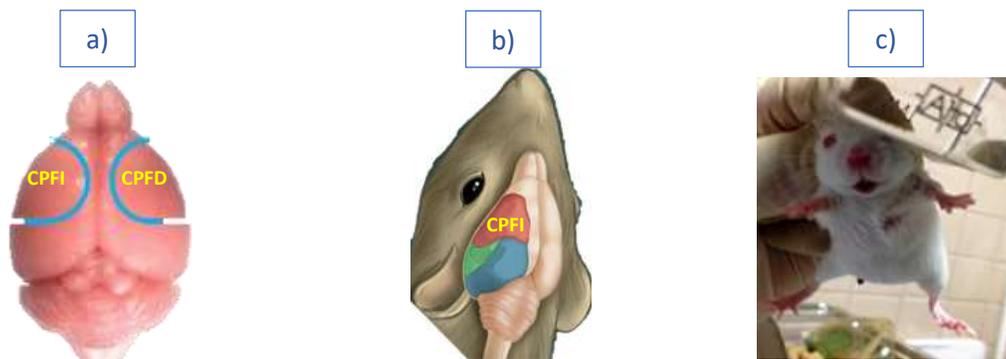


Fig. 12. Esquema de localización de la corteza prefrontal en ratón. Cerebro de ratón con la localización aproximada de la Corteza prefrontal izquierda – CPFI- y la Corteza prefrontal derecha – CPFDR- (a). Localización de manera superficial de la corteza prefrontal izquierda (b). Manipulación del ratón durante la estimulación (c); Imágenes tomadas y modificadas de: a) <http://www.diariorepublica.com/ciencia-y-tecnologia/cientificos-observan-cmo-el-cerebro-se-autolimpia-estudio-en-ratones-vivos>; b) <http://www.nervenet.org/papers/cerebellum2000.html>; c) Tomada en laboratorio de Neurogénesis de INPRFM.

En el caso de los grupos *sham*, la bobina se colocó en la misma ubicación del cráneo de los ratones que en el caso de los ratones ‘estimulados, pero con el equipo apagado y para simular lo más parecido a cuando se estimula realmente, se usa una grabación del sonido del estimulador cuando está en funcionamiento. Previo a la aplicación de la EMTr, todos los ratones fueron sometidos a un periodo de aclimatación durante la toma de estado de pelaje, donde fueron sostenidos de la misma manera que serían colocados en la bobina durante la estimulación o simulación de la estimulación según fuera el caso (grupos EMTr o grupos Sham respectivamente)

Evaluación del estado de pelaje (EP)

A partir de la llegada de los ratones se registró el estado de pelaje (EP) de cada ratón una vez por semana, iniciando a partir del término de la semana 0 y hasta el término de la semana 15, posterior a la última sesión de pruebas conductuales. La medición del estado de pelaje consistió en reportar un índice de las condiciones en que se encuentra el pelaje de cada sujeto, esto nos ayudó a evaluar la calidad del autocuidado del ratón y, en consecuencia, la motivación que éste poseía para acicalarse durante el tratamiento crónico y durante la aplicación de las sesiones de mantenimiento, ya que se ha visto que, el deterioro del estado de pelaje que se observa bajo ECI, es contrarrestado con la administración de antidepresivos [Nollet, et al., 2013]. Puesto que la medición del estado de pelaje posee componente subjetivo, éste se realizó a doble ciego y con previo entrenamiento de los operadores para poder estandarizar las observaciones hechas al pelaje de los ratones.

El índice de EP se realizó por medio de la asignación de un valor entre 0 y 1, donde 0 se refiere a autocuidado óptimo con pelaje limpio, suave, peinado y uniforme; 0.5, estado de pelaje intermedio cuando se empiezan a observar algunas zonas con menos cantidad de pelaje, sucio o despeinado; y 1, donde el estado es deplorable, se observan zonas amplias sin pelaje, con mucha suciedad y despeinadas (Fig. 13).

Las mediciones se realizaron tomando en cuenta el estado de 7 zonas distintas del ratón, las cuales son cabeza, cuello, patas delanteras, espalda, patas traseras, cola y abdomen, a cada una se le asigna un valor entre 0 y 1 pudiendo pasar por los decimales entre estos dos números y se realiza la suma de los datos por individuo para sacar el índice correspondiente que como máximo puede dar un puntaje de 7 [Nollet, et al., 2013] (Fig. 13).

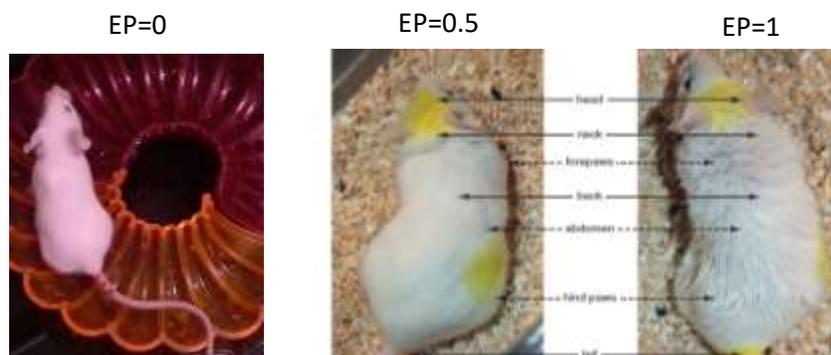


Fig. 13. Estado de Pelaje (EP). Imágenes de referencia donde se observa el estado en que se encuentra el aseo de los sujetos. EP=0, foto tomada de sujeto de protocolo de investigación propio. EP=0.5 y 1, tomados del artículo de Nollet et al 2013.

Pruebas conductuales

Con el fin de analizar el efecto del tratamiento con EMTr a 5 Hz se realizaron pruebas conductuales dentro de las que tenemos:

Rotarod:

La prueba de rotarod, es ampliamente usada para evaluar coordinación motora en roedores [Shiotsuki, et al., 2010], así, por medio de esta prueba, en este trabajo se determinó si existen alteraciones en la motricidad de los roedores después del tratamiento.

El ratón se colocó en una barra horizontal que gira sobre su propio eje [Hamidi, A., 2015. Tomado de: <https://mazeengineers.com/maze-basics-rotarod-test-for-mice/>]. En la primera fase, el roedor permaneció por 5 minutos sobre el cilindro horizontal sin que éste se encontrara girando (fase de aclimatación). La segunda fase, realizada 5 minutos después de la primera fase, consistió en colocar al ratón sobre el mismo cilindro, pero esta vez, el cilindro se encontraba girando con movimiento constante por 2 minutos. En la tercera fase el movimiento del cilindro se aceleraba conforme el tiempo transcurría hasta que se completó el tiempo de la prueba o el ratón caía del cilindro, el número de revoluciones por minuto (o rpm) es individual y fue de 6 a 18 rpm, dependiendo del tiempo de permanencia en el cilindro, ya que, a mayor tiempo, mayor aceleración resistió el ratón. Este procedimiento se repitió en 3 sesiones con separación de 15 minutos entre ellas, en las cuales se cuantificó el tiempo de permanencia sobre el cilindro en movimiento acelerado y se comparó ese tiempo entre las 3 sesiones y entre los grupos (Fig. 14).

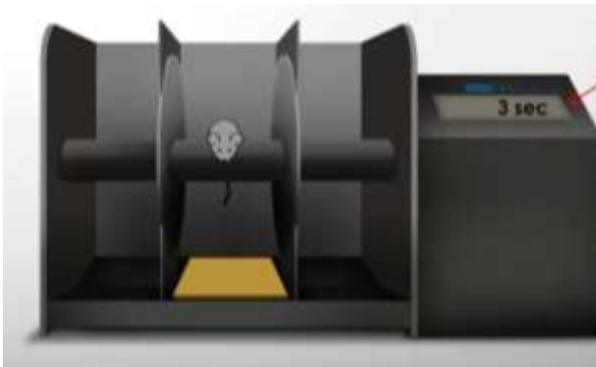


Fig. 14. Prueba de Rotarod en ratones. La imagen ejemplifica la forma en que se coloca el ratón sobre el aparato de rotarod al hacer la prueba. Se mide el tiempo de permanencia en el rodillo mientras este gira. La prueba ayuda a evaluar motricidad del sujeto. Tomado de <https://mazeengineers.com/maze-basics-rotarod-test-for-mice/>.

Campo abierto:

Esta prueba fue complementaria al rotarod para descartar alteraciones en la motricidad. La prueba consistió en exponer al ratón a un ambiente desconocido del que no podía huir, pero a su vez, por el que podía transitar libremente. En el presente trabajo la prueba se realizó de la siguiente manera: se preparó una cama de aserrín limpio con una profundidad aproximada de 2 cm, sobre una caja de policarbonato de 44 cm de largo x 34 cm de ancho x 15 cm de altura. Posterior a esto el ratón se colocó en la caja y se grabó su comportamiento durante 5 minutos. Para el análisis se usó el programa *ANY-Maze* de *Stoelting*, para ello fue necesario delimitar cuadrantes sobre el campo abierto, que corresponde a la cama de aserrín sobre la caja, por medio de una cuadrícula dibujada con el mismo programa para conseguir 9 cuadrantes (8 correspondientes a periferia y 1 a centro). Por medio del programa, se cuantificó el número de cruces entre el centro (cuadrante rojo en fig 15) y la periferia (cuadrantes azules), por medio de la detección de movimiento del ratón sobre las líneas de los cuadrantes.

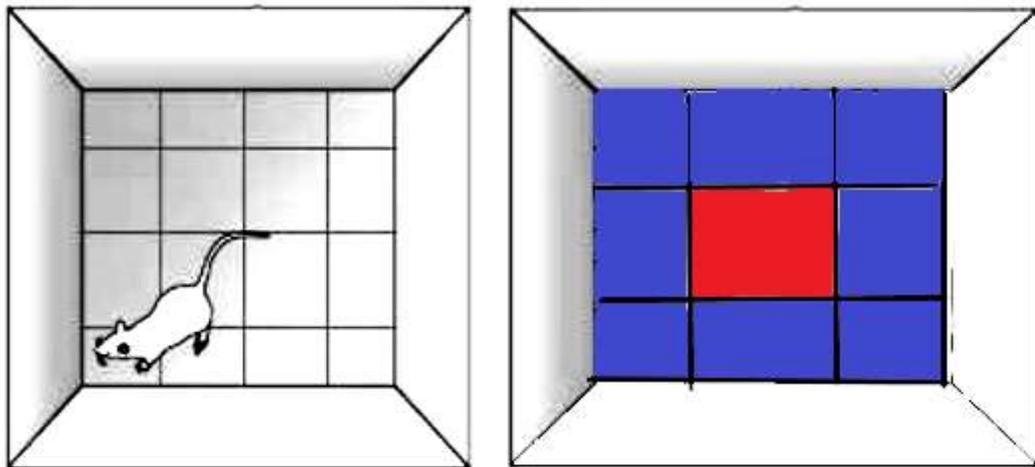


Fig. 15. Campo abierto. La imagen muestra a un ratón recorriendo libremente el espacio donde se encuentra (izquierda). Esta prueba ayuda a medir los cruces entre el centro (cuadrante rojo) y la periferia (cuadrantes azules) para evaluar el grado de motricidad de los ratones. Tomado y modificado de: <https://psicologiaeficaznl.wordpress.com/2015/11/20/modelos-animales-en-psicologia-test-de-campo-abierto/>.

Nado forzado:

Esta prueba está diseñada para evaluar la desesperanza en los sujetos de estudio [Yankelevitch-Yahva, et al., 2015] y consiste en colocar al ratón en un tanque de agua limpia y templada durante seis minutos sin ningún sitio al que pueda escalar para salir del agua [Feng, et al 2012] (Fig. 16). Los parámetros que se midieron fueron la latencia al primer episodio de inmovilidad, el tiempo de inmovilidad y el número de ocasiones que el animal dejó de nadar (Fig. 16).

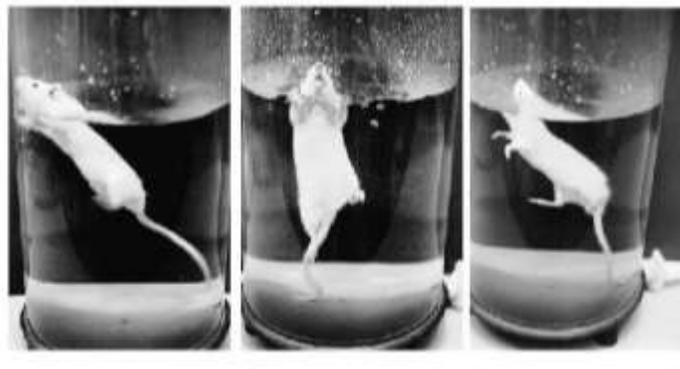


Fig. 16. Nado forzado. Ejemplo de realización de la prueba de nado forzado con ratones. Los ratones se colocan en un recipiente con agua sin posibilidad de salir de ella. Se mide el tiempo en que el ratón lucha por seguir flotando. Ayuda a medir conducta de desesperanza. Tomado de: <https://docplayer.es/71446172-Comparacion-del-efecto-tipo-antidepresivo-de-fluoxetina-y-duloxetina-entre-ratas-macho-y-hembra.html>.

En la figura 17 se enlistan las condiciones conductuales que mide cada test:



Fig. 17. Pruebas conductuales. Cada prueba ayuda a medir distintos estados anímicos y condiciones en las que se encuentra psicológicamente el ratón, para poder evaluar conductas tipo depresivas y a su vez efecto del tratamiento sobre el sujeto.

Técnica de impregnación de Golgi Cox

Al finalizar la semana 15, y una vez concluidas las pruebas conductuales, se procedió a sacrificar a los animales de experimentación. El hemisferio izquierdo de 3 de los sujetos de cada grupo, se utiliza para realizar la impregnación con la técnica Golgi Cox (Fig. 18).



Fig. 18. Esquema de muestras recolectadas para técnica de Golgi Cox. De cada sujeto se tomó el hemisferio izquierdo para realización de la técnica de impregnación de Golgi Cox. Sólo 3 sujetos de cada grupo, siendo un total de 15 hemisferios izquierdos.

La técnica Golgi-Cox, es una variación de la realizada por Golgi a la cuál él mismo llamó reacción negra (*reazione nera*, en italiano). La técnica original se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argénico producidos como consecuencia de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata; la variación conocida como Golgi-Cox, consiste en la adición de tetróxido de osmio al bicromato de potasio (método de Golgi rápido), y la utilización de cloruro de mercurio en vez de nitrato de plata para obtener la impregnación con mercurio metálico, a esta impregnación, Cox agregó cromato de potasio y éste es el método conocido como método de Golgi-Cox [Torres-Fernández, O., 2006]. En este trabajo la técnica de impregnación se realizó con el *Kit FD Rapid GolgiStain™* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al finalizar la impregnación, el tejido se seccionó en un microtomo para obtener cortes sagitales de 150 micras de grosor y se seleccionaron los cortes que presentaron secciones del hipocampo para poder visualizar el giro dentado del mismo. Posteriormente, se cuantificaron espinas dendríticas presentes en las células granulares del

giro dentado (Fig. 19a). Además, se realizó la clasificación de las espinas dendríticas con base en su grado de maduración. Esta clasificación permite establecer tres categorías: 1) *stubby*-gruesas, 2) *thin*-delgadas o 3) *mushroom*-hongo (Fig. 19b).

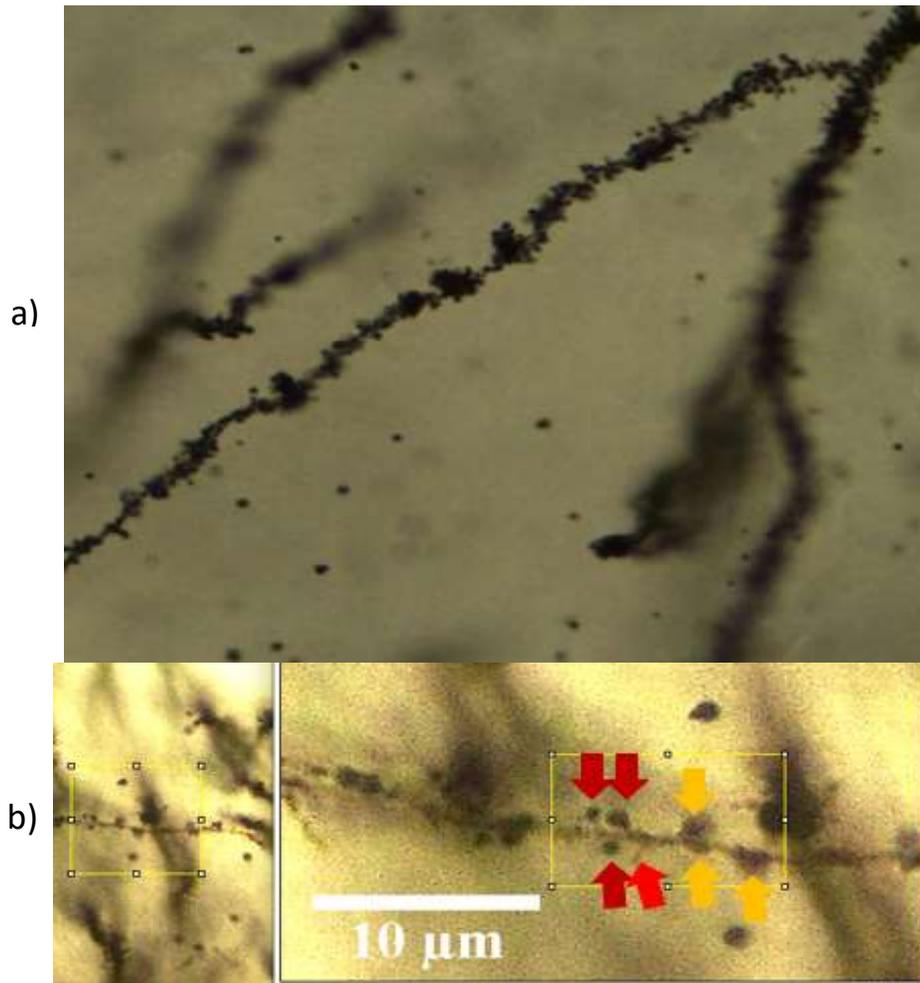


Fig. 19. Dendrita secundaria. a) Dendrita secundaria de neurona ubicada en el giro dentado del Hipocampo de ratón hembra. b) se pueden observar dendritas de tipo *Thin* (naranja), *Stubby* (amarilla) y *mushroom* (roja) amplificación, conteo en 10 micras

[Foto tomada para este proyecto a 100x]

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa *SigmaPlot*. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron análisis de varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías dependiendo de los parámetros analizados. Las comparaciones múltiples se realizaron aplicando la prueba post hoc de Bonferroni estableciendo un valor de $p \leq 0.05$.

Se empleó el ANOVA de una vía en los datos de campo abierto, nado forzado y en la cuantificación de espinas dendríticas en 10 micras de neuronas del giro dentado del hipocampo.

Para el caso de los datos que se ajustaron a una distribución normal, se utilizaron ANOVAs de una vía normales, y en el caso de los datos que no se ajustaron a una distribución normal se utilizaron ANOVAs de una vía en rangos.

Por otro lado, se utilizó el ANOVA de dos vías en los casos donde se analizaron dos factores, por ejemplo, se usó para analizar estadísticamente el efecto de la EMTr en la morfología de las espinas dendríticas (Factor A: tratamiento, Factor B: clasificación); también se empleó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, en los análisis donde los datos se obtuvieron de los mismos individuos pero en distintos momentos como fue en el caso de en la evaluación del estado de pelaje (Factor A: tratamiento y Factor B: tiempo) y en el análisis del efecto de la EMTr en la coordinación motora en la prueba de Rotarod (Factor A: Tratamiento y Factor B: sesión).

RESULTADOS

A continuación, se presentan los datos obtenidos de las pruebas realizadas en este trabajo de investigación:

Efecto de la EMTr sobre la motricidad evaluada en el rotarod y en el campo abierto

Inicialmente se descartó que la EMTr produjera alteraciones en la motricidad de los ratones en todos los grupos (Fig. 20). El análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas aplicada en la batería 1 (Fig. 20a) no reflejó la interacción entre los factores tratamiento y sesión ($F_{(4,62)}=0.37$; $p=0.82$) y sólo se observaron efectos principales en el factor sesión ($F_{(2,62)}=4.7$; $p=0.031$). Entre los grupos se encontró que a lo largo de las sesiones independientemente del grupo existió un mejoramiento en el desempeño de los animales entre la sesión 1 y 3 ($p=0.029$). Del mismo modo que en la batería 1 no se encontró interacción entre los factores tratamiento X sesión ($F_{(8,89)}=1.69$; $p=0.12$) en la batería 2 (Fig. 20b). Este resultado indica que ni la aplicación de constantes estresores, ni la aplicación de EMTr a 5 Hz, ocasiona daño motor en los animales de experimentación en este estudio.

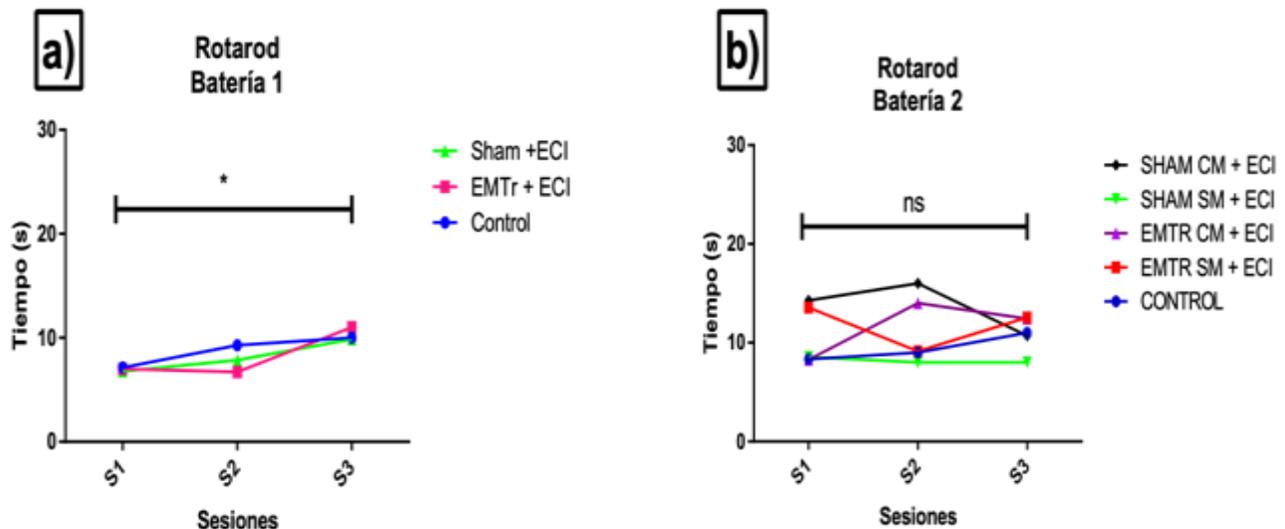


Fig. 20. Prueba Rotarod. a) Batería 1. Se observa diferencia significativa entre sesiones en todos los grupos. b) Batería 2. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni entre tratamiento.

Además, los posibles efectos de la EMTr a nivel motor fueron evaluados en la prueba de campo abierto (*Fig. 21*). El análisis de varianza de una vía del número de cruces reflejó cambios entre el grupo control vs el grupo sham y vs el grupo EMTr, pero no entre los grupos sham y EMTr, ($F(2,32)=6.981$; $p=0.003$; $\alpha=0.05$) (*Fig. 21a*). El comportamiento que se encontró cuando se aplicó la prueba de campo abierto después de las sesiones de mantenimiento (*Fig. 21b*), no fue significativamente diferente entre los grupos ($H=4.643$; $d.f.=4$; $p=0.326$), es decir el número de cruces totales en cada grupo (control, Sham-SM, EMTr-SM, Sham-CM y EMTr-CM) no mostró diferencias significativas al ser comparados entre ellos. Estos resultados confirman que la EMTr no promueve cambios en la motricidad de los roedores.

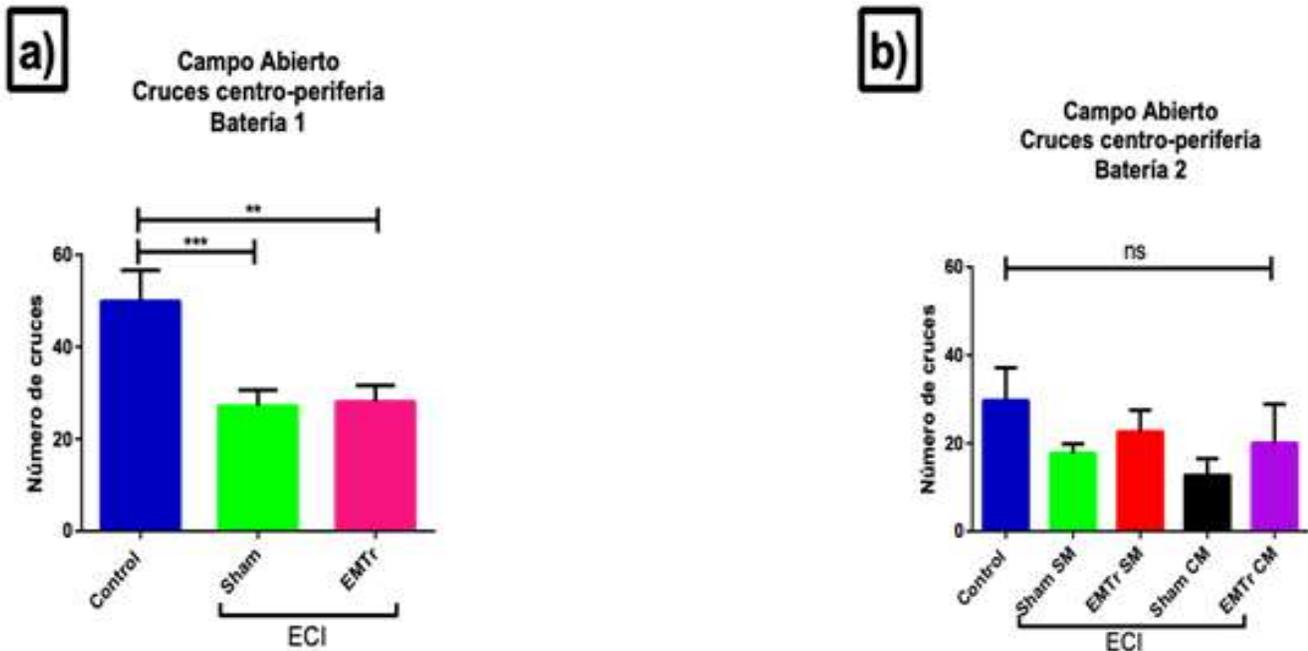


Fig. 21. Prueba de Campo Abierto. a) Número de cruces centro-periferia. a) Bateria 1. El análisis de una vía en rangos no mostró cambios estadísticamente significativos entre los grupos control, sham y EMTr. b) Número de cruces centro periferia. Bateria 2. Al igual en la primera aplicación del campo abierto, el análisis realizado al finalizar las sesiones de mantenimiento no mostró diferencias estadísticamente significativas.

Efecto de la EMTr sobre la condición del pelaje (auto cuidado)

En la figura 22 se muestran las mediciones semanales del estado de pelaje que refleja el autocuidado a lo largo de las 15 semanas del protocolo de investigación. La primera semana correspondió al tiempo de aclimatación para los sujetos de estudio, es decir, el periodo en el que los ratones se adaptaron al lugar donde estarán alojados durante la realización de este proyecto. En la primera etapa que duró de la semana 1 a la semana 9 se tuvieron tres grupos que fueron el grupo control (Ctrl-línea azul), estimulado (EMTr- línea rosa) y simulado de EMTr (Sham-línea verde). En la semana 1 inició el protocolo de ECI y de acuerdo con los datos arrojados por el estado de pelaje, fue en la semana 5 donde los grupos expuestos a ECI (EMTr-rosa y Sham-verde) presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control no estresado (** $p=0.001$). Es decir, los grupos expuestos a ECI mostraron mayor deterioro en el estado del pelaje que indica pérdida de la motivación y por tanto sugiere una conducta de tipo depresiva, por esta razón, la semana 5 fue elegida para el inicio del tratamiento con EMTr a 5 Hz.

A lo largo de las semanas 6 a 8 no observamos diferencias entre el grupo tratado con EMTr y el grupo Sham, aunque el deterioro en el pelaje de estos grupos fue notorio en comparación con el grupo Control (** $p=0.001$). Sin embargo, en la semana 9 se observó que los roedores tratados con EMTr a 5 Hz disminuyeron el deterioro del pelaje en comparación con el grupo Sham (** $p=0.001$). El análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas reflejó la interacción entre los factores tratamiento X semana ($F_{(18,209)}=29.26$; $p<0.001$). Este resultado indicó que la EMTr a 5 Hz revirtió el efecto del ECI sobre la alteración en el autocuidado.

A partir de la semana 10 se formaron 5 grupos para evaluar que el efecto de la EMTr sigue presente sobre el autocuidado, así como la necesidad de la aplicación de sesiones de EMTr para mantener su efecto tipo antidepressivo. En la semana 10 se empezaron las sesiones de mantenimiento que fueron disminuyendo paulatinamente siendo 4 sesiones en la primera semana, mientras que 3, 2, 1 y 1 sesiones de EMTr se aplicaron en las semanas 11 a la 15, respetivamente). Como se observa en la figura 22, El análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas reflejó la interacción entre los factores tratamiento X semana ($F_{(20,207)}=4.37$; $p<0.001$).

El estado del pelaje al inicio de la semana 10 indicó que los animales correspondientes al grupo Sham que fueron asignados aleatoriamente y que no fueron expuestos al estimulador (Sham-SM) o bien aquellos animales que si fueron expuestos al estimulador apagado (Sham-CM) durante las semanas 10 a la 15, mantenían un mayor deterioro en el pelaje en comparación con los roedores del grupo control y con los roedores asignados a los grupos EMTr que no recibirían sesiones de mantenimiento (EMTr-SM), de igual forma, con los roedores que si recibirían sesiones de mantenimiento (EMTr-CM), (en todas las comparaciones $p < 0.05$), sin observarse diferencias entre los grupos EMTr. Un comportamiento similar al anterior se observó en la semana 12 y 13. Sin embargo, en la semana 13 se encontró disminución en la alteración del estado del pelaje en el grupo EMTr-CM en comparación con el grupo EMTr-SM ($p = 0.006$) aunque esta diferencia no se mantuvo en la semana 14, en la semana 15 se encontró el mejoramiento en el estado del pelaje que fue más notorio en el grupo EMTr-CM que en el grupo EMTr-SM ($p = 0.049$). Estos resultados sugieren que las sesiones de mantenimiento favorecen la mejora en el estado del pelaje de ratones expuestos a ECI.

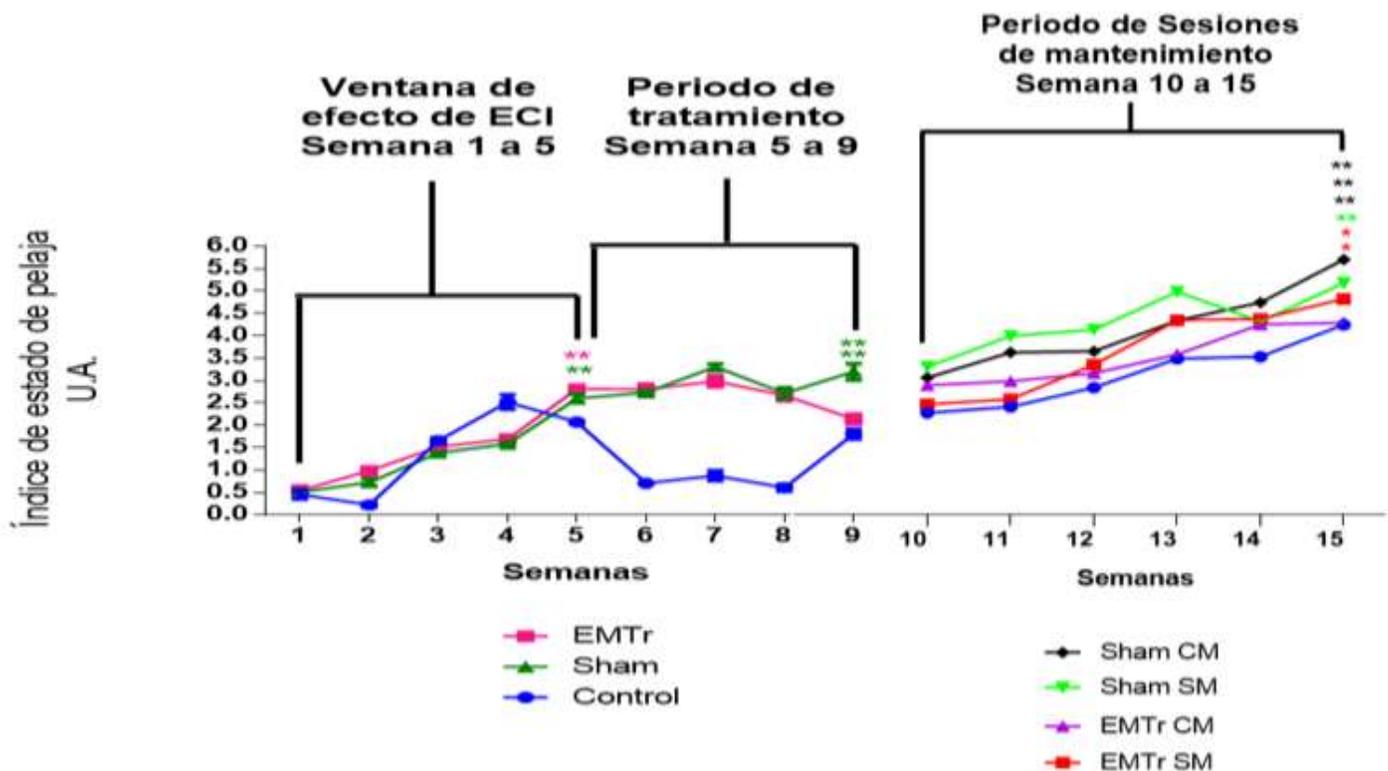


Fig. 22. Gráfica temporal del Estado de pelaje. En la figura se muestra la determinación semanal del estado de pelaje. En la primera parte de la gráfica (lado izquierdo) se muestra el estado del pelaje de la semana 1 a la 5 en las que se determinó el efecto del estrés crónico impredecible sobre el deterioro del pelaje. En la parte media de la gráfica se observa el periodo en el que se aplicó el tratamiento de la semana 6 a la semana 10 y en la parte del lado derecho se muestra el tiempo en el que se aplicaron las sesiones de mantenimiento Grupo Control representado con línea azul, Sham sin mantenimiento (Sham SM) corresponde a la línea verde, Estimulado sin mantenimiento (EMTr SM) se observa en rojo, Sham con mantenimiento (Sham CM) es representado con línea color negro y el Estimulado con mantenimiento (EMTr CM) se puede observar con la línea morada.

Efecto de la EMTr sobre la desesperanza evaluada en el nado forzado

A partir de la prueba de nado forzado se evaluaron la latencia al primer episodio de inmovilidad (Fig. 23), frecuencia de eventos de inmovilidad (Fig. 24) y tiempo de inmovilidad (Fig. 25). El análisis de los parámetros del nado forzado revelaron que el grupo expuesto a ECI mostró una menor latencia para presentar el primer evento de inmovilidad ($p < 0.001$), una mayor frecuencia de episodios de inmovilidad ($p < 0.001$) y un mayor tiempo de inmovilidad ($p < 0.001$) en comparación con el grupo control ($F(2,34)=34.30$; $p < 0.001$; $F(2,34)=17.49$; $p < 0.001$; $F(2,34)=16.55$; $p < 0.001$; respectivamente). Además, en el grupo EMTr disminuyeron los efectos del ECI en los tres parámetros evaluados ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$; respectivamente). Estos resultados indican que la EMTr revierte la conducta de desesperanza ocasionada por el ECI.

Por otra parte, la evaluación de los animales en la segunda batería aplicada después de las sesiones de mantenimiento reflejó que los ratones del grupo Sham-SM presentaron menor latencia al primer episodio de inmovilidad ($p = 0.006$), mayor frecuencia de episodios de inmovilidad ($p = 0.028$) y un mayor tiempo de inmovilidad ($p = 0.008$) que los ratones del grupo EMTr-SM. Respecto a los ratones que recibieron las sesiones de mantenimiento de EMTr a 5 Hz se observó una latencia mayor al primer evento de inmovilidad ($p < 0.001$), menor frecuencia en el número de episodios de inmovilidad ($p < 0.001$) y menor tiempo de inmovilidad, aunque este último no fue estadísticamente significativo ($p = 0.06$) en comparación con el grupo Sham-CM.

La comparación entre los grupos Sham indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas en los parámetros evaluados en la prueba de nado forzado. Mientras que la comparación de los grupos EMTr mostró que, en el parámetro de la frecuencia de eventos de inmovilidad, el grupo EMTr-SM presentó una frecuencia mayor que la observada en el grupo EMTr-CM ($p = 0.033$). En los parámetros de la latencia al primer evento de inmovilidad y en el tiempo de inmovilidad se encontró un aumento en la latencia y una disminución en el tiempo de inmovilidad en el grupo EMTr-CM que en el grupo EMTr-SM, aunque la comparación estadística no indicó un cambio significativo entre esos grupos (latencia: $F(4,33)=12.78$; $p < 0.001$; frecuencia: $F(4,33)=11.31$; $p < 0.001$; tiempo: $F(4,33)=9.82$; $p < 0.001$).

En conjunto los resultados confirman que la EMTr a 5Hz produce un efecto tipo antidepresivo al disminuir la desesperanza en roedores que fueron expuestos al ECI. Además, los resultados

indican que el efecto de la EMTr a 5 Hz mantiene su efecto tipo antidepresivo cinco semanas después de que cesaron las sesiones de estimulación y que las sesiones de mantenimiento mejoran el efecto tipo antidepresivo de la EMTr a 5 Hz, de manera significativa en la frecuencia del número de eventos que reflejan desesperanza.

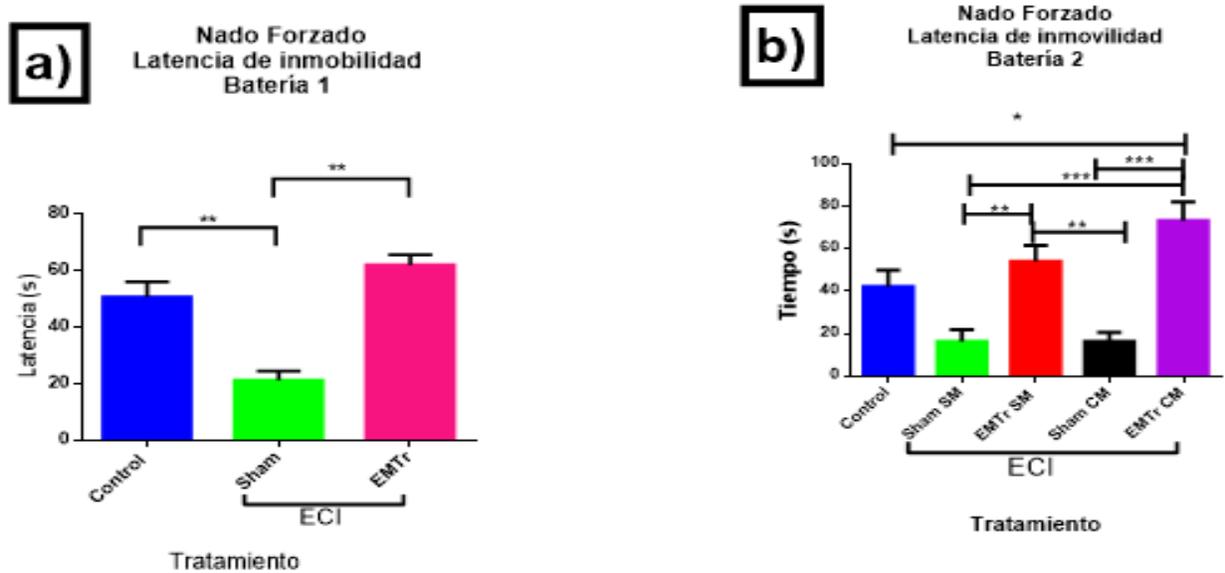


Fig. 23. Prueba Nado forzado. Latencia del primer episodio de inmovilidad. a) Batería 1, se observan diferencias significativas entre el grupo EMTr y su Sham b) Batería 2, se observa una mayor latencia de los grupos EMTr SM y CM con respecto a sus grupos Sham.

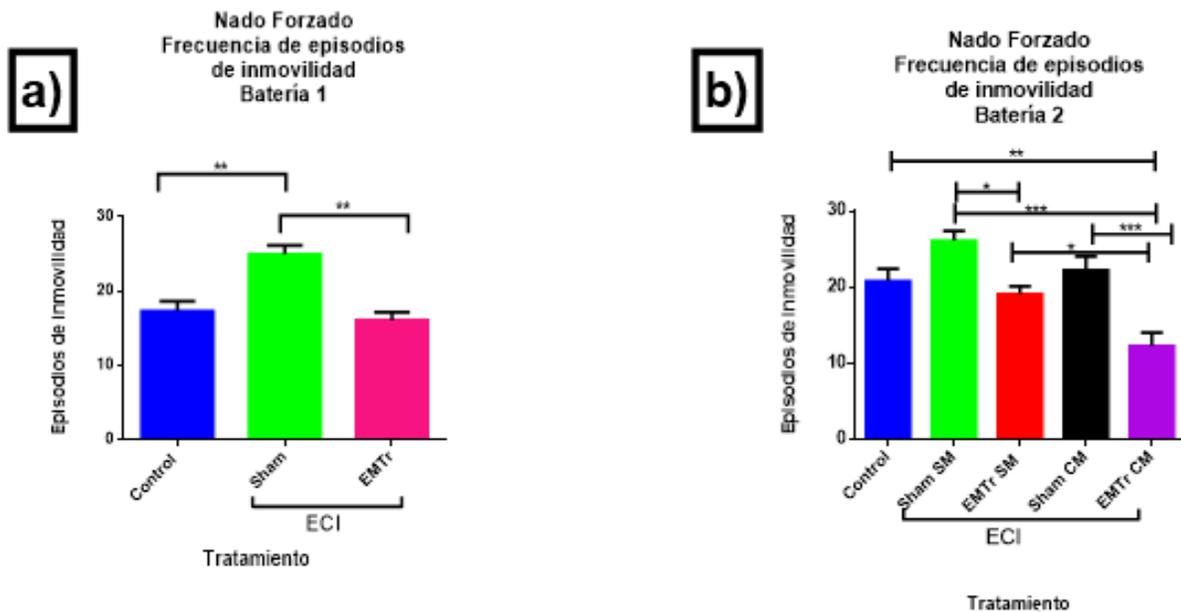


Fig. 24. Prueba Nado forzado. Frecuencia de episodios de inmovilidad. a) Batería 1, se observan diferencias significativas entre el grupo EMTr y su Sham b) Batería 2, se observa una menor frecuencia de los grupos EMTr SM y CM con respecto a sus grupos Sham.

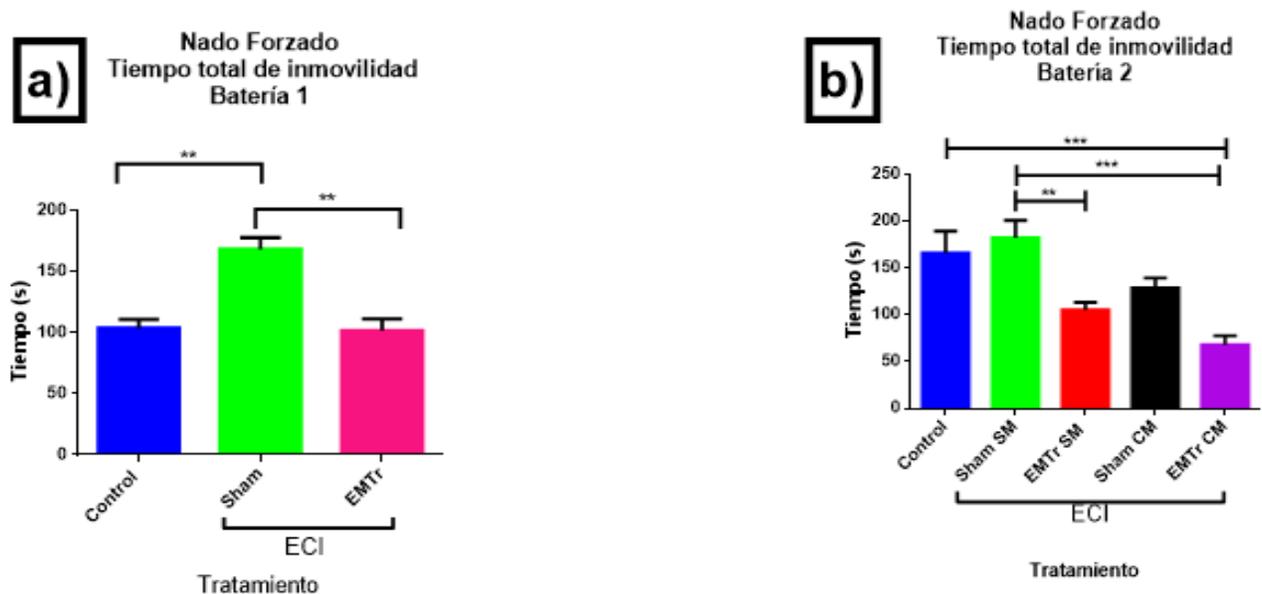


Fig. 25. Prueba Nado forzado. Tiempo total de inmovilidad. a) Batería 1, se observan diferencias significativas entre el grupo EMTr y su Sham b) Batería 2, se observa un menor tiempo de inmovilidad de los grupos EMTr SM y CM con respecto a sus grupos Sham.

Efecto de la EMTr sobre las espinas dendríticas de las células granulares del giro dentado del hipocampo después de las sesiones de mantenimiento

Uno de los aspectos que pueden ser blanco de la EMTr es la modulación de la neuroplasticidad y uno de los eventos de este proceso es la modificación en el número de las espinas dendríticas, así como su maduración [Ramírez-Rodríguez, et al., 2014]. El número de espinas dendríticas en el grupo Sham-SM disminuyó en comparación con el grupo control ($p < 0.001$), un efecto similar se observó en el grupo EMTr-SM ($p = 0.009$) mientras que en los grupos Sham-CM y EMTr-CM el número de espinas dendríticas no fue diferente al grupo control. En cuanto al número de espinas en los grupos Sham-SM o Sham-CM en comparación con los grupos EMTr-SM o EMTr-CM no fue estadísticamente diferente, aunque el número de espinas en el grupo EMTr-CM fue mayor que el número encontrado en el grupo EMTr-SM ($p = 0.026$), revirtiendo el efecto del ECI sobre las espinas dendríticas. Un efecto similar se observó en la comparación de los grupos Sham-CM versus Sham-SM ($p = 0.011$) ($F_{(4,14)} = 18.67$; $p < 0.001$) (Fig. 26).

Espinas dendríticas por 10 micras

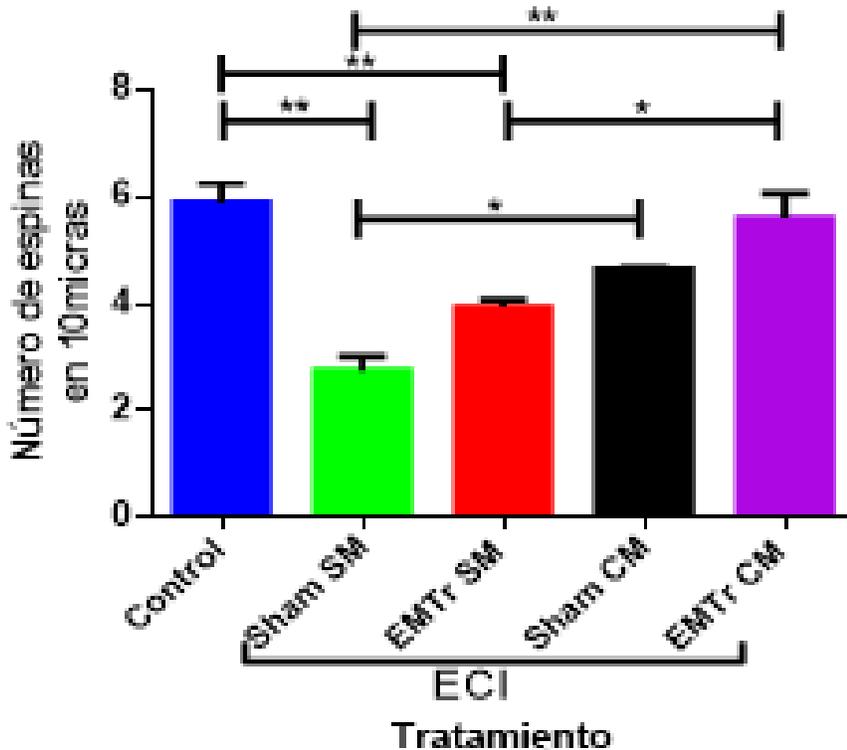


Fig. 26. Análisis de datos obtenidos del Golgi Cox. Promedio de espinas dendríticas en 20 dendritas secundarias en cada sujeto por grupo. Conteo de espinas dendríticas en 10 micras.

Considerando que las espinas dendríticas siguen un proceso dinámico en su formación y maduración se cuantificó el número de espinas de acuerdo con su estadio de maduración (thin o delgadas, stubby o gruesas, y mushroom o tipo hongo) (Fig.27).

El análisis de varianza de dos vías indicó que existe una interacción entre los factores tratamiento y tipo de espinas ($F(8,44)=8.06$; $p<0.001$). El número de espinas de la categoría gruesa mostró una disminución estadísticamente significativa en el grupo Sham-SM ($p=0.034$), mientras que los roedores de los grupos EMTr-SM y EMTr-CM mostraron un mayor número de espinas dendríticas que los grupos Sham-SM y Sham-CM, aunque no fueron estadísticamente diferentes. En cambio, el número de espinas dendríticas de la categoría delgada disminuyó en los grupos Sham-SM ($p<0.001$) y EMTr-SM ($p<0.001$) en comparación con el grupo control. Mientras que el número de espinas dendríticas delgadas aumentó significativamente en los grupos Sham-CM ($p<0.001$) y EMTr-CM ($p<0.001$) en comparación con los grupos Sham-SM y EMTr-CM,

respectivamente. Además, el número de espinas delgadas en el grupo Sham-CM aumentó en comparación con el grupo EMTr-CM ($p=0.009$).

Finalmente, la comparación del número de espinas tipo hongo de los grupos Sham-SM, EMTr-SM, Sham-CM y EMTr-CM no fue estadísticamente diferente en comparación con el grupo control, pero el número de espinas tipo hongo en el grupo que recibió las sesiones de mantenimiento de la EMTr mostró un mayor número que el grupo Sham-CM ($p<0.001$). Un efecto similar fue el observado al realizar la comparación entre los grupos EMTr-CM versus EMTr-SM ($p=0.059$). (Fig.27)

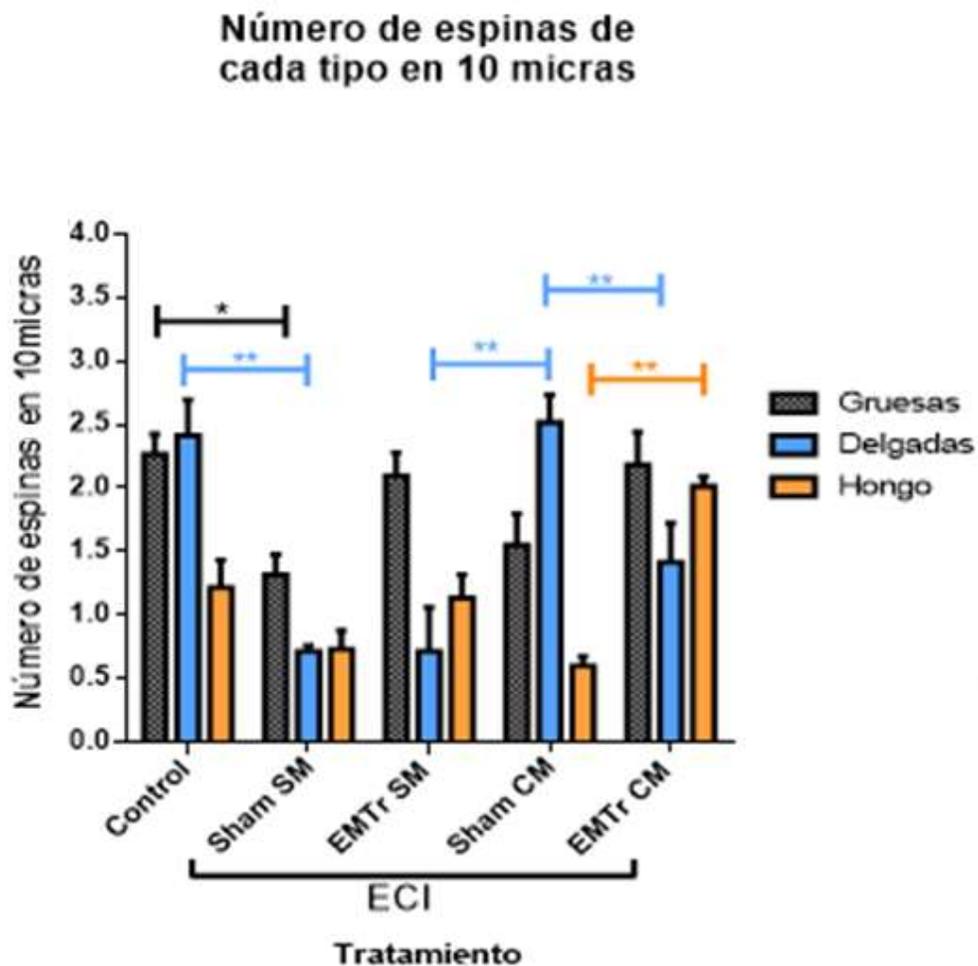


Fig. 27. Análisis de datos obtenidos del Golgi Cox. Número de espinas según su morfología en cada grupo.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se estudió la persistencia de los efectos tipo antidepresivos de la EMTr a 5 Hz en roedores expuestos a estrés crónico impredecible. Además, se determinó si era necesario o no la aplicación de sesiones de mantenimiento para mantener el efecto tipo antidepresivo de la EMTr a 5 Hz en roedores expuestos a ECI. Los resultados confirmaron que el protocolo de estrés crónico utilizado en ratones produjo conductas tipo depresivas que fueron revertidas por la EMTr. Además, se encontró que la EMTr con sesiones de mantenimiento mejoran el auto cuidado de las ratonas y disminuyen algunos parámetros relacionados con la depresión en la prueba de nado forzado en comparación con los roedores que recibieron EMTr sin sesiones de mantenimiento. También, en este trabajo se encontró que el grupo que recibió las sesiones de mantenimiento después de la intervención crónica presentó un mayor número de espinas dendríticas maduras a diferencia de las observadas en el grupo tratado con EMTr y que no recibió las sesiones de mantenimiento.

La EMTr a 5 Hz produce efectos tipo antidepresivos que se sostienen.

Mantenimiento mejora efecto

La depresión es un trastorno neuropsiquiátrico multifactorial lo que hace complejo el tratamiento ya que no todos los pacientes responden a la intervención farmacológica [Olmedilla-Zafra, A., Ortega-Toro, E., 2008; Lehtinen, M., 1994; Belmaker, R.H., Agam, G., 2008], de tal modo que entre las intervenciones que han ganado atención se encuentra la estimulación magnética transcraneal repetitiva [Cui, M., et al., 2019]. Esta técnica ha mostrado beneficios ya sea como tratamiento único o como adyuvante al tratamiento farmacológico [Philip, N., Carpenter, S. L., et al., 2015]. En este trabajo se aplicó la EMTr a una frecuencia de 5Hz de acuerdo con el trabajo de Armas-Castañeda y colaboradores [Armas-Castañeda et al., 2015] y lo que encontramos fue que en ratones expuestos a ECI, la EMTr revirtió las alteraciones en el autocuidado y este efecto se mantuvo después de que cesó la EMTr. Estos resultados son similares con lo reportado por Tanti et al. 2012 donde usaron Fluoxetina como tratamiento antidepresivo, el grupo bajo ECI sin tratamiento obtuvo también un mayor índice de estado de pelaje con respecto al grupo bajo tratamiento con Fluoxetina y con respecto a su grupo control [Tanti et al 2012]. Sin embargo,

estudios previos han mostrado que la EMTr aplicada a una frecuencia de 15 Hz mantiene sus efectos de tipo antidepresivo, en la prueba de consumo de sacarosa, tres semanas después de que las sesiones cesaron [Feng, S., et al., 2012]. Nosotros observamos ese efecto cinco semanas después de que cesó la EMTr en animales que siguieron siendo expuestos al ECI. De manera similar, la disminución en la desesperanza provocada por la EMTr a 15 Hz también fue observada en el estudio de Feng y colaboradores [Feng, S., et al., 2012]. Respecto al grupo que recibió las sesiones de mantenimiento de la EMTr a 5 Hz se observó que mejoraron su autocuidado con respecto a los animales Sham-CM. Además, en los parámetros que permite evaluar la prueba de nado forzado aquí se encontró que existe una latencia mayor al primer evento de inmovilidad, una reducción en el número de eventos de desesperanza y una disminución en la inmovilidad. Estudios clínicos han aportado información de los beneficios de aplicar sesiones de mantenimiento. Por ejemplo, Richieri y colaboradores encontraron que los participantes con diagnóstico de depresión mayor que recibieron las sesiones de mantenimiento mostraron un menor rango de recaída comparado con aquellos participantes que no recibieron las sesiones de mantenimiento [Richieri, R. et al., 2013]. Sin embargo, Philip y colaboradores no encontraron beneficios de las sesiones de mantenimiento en participantes con diagnóstico de trastorno depresivo mayor [Phillip, N., Dunner, D. L., et al. 2015].

Es importante mencionar que existen diferencias entre los estudios mencionados tanto en la frecuencia aplicada, en las condiciones de aplicación y en el número de sesiones de mantenimiento. En el estudio de Richieri las sesiones de mantenimiento fueron 3 sesiones la primera semana, 2 sesiones la segunda y tercera semana, luego 1 sesión por semana por dos semanas, posteriormente una sesión cada dos semanas por dos meses y, por último, 1 sesión por mes durante 2 meses [Richieri, R. et al., 2013]. En el caso del estudio de Philip, los investigadores aplicaron una sola sesión por mes [Phillip, N., Dunner, D. L., et al. 2015].

En el presente estudio, decidimos aplicar sesiones de mantenimiento que fueron disminuyendo gradualmente (aplicadas de la semana 10 a 11, cuatro sesiones -lunes a jueves-; semana 11 a 12, tres sesiones -lunes a miércoles-; semana de 12 a 13, dos sesiones -lunes y martes-; semana 13 a 14 y de 14 a 15, una sesión -lunes únicamente-). Este esquema nos ha permitido ver la importancia de las sesiones de mantenimiento de la EMTr para mejorar el efecto tipo antidepresivo.

La EMTr a 5 Hz favorece la maduración de las espinas dendríticas en las células granulares del giro dentado del hipocampo

A la fecha no se conocen los mecanismos a través de los cuales la EMTr produce sus efectos tipo antidepresivos. Uno de los posibles mecanismos es la formación y maduración de espinas dendríticas. Aquí encontramos que la EMTr a 5 Hz favorece la maduración de las espinas dendríticas cuando la EMTr se aplica en las sesiones de mantenimiento, efecto que no observamos en los grupos de EMTr sin sesiones de mantenimiento con respecto al grupo Sham sin mantenimiento. Estas observaciones permiten establecer dos posibilidades que requieren ser demostradas en estudios adicionales. La primera es que al ser la formación de espinas dendríticas un proceso dinámico entonces estemos perdiendo la posibilidad de ver los efectos positivos provocados por la EMTr antes de otorgar las sesiones de mantenimiento, o bien que existan otros eventos plásticos que sean modulados por la EMTr para inducir o mantener o mejorar el efecto tipo antidepresivo. En el primer caso, observaciones de nuestro grupo de trabajo han mostrado que tanto el número como la maduración de las espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo se favorecen por la EMTr a 5 Hz después de cuatro semanas de tratamiento [Meneses-San Juan. *En preparación 2020a*]. Sin embargo, otro de los posibles mecanismos de la EMTr a nivel celular es la generación de nuevas neuronas [Meneses *et al.*, *En preparación 2020b*]. Se ha demostrado que el incremento del número de neuronas de nueva generación esta relacionado con un mejor desempeño de los roedores cuando se exponen a ECI [Vega-Rivera *et al.* 2016]. Por lo tanto, es posible que los efectos de la EMTr SM se produzcan a nivel de generación de nuevas neuronas. No se pueden descartar otro tipo de mecanismos celulares sobre todo porque en el nicho neurogénico coexisten diferentes estirpes celulares todas importantes para revertir los efectos del ECI. Una de las limitaciones de este estudio es que sólo se analizaron los cambios en las espinas dendríticas y se considera necesario determinar la capacidad de la EMTr a 5 Hz para poder favorecer la neurogénesis tanto en un tratamiento inicial crónico, como en las sesiones de mantenimiento. Esta última interrogante merece ser estudiada en un proyecto adicional que se encuentra en curso.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que los efectos tipo antidepresivos de la EMTr a 5 Hz en ratones expuestos a ECI persisten después del cese del tratamiento crónico aún en presencia del ECI. Además, las sesiones de mantenimiento de la EMTr a 5 Hz mejoran el desempeño de los roedores al disminuir las conductas tipo depresivas provocadas por el ECI. Finalmente, el estudio de los mecanismos que subyace al efecto tipo antidepresivo de la EMTr a 5 Hz es necesario para entender sus efectos benéficos que pueden estar relacionados no sólo con modificaciones en la neurogénesis, sino también con la maduración de las espinas dendríticas.

TABLAS COMPARATIVAS DE RESULTADOS

En la siguiente página, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas conductuales (*TABLA. 1*) y por medio de lo observado con la Técnica de Golgi-Cox (*TABLA. 2*). De manera similar, se muestra una comparación entre los resultados conductuales y el número de espinas dendríticas secundarias maduras (tipo *mushroom*) observadas en al microscopio (*TABLA. 2*).



obtenidos en:

Prueba	¿Qué evalúa la prueba?	Parámetro medido	Resultado	Conclusión
Rotarod	Motricidad y coordinación motora	Tiempo de permanencia en el cilindro en rotación	No diferencia estadísticamente significativa (entre grupos ni entre sesiones)	Resultado indica que no existe daño motor ni por ECI ni por EMTr 5 Hz
Campo abierto	Motricidad	Cruces centro- periferia	No diferencia estadísticamente significativa. ➤ Diferencia matemática: mayor número de cruces en grupos estimulados que en grupos simulados. ➤ Sin diferencia entre ambos grupos estimulados	La EMTr no promueve cambios en movilidad de los ratones
Estado de pelaje	Autocuidado	Condición del pelaje	➤ Grupos estimulados con mejor estado de pelaje que grupos Sham ➤ EMTr CM con mejor estado de pelaje que EMTr SM ➤ EMTr CM similar estado de pelaje que Ctrl	➤ La EMTr mejora la condición de autocuidado en ratones con previa exposición a ECI ➤ La motivación persiste un mes después de terminar el tratamiento ➤ Las sesiones de mantenimiento mejoran motivación
Nado forzado	Desesperanza	❖ Latencia de Inmovilidad (L.I.) ❖ Frecuencia de inmovilidad (F.I.) ❖ Tiempo total de inmovilidad (T.T.I.)	➤ Mayor L.I. en grupos estimulados vs grupos simulados ➤ Mayor latencia en EMTr CM que en EMTr SM ➤ Menor F.I. en grupos estimulados vs grupos Sham ➤ Menor frecuencia en EMTr Cm vs EMTr SM ➤ Menor T.T.I. en grupos estimulados vs grupos Sham ➤ Menor T.T.I. en EMTr CM vs EMTr SM	➤ La EMTr 5 Hz tiene efecto tipo antidepressivo sobre la condición de desesperanza ➤ Efecto perdura un mes después de terminar el tratamiento aplicado diariamente. ➤ Las sesiones de mantenimiento mejoran la condición de desesperanza comparado con grupo en ausencia de sesiones de mantenimiento.

TABLA 4 Cuadro descriptivo de los resultados y conclusiones obtenidos e

Conductas vs Porcentaje de espinas funcionales en cada grupo

Grupo/ Tratamiento	Espinas tipo hongo/ funcionales (Porcentaje)	Resultados conductuales (Estado de Pelaje)	Resultados conductuales (Nado forzado)	Resultados conductuales Rotarod campo abierto
Control	20	Índice de estado de pelaje (EP) por debajo de todos los grupos estimulados excepto en la semana 15 donde el EMTr CM alcanza el índice del grupo Control.	<ul style="list-style-type: none"> Latencia de inmovilidad mayor que grupos Sham, pero menor que grupos estimulados. Frecuencia de episodios de inmovilidad a la par de grupo EMTr SM y mayor que en EMTr CM. A su vez, frecuencia menor vs ambos grupos Sham. Tiempo total de inmovilidad menor que grupos Sham, pero mayor que ambos grupos estimulados. 	No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, sólo diferencias matemáticas que sugieren indicios de efecto antidepressivo.
Sham SM	25	Índice de EP en semana 15 por arriba de los grupos estimulados y del grupo Control, pero por debajo del grupo Sham CM.	<ul style="list-style-type: none"> Latencia de inmovilidad menor que grupos estimulados y Control, pero ligeramente mayor que Sham CM Frecuencia de episodios de inmovilidad mayor que ambos grupos estimulados, Control y Sham CM. Tiempo de inmovilidad mayor que el resto de los grupos. 	
EMTr SM	30	Índice de EP en la semana 15 por debajo de ambos grupos Sham y por arriba del grupo Control y EMTr CM.	<ul style="list-style-type: none"> Latencia de inmovilidad mayor que grupos Sham y Control, pero menor que grupo EMTr CM. Frecuencia menor que grupos Sham y Control y mayor que grupo EMTr CM. Tiempo total de inmovilidad menor que grupos Sham y Control, pero mayor que EMTr CM. 	
Sham CM	15	Su índice de EP fue el más elevado en la semana 15.	<ul style="list-style-type: none"> Latencia de inmovilidad menor comparada con el resto de los grupos. Frecuencia de episodios de inmovilidad mayor con respecto a los grupos estimulados y al Control, pero menor con respecto al Sham. Tiempo total de inmovilidad mayor con respecto a los grupos estimulados y menor con respecto al grupo Sham y al Control. 	
EMTr CM	40	Su EP en la semana 15 se encontró por debajo de ambos grupos Sham y el EMTr SM pero a la par del grupo Control.	<ul style="list-style-type: none"> Latencia de inmovilidad mayor con respecto a los demás grupos. Frecuencia de episodios de inmovilidad menor con respecto al resto de los grupos. Tiempo total de inmovilidad menor con respecto a los demás grupos. 	

TABLA 2. Conductas vs hallazgos en el giro dentado del hipocampo con técnica Golgi-Cox. La tabla muestra una comparativa entre las conductas evaluadas en las pruebas realizadas y las observaciones en la morfología de las neuronas del giro dentado del hipocampo de los sujetos de estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Fernández, F. (1988). *La depresión y su diagnóstico*. Barcelona, España: Labor.
- Aguirre- Baztán, A. (2008). Antropología de la depresión. Vol.8. N.3: 563-601.
- American Psychiatric Association (2000). DSM-IV. Guía de consulta de los criterios diagnósticos
- Armas-Castañeda, G. et al. (2015). *Transcranial Magnetic Stimulation: antidepressant efficacy and three-month follow-up*. Brain stimulation. 8. pp343-359.
- Ávila, A. (1990). *Psicodinámica de la depresión*. Anales de psicología; 6(1): 37-58.
- Belmaker, R.H., Agam, G. (2008). *Major Depressive Disorder*. The new England Journal of Medicine. 358: 55-68.
- Bessa, J.M., et al., (2009). *The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling*. Molecular Psychiatry. 14. 764-773.
- Cao X., et al. (2012) *Disrupted resting-state functional connectivity of the hippocampus in medication-naive patients with major depressive disorder*. J Affect Disord. 141:194–203.
- Carpenter, L. L., et al., (2012). *Transcranial Magnetic stimulation (TMS) for major depression: A multisite, naturalistic, observational study of acute treatment outcomes in clinical practice*. Depression and Anxiety. 00: 1-10.
- Chervyakov, A. V., et al., (2015). *Possible mechanisms underlying the therapeutic effects of transcranial magnetic stimulation*. Frontiers in human Neuroscience. 8(303). Pp 1-8.
- Cramer, S. C., et al. (2011). *Harnessing neuroplasticity for clinical applications*. Brain. 134: 1591-1609.
- Cui, M., et al. (2019). *Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation after Intracerebral Hemorrhage in Mice*. Cell implantation: 1-17.
- Drevets, W. (2001). *Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders*. Current Opinion in Neurobiology, 11: 240-249.
- Ducottet, C., Aubert, A., Belzung, C. (2004). *Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice*. Behavioral Brain Research. 155: 291-299.
- Duval, F., González, F., Rabia, H. (2010). *Neurobiología del estrés*. Rev Chil Neuro-Psiquiat. 48 (4): 307-318
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A. (1998). *Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética*. Psicología Conductual. 6: 165-191.
- Fava, M., y Kendler, K. S. (2000). *Major Depressive Disorder*. Neuron. 28: 335-341.
- Feng, H.L., Yan, L., Zhou, G.Y., and Cui, L.Y. (2008). *Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on adenosine triphosphate content and micro tubule associated protein-2 expression after cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain*. Chin. Med. J. 121, 1307–1312.
- Feng, Shu-Fang, et al. (2012). *Long-lasting effects of chronic rTMS to treat chronic rodent model of depression*. Behavioural Brain Research. 232: 245-251.
- Fuchs, E., Gould, E. (2000). *Mini-review. in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications*. EUROPEAN Journal of Neuroscience. (12): 2211-2214.
- Fujiki, M., Kobayashi, H., Abe, T., and Kamida, T. (2003). *Repetitive transcranial Magnetic stimulation for protection against delayed neuronal death induced by Transient ischemia*. J. Neurosurg. 99, 1063–1069.
- García Higuera, J.A. (2013). *La Depresión*. Madrid, España: Psicoterapeutas.com. Recuperado de: <https://www.cop.es/colegiados/m-00451/depre.htm>

- George, M. S., et al. (2000). *A Controlled Trial of Daily Left Prefrontal Cortex TMS for Treating Depression*. *Biological Psychiatry* 48(10): 962–70.
- Hamidi, A., 2015. *Rotarod test*. Tomado de: <https://mazeengineers.com/maze-basics-rotarod-test-for-mice/>
- Hamilton M. (1960). *Rating scale for depression*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 23:56-62.
- Janicak, P., Dokucu, M. E.(2015). *Transcranial magnetic stimulation for the treatment of major depression*. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 11. Pp 1549-1560.
- Kraepelin, F. (1920). *Manic-Depressive Insanity and Paranoia*. Chicago: Chicago Medical Book Company. Pp 280.
- Klomjai, W., et al. (2015). *Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS)*. 58. Pp208-213.
- Koenings, M., Grafman, J. (2009). *The functional neuroanatomy of depression: Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex*. *Behavioural Brain Research*. 201: 239-243.
- Kuwabara, S., et al., (2002). *Effects of voluntary activity on the excitability of motor axons in the peroneal nerve*. *Muscle & Nerve*. 25: 176-184.
- Lee, K. M., et al. (2017). *Anxiolytic Effects of Buspirone and MTEP in the Porsolt Forced Swim Test*. *Chronic Stress*. 1: 1-9.
- Lehtinen, M.(1994). *Epidemiology of depression: Prevalence, risk factor and treatment situation*. *Acta Psychiatr Scand*.377.pp 7-10.
- Levy, M.J.F., et al. (2018). *Neurotropic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression*. *Psychopharmacology*. 235: 2195-2220.
- Liotti, M., Mayberg, H. (2001). *The Role of functional Neuroimaging in the neuropsychology of depression*. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*; (23),1:121-136.
- Lucassen, P. J., et al., (2006). *Stress, Depression and Hippocampal Apoptosis*. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 5: 531-546.
- Lisanby, S. H., Belmarker, R. H., (2000). *Animal models of the mechanism od repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): Comparisons with electroconvulsive shock (ECS)*. *Depression and anxiety*. 12: 178-187.
- Magariños, A. M., et al., (1996). *Chronic Psychosocial Stress Causes Apical Dendritic Atrophy of Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons in Subordinate Tree Shrews*. *The Journal of Neuroscience*. 16(10): 3534-3540.
- 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. pp 1–10.
- Manji, H.k., Drevets, W.C., charney, D.S. (2001). *The celular neurobiology of depression*. (7); 5: 541-547.
- McEwen, B. S.(2000). *Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology*. *Neuropharmacology*; (27). 2: 108-124.
- Muller,M.B.,Toschi,N.,Kresse,A.E.,Post,A.,andKeck,M.E.(2000).*Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expresión of brain derived neurotrophic factor and cholecystokin in mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific áreas of rat brain*. *Neuropsychopharmacology* 23, 205–215.
- Nestler, E. et al (2002). *Neurobiology of Depression*. 34. Pp 13-
- Nollet, M., et al., (2013). *Models od depression: Unpredictable chronic mild stress in mice*. *Current protocols in pharmacology*. 5 (65).pp 1-5.
- O’Readon, JP., et al. (2005). *Long Term Maintenance Therapy for Major Depressive disorder with rTMS*.*J Clin Psychiatry*. 66: 1524-1528.

- Ogiue-Ikeda, M., Kawato, S., and Ueno, S. (2005). *Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus*. *Brain* 1037, 7–11.
- Olmedilla-Zafra, A., Ortega-Toro, E. (2008). *Incidencia de la práctica de actividad física sobre la ansiedad y depresión en mujeres: perfiles de riesgo*. *Univ. Psychol.* 1. Pp 105-116.
- Ontario Health Technology Assessment Series (2004). *Repetitive Transcranial magnetic Stimulation for the Treatment of Major Depressive Disorder*.
- Organización Mundial de la Salud (2019). *Temas de salud: Depresión*. Descargado de: <https://www.who.int/topics/depression/es/>
- Philip, N., Carpenter, S.L., et al. (2015). *5Hz Repetitive transcranial magnetic stimulation to left prefrontal cortex for major depression*. *Journal of Affective Disorders*. 186. pp 13-17.
- Philip, N., Dunner, D.L., et al. (2015). *Can medication free, treatment-resistant, depressed patients who initially respond to TMS be maintained off medications? A prospective, 12 month multisite randomized pilot Study*. *Brain stimulation*:1-7.
- Piccolino, M. (2006). *Luigi Galvani's path to animal electricity*. *C. R. Biologies*. 329: 303-318.
- Pittenger, C., Duman, R. S. (2008). *Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanism*. *Neuropsychopharmacology*. 33: 88-109.
- Porsolt, R. D., et al. (1977). *Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments*. *European Journal of Pharmacology*. 47: 379-391.
- Qiao, H. et al. (2016). *Dendritic Spines in Depression: What we learned from animal models*. Hindawi Publishing Corporation. *Neural Plasticity*: 1-26
- Rachid, F. (2017). *Maintenance repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for relapse prevention in with depression: A review*. *Psychiatry Research*: 1-10
- Rafful, C. et al. (2012). *Depression, gender, and treatment gap in Mexico*. *Journal of affective Disorders*. 138. Pp. 165-169
- Ramírez-Rodríguez, G., et al. (2011). *Los fármacos antidepressivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos*. *Salud Mental*; 34:497-506.
- Ramírez-Rodríguez, G., et al. (2014). *Environmental enrichment induces neuroplastic changes in middle age female Balb C mice and increases the hippocampal levels of BDNF, P-Akt and P- MapK1/2*. *Neuroscience*. 260: 158-170.
- Richieri, R., et al. (2013). *Maintenance transcranial magnetic stimulation reduces depression relapse: A propensity-adjusted analysis*. *Journal of affective disorders*: 1-7.
- Rom, O., Reznick, A. Z. (2016). *The Stress Reaction: A Historical Perspective*. Springer International Publishing Switzerland. 20: 1-4.
- Sapolsky, R. M. (2013). *Glucocorticoids and hippocampal atrophy in Neuropsychiatric disorders*. *American Medical Association*; 57: 925-935.
- Selye H (1974) *Stress without distress*, 1st edn. Lippincott Williams & Wilkin, Philadelphia
- Shiotsuki, H., et al. (2010). *A rotarod test for evaluation of motor skill learning*. *Journal of Neuroscience Methods*. 189: 180-185.
- Somani, A., Kur, SK. (2019). *Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation in treatment-resistant depression: the evidence thus far*. *General Psychiatry*; 32.
- Strafella, A.P., Paus, T., Barrett, J., and Dagher, A. (2001). *Repetitive transcranial magnetic stimulation of the human prefrontal cortex induces dopamine release in the caudate nucleus*. *J. Neurosci.* 21, RC157: 1-4.
- Su, T.P., et al., (2005). *Add-on rTMS for Medication-Resistant Depression: A Randomized, Double-Blind, Sham-Controlled Trial in Chinese Patients*. *J. Clin Psychiatry*. 66 (7):930-937.
- Tanti, A. et al (2012). *Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus*. *Neuropharmacology*. 63: 374-384.

- Torres-Fernández, O. (2006). *La técnica de la impregnación argénica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal*. *Biomédica*; 26: 498-508.
- Túnez Fiñana, I., Pascual Leone, A. (2014). *Estimulación magnética transcraneal y neuromodulación. Presente y futuro en neurociencias*. Barcelona, España: Elsevier.
- Ueyama, E., Ukai, S., Ogawa, A., Yamamoto, M., Kawaguchi, S., Ishii, R., et al. (2011). *Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats*. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 65, 77–81.
- Vega-Rivera, N. M., et al. (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*. *Behavioral Brain Research*. Elsevier. 301. pp72-83.
- Wasserman, E. 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. Elsevier *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*. 108. Pp 1-16.
- Willner, P. et al (1992). *Chronic mild Stress- Induced Anhedonia: A realistic animal model of depression*. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 16. pp 525-534.
- Yang, L., et al. (2015). *The Effects of Psychological Stress on Depression*. *Current Neuropharmacology*. 13: 494-504.
- Yankelevitch-Yahva, R., et al., (2015). *The Forced Swim test as a Model of Depressive-like Behavior*. *Journal of Visualized Experiments*. (97): 1-7
- You, R., Liu, Y., Chang, R.C. (2019). *A Behavioral Test Battery for the Repeated Assessment of Motor Skills, Mood, and Cognition in Mice*. *J. Vis. Exp.* (145):1-10.
- Zhu, M. Y., et al. (1999). *Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression*. *Biol. Psychiatry*; 46: 1275-1286.