



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGIA).

**Mecanismos dependientes y/o independientes de la neurogénesis
subyacentes de la estimulación magnética transcraneal repetitiva
(EMTr)5Hz.**

Que para Optar por el Título de: Maestro en Neurobiología

P R E S E N T A:

Granados Juárez Andrea

Comité sinodal:

Dr. Ramírez Rodríguez. Gerardo Bernabé (Faculta
de Psicología, UNAM)

Dra. Vega Rivera Nelly Maritza. (INPRFM).

Dra. Quirarte Lorena Gina (INB)

Dr. García González César Octavio (Facultad de Psicología, UNAM)

Dr. Ochoa de la Paz Lenin Davis (Facultad de Medicina, UNAM)

CDMX, Noviembre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA.....	7
RESUMEN	8
ABSTRAC	9
Índice de abreviaturas	10
I. Introducción.	12
<i>Depresión</i>	12
<i>Modelos animales de depresión</i>	13
<i>Tratamientos para la depresión</i>	14
<i>Estimulación magnética transcraneal repetitiva</i>	15
<i>Neuroplasticidad</i>	16
<i>Remodelación de espinas dendríticas</i>	17
<i>Neurogénesis</i>	18
Análogos de la timidina.....	21
Antecedentes	22
<i>Supresión de la neurogénesis Rayos X</i>	25
<i>Temozolamida (TMZ)</i>	25
II. Justificación	26
III. Hipótesis.....	27
IV. Objetivos General	27
Específicos	27
V. Metodología:.....	27
<i>Diseño experimental</i>	27
<i>Estrés crónico impredecible</i>	29
<i>Estimulación magnética transcraneal</i>	30
<i>Pruebas conductuales</i>	30
<i>Estado de pelaje (EP)</i>	30
<i>Rotarod</i>	31
<i>Campo abierto (Ca)</i>	31
<i>Laberinto elevado en cruz (LEC)</i>	31
<i>Localización de objetos (LO)</i>	32
<i>Reconocimiento de objeto novedoso (RON)</i>	32

<i>Splash test (ST)</i>	33
<i>Nado forzado (NF)</i>	33
Eutanización	33
Supervivencia de nuevas células	34
Doblecortina (DCx)	34
Proliferación (Ki67)	34
Golgi Cox	35
Estadística	35
VI. Resultados Conducta	36
1. <i>Estado de pelaje (EP)</i>	36
2. <i>Rotarod</i>	37
3. <i>Campo abierto</i>	38
4. <i>Laberinto elevado en cruz</i>	39
5. <i>Localización de objetos</i>	40
6. <i>Reconocimiento de objeto novedoso</i>	42
7. <i>Splash Test</i>	43
8. <i>Nado forzado</i>	44
<i>Supervivencia celular</i>	45
<i>Estadios intermedios del proceso de neurogénesis (DCx)</i>	46
<i>Estadios de proliferación (Ki67)</i>	47
Espinas dendríticas	48
Frotis vaginales	50
VII. Discusión	51
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en la actividad motora	51
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en conductas ansiosas.	51
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en el proceso de aprendizaje y memoria	52
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en conductas tipo depresivas	52
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en la supervivencia de nuevas células en el giro dentado del hipocampo .54	
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en los estadios intermedios de la neurogénesis evaluado con la DCx y estadios de proliferación con Ki67	54
Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis	

hipocampal en la remodelación de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo..... 55
VIII. Conclusión:..... 57
IX. Referencias:..... 58

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado Maestría en Ciencias (Neurobiología), por permitirme continuar con mi formación profesional en el área de las neurociencias.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por el apoyo y facilidades otorgadas a lo largo de mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, por seguirme permitiendo ser parte de su comunidad universitaria y brindarme las herramientas académicas y profesionales necesarias en mi formación, y para contribuir al desarrollo de la ciencia y tecnología en nuestro país.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, por ser una institución del más alto nivel, que ha contribuido en mi formación y desarrollo profesional en investigación a lo largo de mi estadía en el Laboratorio de Neurogénesis, de la Subdirección de Investigaciones Clínicas, durante mis estudios de licenciatura y ahora maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México, por el apoyo otorgado a través del Programa de Becas Nacionales.

A los miembros de mi comité tutorial:

- Dr. Ramírez Rodríguez Gerardo Bernabé (Facultad de Psicología, UNAM)
- Dra. Vega Rivera Nelly Maritza. (INPRFM).
- Dr. Reyes Haro Daniel (INB)
- Dra. Ricardo Garcell Josefina (INB) QEPD

Por su apoyo, guía y orientación durante toda la maestría.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por el apoyo y facilidades brindadas durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Nuri Aranda López por todo el apoyo, facilidades y acompañamiento académico e institucional a lo largo de los dos años de mis estudios de maestría y actividades académicas

A los miembros de mi comité sinodal:

- Dr. Ramírez Rodríguez Gerardo Bernabé (Facultad de Psicología, UNAM)
- Dra. Vega Rivera Nelly Maritza. (INPRFM).
- Dra. Quirarte Lorena Gina (INB)
- Dr. García González César Octavio (Facultad de Psicología, UNAM)
- Dr. Ochoa de la Paz Lenin Davis (Facultad de Medicina, UNAM)

Por su apoyo, guía y orientación para poder realizar una tesis de alta calidad.

A mi Tutor Académico Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, un reconocimiento especial por su amistad, guía, dedicación, consejo y apoyo en el diseño y realización del presente proyecto de maestría, así como el impacto en mi formación profesional en investigación, profesional y humana a lo largo de estos dos años.

A los miembros del Laboratorio de Neurogénesis Dra. Edith, M.V.Z. Arturo, Biol. Victorino, Natalia, Jorge, David, Vanessa, Diana, Andrés, María Elisa, Angelica, Galilea, Stephanie, Allan, Ana, Ki y todos aquellos que tuve el placer de conocer. Porque su amistad y compañerismo fue una razón más para disfrutar de mi estancia en el laboratorio. Especialmente a Dana y Gabriela, mis compañeras no solo de laboratorio sino también de la maestría por su gran amistad, compañerismo, risas y permitirme compartir con ellas la experiencia de la maestría, no habría sido lo mismo sin ustedes.

A mi familia, mis abuelos Silvestre y María, mis padres Raquel y Tobías, y mis hermanos Ricardo y Emiliano, por haber sido y seguir siendo un pilar muy importante en mi vida, por su apoyo, paciencia y amor incondicional que siempre me han brindado, y por permitirme seguir mi sueño de hacer ciencia.

DEDICATORIA

*A mis padres, las palabras nunca me alcanzaran para agradecerles mi vida y el apoyo
para poder lograr mis sueños.*

Infinitas GRACIAS

RESUMEN

La depresión es uno de los trastornos afectivos más comunes, se caracteriza por la falta de interés en actividades etc. Los síntomas deben de presentarse por un periodo mínimo de dos semanas para que se pueda diagnosticar como depresión y, son disminuidos por los fármacos antidepresivos, la terapia electroconvulsiva y la estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr). La EMTr es un tratamiento no invasivo de estimulación cerebral que fue aprobado por la administración de drogas y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) en 2008 como tratamiento para trastorno depresivo mayor (FDA, 2011). A pesar de su uso aún se desconocen sus mecanismos por los cuales lleva a cabo su efecto antidepresivo, pero tanto en la literatura como en el equipo de trabajo, se ha señalado la importancia de la neurogénesis en la patología de la depresión y, de igual manera, se ha reportado que la EMTr tiene efecto en este proceso, por lo cual se propuso este proyecto en el que se utilizaron 35 ratones hembra de la cepa Balb/C, los cuales fueron expuestos al protocolo de estrés crónico impredecible (ECI). Durante dos semanas se les inyectó Temozolamida para disminuir la neurogénesis y posteriormente se inició el tratamiento con EMTr. Una vez concluido el tratamiento durante cuatro semanas, se aplicó una batería de pruebas conductuales y finalmente el cerebro se colectó para inmunohistoquímicas y Golgi-cox. Se encontró que, para conductas asociadas con la memoria, la administración de la TMZ no previno los beneficios de la EMTr, mientras que algunas conductas asociadas con la depresión si fueron afectadas. A nivel estructural, la TMZ disminuyó el proceso neurogénico sin afectar la respuesta a nivel de las espinas dendríticas. Los resultados permiten concluir que la EMTr requiere de la neurogénesis para provocar efectos tipo antidepresivos, aunque para el proceso de aprendizaje y memoria la EMTr provoca otros efectos de plasticidad como es la maduración de espinas dendríticas

ABSTRAC

Depression is one of the most common affective disorders. It is characterized by lack of interest in daily activities, anhedonia, suicidal thoughts, poor emotional reactivity. Symptoms must be present in the subject for a minimum period of two weeks to be diagnosed as depression and are diminished by antidepressant drugs, electroconvulsive therapy, and repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). The latter is a non-invasive brain stimulation treatment approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2008 for major depressive disorder. Despite its approval, the mechanisms underlying its benefits are not completely known. Recent studies have pointed to the regulation of hippocampal neurogenesis as one of the mechanisms by which rTMS produces the benefits. However, some behavioral benefits of rTMS could be associated with other structural neuroplasticity related events. Thus, the aim of this study was to determine the neurogenesis dependent- or independent effects of rTMS in a chronically stressed mouse model. Thirty-five female Balb/C mice were exposed to a protocol of chronic unpredictable mild stress (CUMS). Rodents were assigned to one of the five groups. Finally, brains were dissected out to perform immunohistochemistry for markers of the neurogenic process or for Golgi-Cox impregnation for the analysis of dendrites spines in granular cells. Our results point to that neurogenesis is one of the important mechanisms by which rTMS is carrying out its antidepressant effect. Although, the benefits on learning and memory involved other neuroplasticity related events.

Índice de abreviaturas

- ANOVA** - análisis de varianzas
- BrdU** - bromodesoxiuridina
- CA** - cuerno de Amón
- CAb** - campo abierto
- CFDLI** - corteza frontal dorsolateral izquierda
- CIdU** - clorodesoxiuridina
- CM** - capa molecular
- CMS** - *cronic medium stress*
- DAB** - diaminobenzidina
- DCx** - doblecortina
- ECI** - estrés crónico impredecible
- EdU** - etinildesoxiuridina
- EMTr** - estimulación magnética transcraneal repetitiva
- EP** - estado de pelaje
- FDA** - administración de drogas y alimentos
- GD** - giro dentado
- GFAP** - proteína ácida fibrilar glial
- HHA** - hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal
- Hz** - herz
- IdU** - yododesoxiuridina
- IMAOS** - inhibidores de la monoamino oxidasa
- ISRS** - inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
- LEC** - laberinto elevado en cruz

MTIC - metil triazeno imidazol carboxamida

NF - nado forzado

OMS - organización mundial de la salud

RON - reconocimiento de objeto novedoso

ST - *splash test*

TCAS - antidepresivos tricíclicos

TMZ - temozolamida

UM - umbral motor

V - vehículo

ZSG - zona subgranular

I. Introducción.

Depresión

La depresión es uno de los trastornos afectivos más comunes y se caracteriza por la falta de interés en actividades cotidianas, alteraciones en la alimentación, alteraciones del sueño, pérdida de peso, anhedonia, formación de pensamientos suicidas, poca reactividad emocional, retardo motor, así como escasez de energía (World Health Organization 1992). Estos síntomas deben de presentarse en el sujeto por un periodo mínimo de dos semanas para que se pueda diagnosticar como depresión (World Health Organization 1992). Esta enfermedad es aproximadamente dos veces más común en mujeres que en hombres y es más frecuente entre los 15 y 29 años, sin embargo, puede presentarse en cualquier momento de la vida del individuo (Benjet, *et al.* 2004). Este padecimiento puede volverse crónico y alterar significativamente las habilidades de autocuidado del individuo, y en los casos más graves, puede llevar al suicidio (Wan 2012).

La depresión es una enfermedad multifactorial, sin una causa única aparente, al contrario, esta parece ser el resultado de la combinación de una serie de factores genéticos, ambientales y psicosociales que predisponen al desarrollo de esta enfermedad. Dentro de estos factores ambientales que elevan el riesgo de desarrollar un episodio depresivo, destacan la vivencia de eventos traumáticos, la pérdida de un familiar, violencia constante, abuso infantil, abandono materno/paterno, infecciones virales, lesiones cerebrales y exposición crónica al estrés (Nestler *et al.* 2002). Frecuentemente la depresión es descrita como un trastorno relacionado con el estrés dado que muchos de los episodios depresivos suelen ocurrir en presencia de algún tipo de estresor, aunque el estrés, *per se*, no es la causa directa de esta enfermedad (Nestler *et al.* 2002). Diversas evidencias clínicas que demuestran que el sistema de regulación neuroendocrino a la respuesta de estrés (el sistema Hipotalámico-Hipófisis-Glándula adrenal, también conocido como eje HHA), se encuentra alterado en pacientes con depresión. Por otro lado, diversos estudios en animales de laboratorio han dado evidencia de que la exposición continua a diversos estresores genera conductas “tipo depresivas” en (anhedonia, disminución en la conducta sexual, poca actividad motora, cambios en los patrones de sueño y aumento o disminución de peso). Dentro de la patología de

la depresión se han descrito un deterioro cognitivo que se refleja en un deterioro en funciones ejecutivas incluida la atención, memoria, y velocidad de procesamiento, las cuales mejoran con los tratamientos antidepresivos (Rosenblat *et al.* 2015). Con base a ello, existen diversos protocolos de estrés que permiten generar modelos animales relacionados con la depresión para poder estudiar a detalle los mecanismos celulares y moleculares asociados a la patogénesis, desarrollo y tratamiento de esta enfermedad.

Modelos animales de depresión

Dada la complejidad y heterogeneidad en la etiología de la depresión, es difícil reproducir en animales de laboratorio determinados síntomas de esta patología, tales como son la presencia de sentimientos de culpa y de tristeza, así como la recurrencia de pensamientos suicidas. Sin embargo, cabe resaltar que no es necesario que un modelo de depresión reproduzca todas las alteraciones conductuales encontradas en este trastorno, dado que los pacientes no siempre manifiestan todo el cuadro clínico, además de que la mayoría de los modelos de depresión reproducen los síntomas diacríticos de esta enfermedad, tales como lo son la anhedonia (perdida de interés en estímulos placenteros) y la desesperanza (falta de voluntad o apatía) (Yan *et al.* 2010).

El modelo de estrés crónico impredecible (ECI) fue propuesto por primera vez por Katz (1982) y desarrollado por Papp y Willner en los años noventa. (Nollet, *et al.* 2013). Este modelo reproduce las principales alteraciones conductuales de la depresión como: anhedonia que se puede evaluar con las pruebas de preferencia de sacarosa, prueba de la galleta y en mediana medida la prueba de acicalamiento artificial (*Splash test*); la desesperanza con las pruebas de nado forzado y suspensión de cola; la apatía, con la medición del estado de pelaje (*coat state*) construcción de nido y parcialmente con la de acicalamiento artificial (*Splash test*); para evaluar ansiedad se ocupan las pruebas de laberinto elevado en cruz, campo abierto y supresión de comida; para el retardo psicomotor con la prueba de campo abierto y en ocasiones con el rotarod; finalmente, para las alteraciones cognitivas se pueden ocupar las pruebas de localización de objeto novedoso, localización de

objeto, reconocimiento social y el laberinto acuático de Morris (Planchez *et al.* 2019). También induce algunas alteraciones fisiológicas presentes en las personas deprimidas, tales como el aumento en los niveles de corticosterona en plasma (Vega-Rivera *et al.* 2016), disminución en la neurogénesis hipocampal (Alonso *et al.* 2004) y disfunción del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Zhao *et al.* 2018). Además de que tiene la ventaja sobre otros modelos, de reproducir la condición clínica del tratamiento farmacológico, ya que la administración crónica, pero no aguda, disminuye las conductas tipo depresivas generadas en este modelo (Nollet, *et al.* 2013). De tal modo que el modelo de estrés crónico impredecible es uno de los más usados para generar conductas depresivas en modelos animales y estudiar el efecto de distintos tratamientos antidepresivos (Willner *et al.* 2013).

Tratamientos para la depresión

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

Psicoterapia:

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

Terapia electroconvulsiva:

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

Farmacoterapia:

El empleo de fármacos es el método más convencional para aminorar o eliminar los síntomas de la depresión. Los fármacos utilizados se pueden clasificar en inhibidores de la mono amino oxidasa (IMAOs), los inhibidores selectivos de la recaptura de Serotonina (ISRS) y norepinefrina (INSR), los antidepresivos tricíclicos (TCAs) y la tri-yodotironina (T3) (Little *et al.* 2009). A pesar de la eficiencia antidepresiva de estos fármacos muchos de ellos producen distintos efectos secundarios, tales como aumento de peso, hipo e hipertensión, problemas cardiovasculares, náuseas, sedación, etc., (Hansen *et al.* 2005) aunado a que su efecto antidepresivo suele observarse en un promedio de entre tres y seis semanas. Además, de que entre una y dos terceras partes de los pacientes pueden no responder al primer fármaco antidepresivo lo que apuntaría a la presencia de la depresión resistente a fármacos (Little *et al.* 2009). En este sentido, una alternativa efectiva al tratamiento farmacológico de la depresión es la estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr).

Estimulación magnética transcraneal repetitiva

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

La aplicación de la EMTr involucra la configuración de distintos parámetros acerca de las características del pulso a utilizar, estas características son la intensidad, el ritmo, el tiempo entre pulsos, la duración de la sesión, el tiempo entre sesiones, el tipo de EMTr y la frecuencia. Respecto a este último parámetro, la EMT puede ser definida de “baja frecuencia (≤ 1 Hz) o de “alta frecuencia” (> 1 Hz) (Peng *et al.*, 2018). Convencionalmente, en experimentos con animales de laboratorio, se utilizan frecuencias de 0.3 a 1 Hz como estimulación de baja frecuencia y de 5 a 20

Hz como de alta frecuencia. La importancia de este parámetro en la configuración de la EMT radica en su poder modulador de la excitabilidad neuronal. De esta manera, las bajas frecuencias inducen un efecto inhibitor, mientras que las altas frecuencias desencadenan un efecto excitador. Las frecuencias para el tratamiento del trastorno depresivo mayor incluyen el rango de 5 Hz-20 Hz (Pohar and Farrah, 2019). Sin embargo, la frecuencia de 5Hz presenta una respuesta antidepresiva similar a la frecuencia de 15Hz (Philip *et al.*, 2016). En este sentido, nuestro equipo de trabajo encontró que la EMTr a 5 Hz también tiene efectos en la neurogénesis y en la plasticidad estructural del giro dentado en el hipocampo (Meneses-San Juan D., *et al.*, en proceso).

Neuroplasticidad

La Organización Mundial de la Salud (1982), define el término neuroplasticidad como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas, ambientales o del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades (OMS, 1982).

A nivel neuronal los cambios estructurales pueden ser visualizados a través de un incremento del árbol dendrítico y del número de espinas dendríticas, que facilitan y fortalecen los contactos sinápticos y en consecuencia la comunicación entre las neuronas (Fortin *et al.*, 2002). El aprendizaje puede considerarse como una modificación estructural y funcional del sistema nervioso que da como resultado un cambio en la conducta relativamente permanente (Knierim, 2015).

Existe evidencia que indica que el cerebro de personas con depresión experimenta cambios estructurales y funcionales a nivel celular. En estudios *postmortem* y en trabajos realizados con animales de laboratorio se ha observado disminución en la dendritogénesis, pérdida en la conectividad de las neuronas del hipocampo y de la corteza prefrontal, disminución en las espinas dendríticas de estas células, así como una marcada atrofia neuronal y disminución en el volumen de estas estructuras (Adriana, 2012)

Remodelación de espinas dendríticas

Los cambios en el remodelamiento de las dendritas y las pequeñas protuberancias de la superficie dendrítica denominadas "espinas" son el sitio principal de la mayoría de las sinapsis excitadoras, forman parte de las formas de neuroplasticidad en el cerebro que está involucrada en el proceso patológico de la depresión. Este fenómeno es muy sensible a estímulos ambientales (como el estrés y los fármacos) y se encuentra ampliamente desarrollado en estructuras del sistema límbico (Díaz & Gonzales, 2012).

Las espinas dendríticas se clasifican comúnmente en subtipos morfológicos de acuerdo con el tamaño y la relación proporciones de la base, cabeza y cuello (Duman & Duman 2014). Los cinco tipos más comúnmente categorizados son: *filiforme*, *long thing*- largas delgadas, *thing*- delgadas, *stubby*-gruesas y *mushroom*-tipo hongo (**Figura 1**) (Risher *et al.*, 2014). Las formas largas delgadas y las espinas largas de tipo filiforme son muy móviles y ayudan en el inicio del contacto sináptico (**Figura 1**). Las espinas gruesas carecen de una distinción clara entre cabeza y cuello y se consideran un tipo inmaduro (**Figura 1**). Espinas delgadas, son consideradas inmaduras con un estrecho cuello y una cabeza relativamente pequeña (**Figura 1**). Por el contrario, las espinas tipo hongo son completamente maduras, mucho más estable y contiene una gran cantidad de neurotransmisores receptores para mantener altos niveles de actividad sináptica (**Figura 1**) (Duman & Duman 2014; Risher *et al.*, 2014). Para visualizar las espinas se lleva ocupando durante más de un siglo, el método de Golgi-Cox que es una de las técnicas histológicas más eficaces para visualizar la morfología de las neuronas y sus procesos. La técnica se basa en la impregnación de neuronas con nitrato de plata, de modo que las estructuras finas de los procesos neuronales, incluidas las dendritas y las espinas dendríticas, se revelan con mucho detalle (Du, 2019).

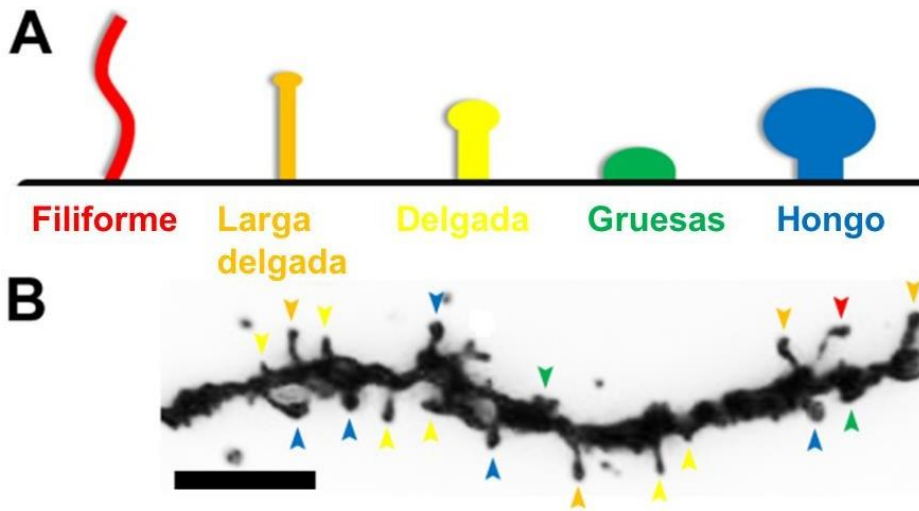


Fig. 1. Clasificación de las espinas dendríticas. A) Los cinco tipos más comúnmente categorizados son: *filo-* filiforme (rojo), *long thing-* largas delgadas (amarillo), *thing-* delgadas (amarillo claro), *stubby-* gruesas (verde) y *mushroom-* tipo hongo (azul). B) Foto de una dendrita secundaria de una neurona piramidal en la corteza visual de ratón (barra de calibración 5 μ m). Tomada y modificada de Risher *et al.*, 2014.

Neurogénesis

El estudio de la generación de neuronas en el cerebro adulto tiene sus inicios en los trabajos del doctor Joseph Altman. En esos trabajos se reportó la presencia de células que incorporaron timidina tritiada en el giro dentado del hipocampo adulto de roedores (Altman, 1965; Baptista *et al.*, 2018).

El proceso de neurogénesis incluye diferentes eventos que son:

1. *Proliferación asimétrica de las células troncales o tipo 1.* Estas células troncales con características de la glía radial (Kempermann *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2015), tienen filamentos intermedios como la nestina y la proteína ácida fibrilar glial, (GFAP, por sus siglas en inglés). Durante su división dan origen a una célula tipo 1 y a una célula tipo 2. La morfología de estas células se caracteriza por tener una proyección radial hacia la capa molecular (CM) y el soma localizado en la zona subgranular (ZSG). También, es parecida a las células de la glía, con un citoplasma triangular, alargado o anguloso que alcanza la capa de células granulares. (Kempermann *et al.*, 2004). Hallazgos como los

de Song H. *et al.* (2002), demostraron que los astrocitos adultos del hipocampo son capaces de regular la neurogénesis para que adopten un destino neuronal. También regulan la formación de sinapsis y la transmisión sináptica, lo cual refuerza que los astrocitos tienen un papel regulador activo, más que meramente un papel de apoyo (Kempermann *et al.*, 2014).

2. Proliferación simétrica de las células progenitoras tipo 2. Estas células forman a la población de rápida amplificación y se caracterizan de expresar la proteína GFAP y el factor de transcripción asociado a multipotencia Sox2. La morfología de estas células se caracteriza por proyecciones cortas y alineadas de manera horizontal a la capa granular del GD. Además, expresan de manera temporal diferentes marcadores proteicos que permiten hacer una subclasificación en células 2a (que expresan GFAP y Sox2) y en células 2b que expresan a la proteína doblecortina y al factor de transcripción NeuroD (Kempermann *et al.*, 2004). De tal modo que las células tipo 2b dan origen a las células tipo 3 o neuroblastos (Kempermann *et al.*, 2004). Estas células muestran características de células progenitoras ya que algunas de ellas co-expresan Ki-67 (un marcador de proliferación celular) y por lo tanto son capaces de dividirse (Espósito *et al.*, 2005; Cimadamore *et al.*, 2013). Por último, el tipo celular 3, el cual expresa doblecortina y NeuN. Los tres tipos celulares expresan la proteína polisializada de NCAM (PSA-NCAM) (Kim *et al.*, 2014) **(Figura 2)**.

3. Generación de neuronas inmaduras. Las células tipo 3 se caracterizan por expresar a la proteína doblecortina (DCx), que se asocia a los microtúbulos (Plumpe *et al.*, 2006). Estas células pueden permanecer como neuroblastos o bien, salir del ciclo celular para dar origen a las neuronas inmaduras que expresan la proteína DCx en sus árboles dendríticos y en las fibras musgosas que proyectan hacia CA3 (Knierim *et al.*, 2015). Posteriormente, las células de nueva generación expresan a la proteína calretinina y continúan con su fase de maduración (Kempermann *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2003). Las primeras conexiones con CA3 ocurren dentro de los primeros 4-10 días

después del nacimiento de una nueva célula (Markakis *et al.*, 1999), durante las cuales estas nuevas células empiezan a recibir aferencias GABAérgicas y no glutamatérgicas (Esposito *et al.*, 2005; Overstreet *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006) por lo que el neurotransmisor GABA juega un papel crucial para el desarrollo dendrítico de estas células.

4. Maduración neuronal. En este punto las neuronas de nueva generación adquieren un fenotipo maduro y expresan a la proteína calbindina (Kempermann, 2012). Esta proteína se localiza en las fibras musgosas y en la capa granular. Además, las neuronas maduras presentan características electrofisiológicas, como es la generación de potenciales de acción presentes en las células granulares del GD. La calbindina se expresa en todas las neuronas maduras del GD, en la mayoría de las neuronas piramidales de CA1 y CA2 y se usa como marcador de la última etapa de la neurogénesis adulta, para marcar neuronas granulares maduras (Dominguez *et al.*, 2003), pero no junto a PSA-NCAM (Dominguez *et al.*, 2003) ni junto a calretinina que marcaba también neuronas postmitóticas inmaduras (Nacher, *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2003) **(Figura 2)**.

El proceso descrito anteriormente sugiere que conforme ocurre la proliferación, migración y diferenciación las nuevas neuronas se van incorporando al lugar que ocupará permanentemente y que durante este proceso existe una expresión transitoria de proteínas que sirven como marcadores de cada etapa del proceso (Kempermann, 2012).

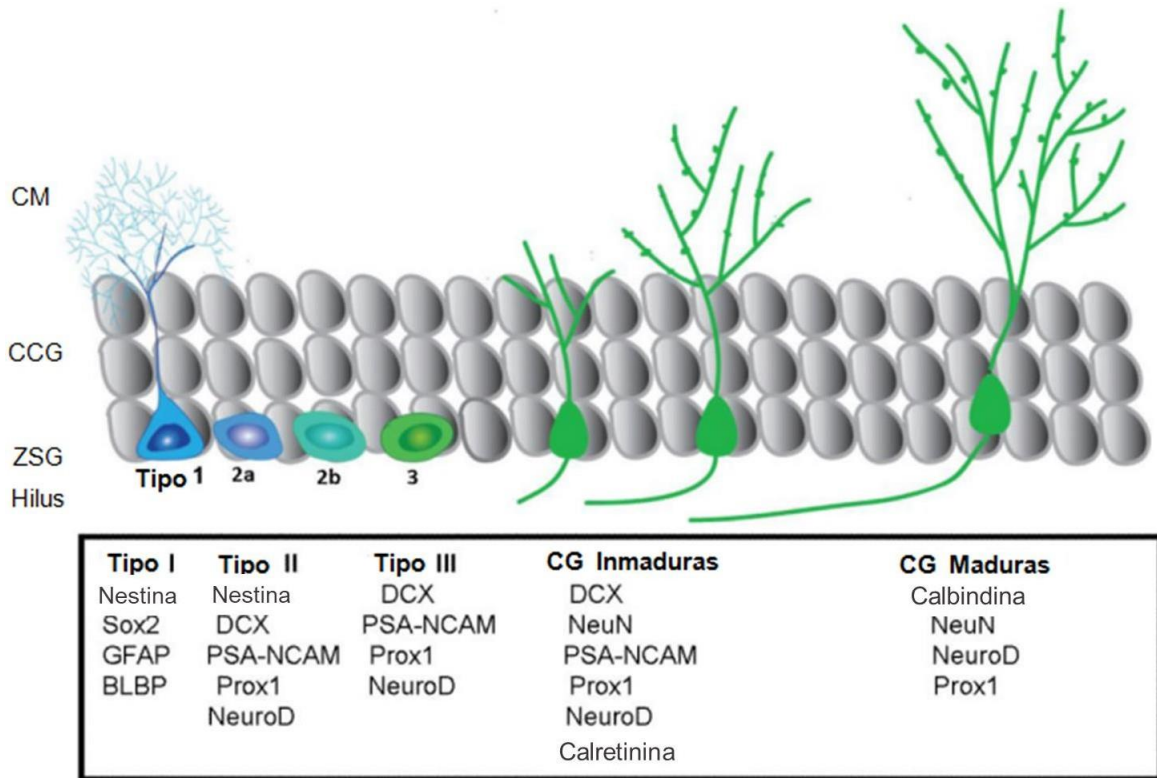


Fig. 2. Linajes celulares encontrados en la ZSG del GD en el hipocampo. Los astrocitos radiales (células tipo I) son considerados las células madre neurales de esta región, las cuales dan origen a precursores neuronales (células tipo II) que migran hacia las capas superiores, donde se diferencian en neuronas maduras (granulares posnatales). Este proceso dura aproximadamente 28 días y durante el transcurso del mismo los progenitores subgranulares expresan diferentes marcadores moleculares que permiten realizar su tipificación. Tomada y modificada de Kempermann, 2012

Análogos de la timidina

Las células en replicación se someten a la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular, en ese momento pueden insertarse análogos de la pirimidina desoxinucleósido timidina en el ADN en replicación, marcando eficazmente las células en división permitiendo su caracterización (Cavanagh *et al.*, 2011). Los análogos de timidina se pueden detectar mediante una variedad de métodos que incluyen radiodetección para timidina tritiada, inmunodetección para bromodesoxiuridina (BrdU), clorodesoxiuridina (CldU) y yododesoxiuridina (IdU), y detección química de etinildesoxiuridina (EdU) (Tuttle *et al.*, 2010). Se pueden lograr resultados óptimos en múltiples tipos de tejidos, incluidos páncreas, piel, intestino, hígado, suprarrenales, testículos, ovario, tiroides, ganglios linfáticos y

cerebro y en este sentido, la administración secuencial de análogos de timidina representa un enfoque novedoso para estudiar los orígenes y la supervivencia de las células (Tuttle *et al.*, 2010).

Antecedentes

Dentro del trastorno depresivo se ha descrito en pacientes que tiene una incidencia de 47% de presentar algún grado de deterioro cognitivo, y que puede estar asociada a un deterioro en las cortezas frontales así como en regiones del sistema límbico, como lo es el hipocampo (Maramis *et al.*, 2021), por ello en los modelos animales con ECI se ha corroborado que este modelo genera deterioro en el proceso de aprendizaje y memoria en los animales (Luo *et al.*, 2016). De manera interesante se han estudiado y demostrado las correlaciones entre la formación de la memoria y los cambios funcionales y estructurales de las espinas dendríticas (Nishiyama, 2019).

La investigación en modelos animales de estrés crónico, muestran que el estrés disminuye la densidad de espinas dendríticas en estructuras límbicas como el hipocampo (Qiao *et al.*, 2018), además de modificaciones en su morfología y función (Duman & Duman 2014), que están relacionadas con la generación de conductas tipo depresivas. Además de los cambios estructurales en las espinas, también se ha encontrado que la complejidad de los árboles dendríticos de neuronas del hipocampo y la corteza entorrinal, disminuyen en modelos animales de estrés (Dioli *et al.*, 2019). Por otro lado, estos cambios estructurales en las dendritas y sus espinas pueden estar relacionados con cambios a nivel de formación de sinapsis en el sistema límbico (Díaz & Gonzales, 2012). De igual manera, dentro de nuestro equipo de trabajo en un protocolo de ECI y tratados con EMTr 5Hz se encontró que tanto el número total como el tipo de espinas maduras se encuentra disminuida por el protocolo de ECI y que dichas alteraciones pueden ser revertidas con el tratamiento de EMTr 5Hz (Rocha-Martínez *et al.*, en proceso). A nivel morfológico, la plasticidad neuronal del giro dentado del hipocampo se refleja por cambios en las espinas dendríticas y, también por la adición de neuronas nuevas y funcionales.

El proceso de neurogénesis ha tomado gran relevancia en los últimos años para el estudio del trastorno depresivo mayo, postulando así la hipótesis neurogénica de la

depresión que se postuló en base a tres observaciones. Primero, el estrés es un factor de riesgo para el desarrollo de depresión y está asociado con reducciones en el volumen del hipocampo; el estrés también reduce la neurogénesis en el hipocampo. En segundo lugar, la mayoría de los antidepresivos generalmente requieren un período de varias semanas para ejercer su acción beneficiosa, similar al período de tiempo que los precursores neuronales del recién nacido necesitan para integrarse y contribuir como neuronas funcionales a los circuitos de DG del adulto. En tercer lugar, el tratamiento con antidepresivos y los aumentos resultantes en los niveles de serotonina, por ejemplo, promueven la proliferación celular y la generación de nuevas neuronas en el hipocampo (Lucassen *et al.*,2016). Dada la clara asociación entre el estrés, las reducciones de volumen del hipocampo y el trastorno depresivo mayor, no fue una sorpresa que los antidepresivos farmacológicos, pudieran afectar la neurogénesis del hipocampo en varios modelos animales (Micheli *et al.*,2018).

Por otra parte, nuestro equipo de trabajo ha generado evidencia de los cambios neuroplásticos a nivel estructural y celular que provoca la EMTr a 5Hz en un modelo murino de depresión, donde el tratamiento con EMTr no solo ha demostrado su capacidad para revertir conductas tipo depresivas sino también la capacidad para modificar el microambiente neurogénico impactando en diferentes etapas como es el incremento en el número de células radiales en los ratones que recibieron la EMTr comparado con sus grupos Sham y ECI (**Figura 3b**). En el mismo sentido, se encontró que se favorece la etapa de proliferación (**Figura 3c**), los estadios intermedios identificados con la proteína doblecortina (**Figura 3d**). Finalmente se encontró el incremento del volumen de las fibras musgosas, que son un conjunto de axones provenientes de neuronas del giro dentado y que proyectan hacia CA3, y en el curso temporal de la neurogénesis del hipocampo las neuronas del recién nacido envían sus axones a través del tracto de fibras musgosas modificando así el volumen de éstas (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2018) (**Figura 3f y g**) (Meneses-San Juan D., *et al.*, en proceso).

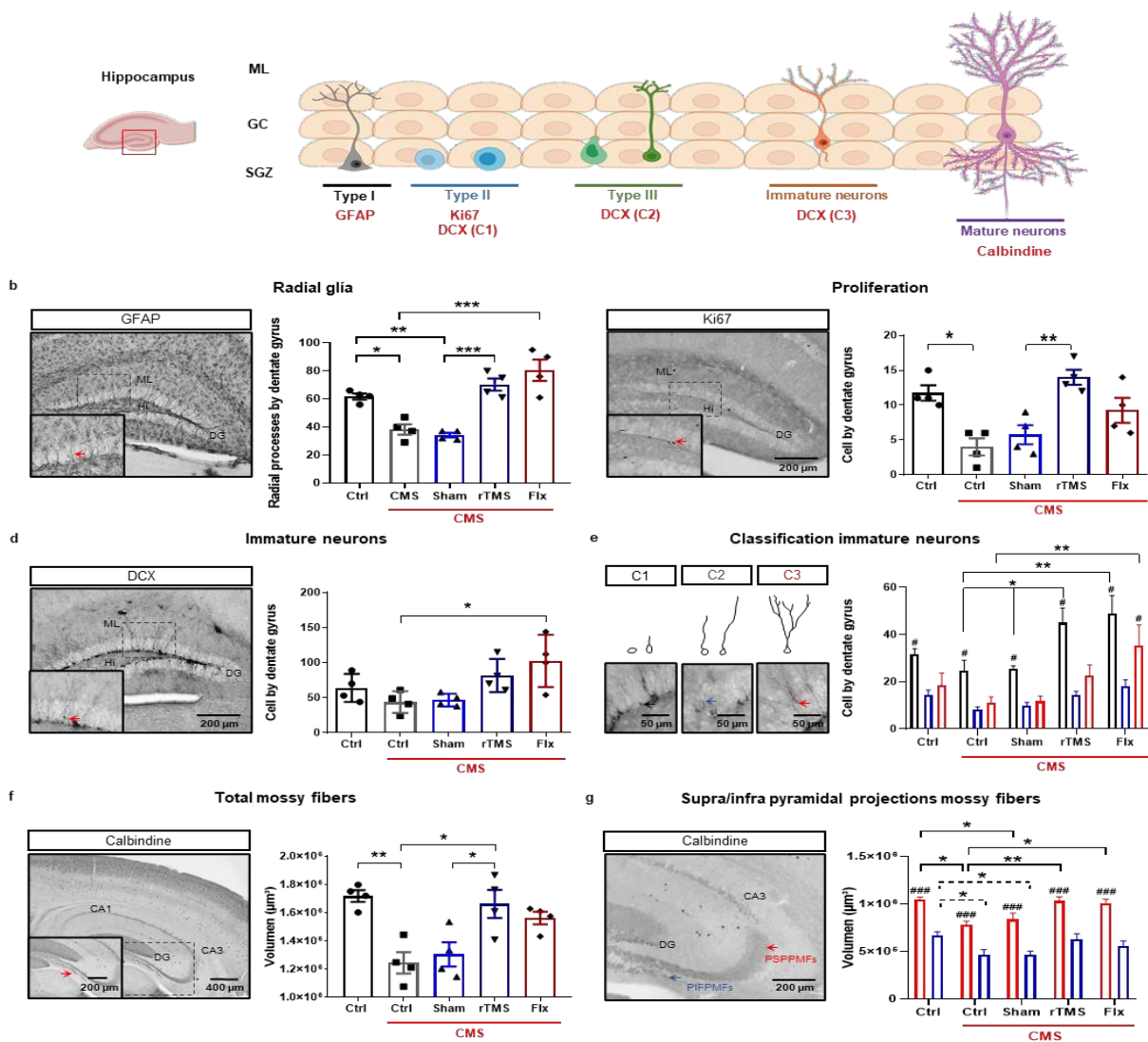


Fig. 3. Efectos de tratamientos antidepresivos y neurogénesis. A) etapas de la neurogénesis que se estudiaron, b) glía radial, c) resultados de Ki67, d) total de doblecortinas, e) clasificación por categorías del marcador doblecortina, f) volumen total de las fibras musgosas y g) volumen total de fibras musgosas la región supra. (Meneses-San Juan D., *et al.*, en proceso).

Los trabajos antes mencionados apuntan a que la neurogénesis es un blanco para la EMTr, sin embargo, no se ha demostrado la dependencia de sus efectos tipo antidepresivos de la producción de nuevas neuronas. Para ello es necesario utilizar herramientas que permitan disminuir o suprimir la neurogénesis. Entre estas estrategias se encuentran la irradiación del hipocampo y la administración sistémica

de fármacos utilizados para tratar algunos tumores cerebrales como el caso de la temozolomida (TMZ).

Supresión de la neurogénesis

Rayos X

Las terapias con rayos-X son comúnmente conocidas para tratar diferentes tipos de cánceres pues elimina éstas células, y de manera paralela fue de las primeras técnicas descritas como un supresor de la neurogénesis (Santarelli *et al.*, 2003), pero dada su inespecificidad al no solo destruir o retrasar el crecimiento de las células cancerosas y las progenitoras, sino también afectar a las células sanas adyacentes como son las neuronas y las células gliales ya formadas, dañándolas y causando efectos secundarios como apoptosis de estas células, incrementando en citoquinas proinflamatorias, un déficit cognitivo, dolores de cabeza etcétera (Madsen *et al.*, 2003).

Temozolamida (TMZ)

La TMZ fue desarrollado por primera vez a principios de la década de 1980 en la Universidad de Aston en Gran Bretaña, recibió la aprobación acelerada de la FDA en 1999 como tratamiento contra los astrocitomas anaplásicos (Friedman *et al.*, 2000). Después de la administración oral, la TMZ se absorbe fácilmente en el intestino delgado, con una buena penetración de la barrera hematoencefálica debido a su pequeño tamaño (194 Da). Posteriormente sufre una conversión intracelular mediante hidrólisis en un potente agente metilante llamado metil triazeno imidazol carboxamida (MTIC). El MTIC adiciona grupos metilo (alquilación) a guanina en los sitios N7 y O6, y a la adenina en el sitio O3. Esto provoca la sustitución de timina por citosina durante la replicación del ADN, lo que crea un par de bases no coincidentes. Esto, a su vez, desencadena la vía de reparación del ADN pero da como resultado la formación de enlaces cruzados inapropiados del ADN, detención de las células en la fase del ciclo celular G2 y conduce a la apoptosis porque los mecanismos de reparación celular no pueden ajustarse a la base metilada (**Figura 4**) (Schreck. 2018). La TMZ, al ser un fármaco específico de

las células en división celular y tener pocos efectos secundarios, se considera como una buena alternativa para suprimir la neurogénesis hipocampal (Garthe *et al.*, 2009).

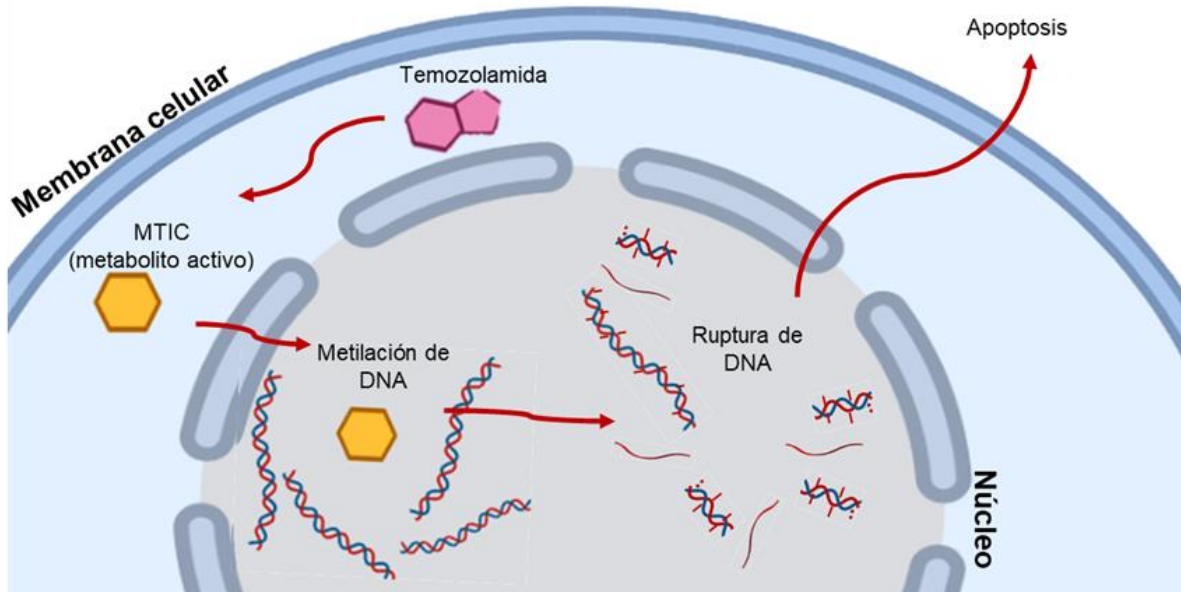


Fig. 4. Mecanismo de acción de la TMZ. Proceso que lleva a cabo la TMZ ya dentro de la célula y por la cual lleva a cabo su acción. (Tomada y modificada de Schreck. 2018).

II. Justificación

La EMTr como tratamiento para el trastorno depresivo mayor es una alternativa terapéutica para la depresión. En modelos animales de estrés se ha evidenciado que la EMTr produce efectos tipo antidepresivos, así como modular cambios en el proceso neurogénico. Sin embargo, no se ha determinado si los efectos tipo antidepresivos provocados por la EMTr dependen totalmente de la neurogénesis o de otros eventos de la neuroplasticidad. Considerando lo anterior, en este proyecto la pregunta de investigación de este trabajo es ¿Dependerán los efectos tipo antidepresivos de la EMTr a 5 Hz del incremento en la neurogénesis o de otras modificaciones estructurales como son la formación de las espinas dendríticas?

III. Hipótesis

Los efectos tipo antidepresivos de la EMTr requieren de la generación de neuronas en el giro dentado del hipocampo en roedores hembra de la cepa Balb/C expuestos a estrés crónico impredecible.

IV. Objetivos

General

Estudiar si los efectos tipo antidepresivos de la EMTr dependen de la neurogénesis hipocámpica en roedores Balb/C.

Específicos

- Determinar los efectos de la EMTr a 5 Hz en conductas asociadas con la depresión y en conductas asociadas con el proceso de aprendizaje-memoria
- Cuantificar la supervivencia celular, los estadios de proliferación (Ki67), los estadios intermedios cuantificando las células que expresen doblecortina (DCx), así como la complejidad dendrítica de las nuevas neuronas inmaduras.
- Cuantificar el número de espinas dendríticas y analizar su clasificación por estado de maduración.
- Realizar los análisis de correlación de las conductas tipo depresivas con las modificaciones en el proceso de neurogénesis.

V. Metodología:

Diseño experimental

Se utilizarán 35 ratones hembra de la cepa Balb/C de 8 semanas de edad, los animales serán colocados en grupos de siete roedores, en cajas con medidas de 27 x 16 x 23 cm en condiciones de humedad y temperatura controladas, ciclos de luz-oscuridad cada doce horas y serán expuestos al protocolo de ECI para inducir conductas tipo depresivas previo al tratamiento de cuatro semanas con EMTr a 5 Hz. Los roedores tendrán acceso libre al alimento y agua, a excepción de los periodos de exposición al protocolo de ECI. Los grupos experimentales serán: 1)

Control, 2) ECI, con el vehículo de la TMZ y sin EMTr), 3) ECI, con el vehículo de la TMZ y con EMTr, 4) ECI con TMZ y 5) ECI con TMZ más EMTr (Tabla 1).

Tabla 1

Grupo	ECI	TMZ	VEH (NaCl)	EMTr
Control	-	-	-	-
ECI + VEH + Sham (V+Sham)	+	-	+	Sin pulsos
ECI + VEH + EMTr (V + E)	+	-	+	+
ECI + TMZ + EMTr (T + E)	+	+	-	+
ECI + TMZ + Sham (T + Sham)	+	+	-	Sin pulsos

Para la supresión o disminución de la neurogénesis se inyectó la TMZ durante tres días consecutivos por dos semanas. La TMZ se administró por vía interperitoneal a una dosis de 25mg/kg disuelto en NaCl 0.9% y, se les inyectó 5-cloro-2'-desoxiuridina (CldU) a una dosis de 42.5mg/kg diario durante tres días seguidos dos horas después de la TMZ (**Figura 5**). Una vez concluidas las dos semanas con TMZ se comenzó la intervención con EMTr 5Hz utilizando el estimulador Mag Pro R30 y una bobina refrigerada. Previamente se determinó el umbral motor (UM) por individuo y durante las primeras tres sesiones se administró 5-yodo-2'-desoxiuridina (IdU) a una dosis de 57.5mg/kg dos horas después de las sesiones con EMTr 5Hz (**Figura 5**), sin anestesia. Una vez que las conductas tipo depresivas se hayan presentado, entonces se iniciará con la aplicación de la EMTr 5 Hz. Una vez concluido el tratamiento durante cuatro semanas en las que se habrán de aplicar un total de 20 sesiones, se aplicará una batería de pruebas conductuales asociadas con comportamientos tipo depresivos (splash test-motivación, nado forzado-desesperanza) y cognitivos (reconocimiento de objeto novedoso y cambio de localización). Finalmente, dos horas después de la última prueba, los ratones fueron eutanizados por decapitación recolectando el cerebro para el procesamiento de las muestras (**Figura 5**). A lo largo del experimento se hicieron evaluaciones del estado

de pelaje de los ratones una vez por semana como una medida de las alteraciones inducidas por el ECI en el autocuidado. Posterior al sacrificio se tomaron frotis vaginales para determinar la fase del ciclo estral de las ratonas de cada grupo.

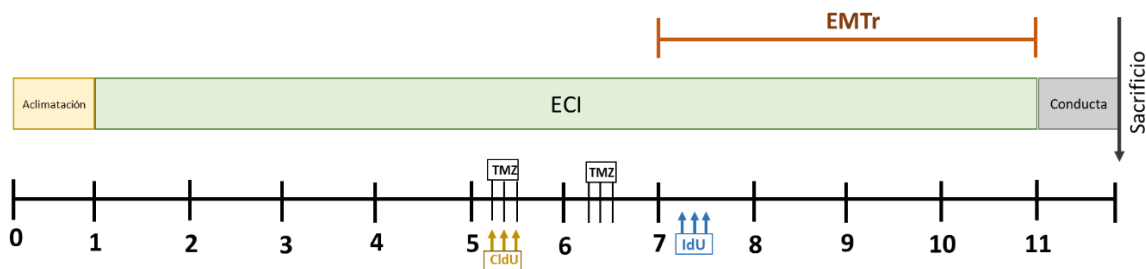


Figura 5. Diseño experimental

Estrés crónico impredecible

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

Tabla 2

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

Estimulación magnética transcraneal

Se utilizó un estimulador Mag Pro R30 y una bobina refrigerada, con los que se identificó el umbral motor (UM) por individuo, sin anestesia. Con referencia a este valor se obtuvo la intensidad para la exposición de los estímulos de cada individuo (UM= 28-34 %). Los ratones fueron estimulados a partir de la cuarta semana del protocolo de ECI, se aplicaron treinta trenes de estimulación de 5 Hz (Armas-Castañeda et al. 2015) por día para cada sujeto en la CFDLI, con el fin de revertir las conductas depresivas presentadas en los ratones. Cada tren incluyó 10 estímulos, con intervalos de 10 segundos entre trenes de estimulación. La bobina fue colocada sobre la cabeza del ratón y paralela a la columna vertebral. Para los ratones del grupo “Sham”, se expuso a las mismas condiciones, pero se evitaron los pulsos utilizando un bloque de acrílico de 20 cm de grosor.

Pruebas conductuales

Para evaluar conductas tipo depresivas en los ratones bajo el protocolo de ECI y la exposición a los tratamientos antidepressivos, se utilizaron las siguientes pruebas conductuales: Rotarod, Prueba de acicalamiento artificial o “Splash test” (ST) y Nado forzado (NF), además, durante todo el experimento se evaluó el estado de pelaje de los individuos, también se evaluaron conductas de ansiedad con las pruebas de cambo abierto y el laberinto elevado en cruz; finalmente se realizaron pruebas para evaluar memoria y aprendizaje, que fueron la de localización de objeto y reconocimiento de objeto novedoso. Todas las pruebas se realizaron en el periodo de actividad de los ratones (fase oscura) y media hora antes de iniciar cada prueba, los organismos fueron trasladados al lugar donde se hizo el registro con el fin de que se aclimataran al cuarto de conducta. El comportamiento de los animales en cada una de las pruebas fue videograbado, los datos resultantes fueron analizados con el programa de registro conductual “Anymaze versión 5.14”.

Estado de pelaje (EP)

El EP de todos los individuos se registró semanalmente durante todas las semanas del experimento. El EP de los ratones fue evaluado como una medida de las alteraciones inducidas por el ECI en la motivación hacia el comportamiento de autocuidado. En trabajos anteriores se ha reportado que ratones expuestos a ECI muestran una degradación progresiva de su EP, lo cual es uno de los índices más

replicables de las alteraciones inducidas por el ECI y que ha sido validado farmacológicamente como un parámetro útil para estudiar el inicio de las terapias antidepresivas (Santarelli *et al.* 2003; Surget *et al.* 2008; Tanti *et al.* 2012). El puntaje del EP se basó en los parámetros propuestos por Tanti *et al.*, (2012), donde el valor de 0 representa un estado bueno (piel lisa y brillante, sin parches en el pelaje), el 0.5 uno intermedio (pelaje ligeramente mullido con algunos parches) y el 1, un estado muy malo (pelaje esponjoso en la mayor parte del cuerpo con ligeras manchas en la piel).

Rotarod

Veinticuatro horas después de terminado el protocolo de ECI y la aplicación de los tratamientos, los organismos fueron puestos a prueba en una sesión en el Rotarod, para evaluar su coordinación motora. Se utilizó un protocolo de aceleración continua con un aumento de la velocidad del cilindro de 0 a 20 revoluciones por minuto (rpm) como máximo. Al final el parámetro registrado fue el tiempo de permanencia en el Rotarod

Campo abierto (Ca)

Esta prueba se ocupó con la finalidad de evaluar conductas ansiosas, pues se provoca un comportamiento ansioso al colocar a un sujeto solo en un espacio abierto (agorafobia) y nuevo sin la posibilidad de escapar. Los ratones se colocaron en una caja de 43.5x30.5x20 cm. El comportamiento de los roedores se grabó con un video cámara (SONY) durante cinco minutos. Los parámetros que se evaluaron fueron el número de cruces por el centro, así como el tiempo que pasaba en la periferia y en el centro; el animal se coloca en una esquina y posteriormente se hace la grabación durante 5 minutos.

Laberinto elevado en cruz (LEC)

El laberinto está conformado por dos brazos abiertos uno frente al otro de 50 cm de largo x 10 cm de ancho, son dos brazos laterales conectados por un centro, con otros dos brazos cerrados del mismo tamaño, con paredes lisas y sin techo, elevado a 50 cm del suelo. Los ratones fueron colocados en el centro del laberinto con orientación de la cabeza del ratón hacía algún brazo abierto, y se toma un video de 5 minutos. Las conductas que se midieron con esta prueba fueron: frecuencia de

entrada en brazos abiertos, así como el tiempo que permanece ahí y las mismas medidas para los brazos cerrados. Con el fin de evaluar conductas asociadas a rasgos de ansiedad

Localización de objetos (LO)

La LO es una prueba que proporciona información de memoria espacial dependiente del hipocampo. La tarea se basa en preferencia intrínseca de un animal por la novedad sin refuerzo externo adicional y, por lo tanto, normalmente puede evitar las complicaciones asociadas con respuestas emocionales diferencial. Se realiza el mismo día las tres sesiones, con una duración de 5 minutos cada sesión con intervalos de 15 minutos. La primera sesión es un campo abierto, la segunda sesión se expone a los animales a dos objetos exactamente iguales y la sesión final uno de los objetos se cambia por otro de características diferentes. En esta prueba se realizaron dos tipos de análisis, el primero comparar el porcentaje de tiempo de exploración entre ambos objetos, siendo el objeto 1 (O1) el que se queda en el mismo lugar, y el objeto 2 (O2), el que se cambia de posición, para cada grupo, la segunda comparación del índice de discriminación (ID), que va de 1 a -1, siendo que valores cercanos a -1 indicarían que prefiere el objeto que no se mueve, y valores cercanos a 1 que prefiere al que se cambia de posición.

Reconocimiento de objeto novedoso (RON)

El RON es una prueba utilizada para la investigación de diversos aspectos del aprendizaje y la memoria en ratones. Se realiza el mismo día las tres sesiones, con una duración de 5 minutos cada sesión con intervalos de 15 minutos. La primera sesión es un campo abierto, la segunda sesión se expone a los animales a dos objetos exactamente iguales y la sesión final uno de los objetos se cambia por otro de características diferentes. Es un paradigma, basado en la tendencia natural de los roedores a explorar más las cosas novedosas que las familiares. Se basa totalmente en el compartimiento espontáneo de los roedores, esta prueba permite estudiar la memoria. En esta prueba se realizaron dos tipos de análisis, el primero comparar el porcentaje de tiempo de exploración entre ambos objetos, siendo el objeto 1 (O1) el que el mismo objeto que en la primera sesión, y el objeto 2 (O2), el que se cambia, para cada grupo, la segunda comparación del índice de

discriminación (ID), que va de 1 a -1, siendo que valores cercanos a -1 indicarían que prefiere el objeto que no se queda igual, y valores cercanos a 1 que prefiere al novedoso.

Splash test (ST)

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

Nado forzado (NF)

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

Eutanización

Al finalizar las pruebas conductuales, los ratones fueron eutanizados por decapitación. Los cerebros fueron colocados en una solución de paraformaldehído al 4% y al día siguiente éstos fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30%. La mitad izquierda de los cerebros fue destinada para inmunohistoquímicas por lo que fueron seccionados en un micrótopo Leica SM 2010R para obtener cortes sagitales de 40 micras de espesor. Los cortes fueron colocados en placas de 96 pozos que contenía solución crioprotectora (25% de glicerol y 25% de etilenglicol) y se almacenaron a 4°C . La otra mitad se optuvó tejido para detección de proteínas por western blot y para la impregnación de metales pesados por la técnica del de Golgi Cox

Supervivencia de nuevas células

Para evaluar la supervivencia de nuevas células, se utilizaron los análogos de timidina CldU e IdU y se identificó en el tejido por medio de la técnica de inmunohistoquímica con diaminobenzidina (DAB). Los tejidos, fueron tratados con una solución de HCl al 2N durante 30 minutos a 37°C, posteriormente lavados con buffer de boratos pH 8.5, seguido de la incubación en una solución de bloqueo durante 30 minutos, para finalmente colocar el anticuerpo primario de ratón anti-BrdU (1:500) durante una noche a 4°C. Al día siguiente se agregaron los anticuerpos secundarios correspondientes, biotinilado anti- ratón (1:250) y el biotinilado anti- rata (1:250). Dos horas después el tejido se incubó con el complejo AB (Vector) y finalmente la reacción antigüeno anticuerpo se reveló con DAB. Los cortes fueron montados con el medio neomount y se dejaron secar para realizar la cuantificación de las células positivas tanto a CldU como IdU en el giro dentado del hipocampo.

Doblecortina (DCx)

Se utilizó para evaluar los estadios intermedios de la DCx y se identificó en el tejido por medio de la técnica de inmunohistoquímica con diaminobenzidina (DAB). Los tejidos, fueron tratados con un Buffer de citratos durante 30 minutos a 90°C, seguido de la incubación en una solución de bloqueo durante 30 minutos, para finalmente colocar el anticuerpo primario de ratón anti-DCx (1:500) durante una noche a 4°C. Al día siguiente se agregaron los anticuerpos secundarios correspondientes, biotinilado anti- cabra (1:250). Dos horas después el tejido se incubó con el complejo AB (Vector) y finalmente la reacción antigüeno anticuerpo se reveló con DAB. Los cortes fueron montados con el medio neomount y se dejaron secar para realizar la cuantificación de las células positivas a DCx en el giro dentado del hipocampo, así como su clasificación por morfología.

Proliferación (Ki67)

Se utilizó para evaluar los estadios de proliferación con ki67 y se identificó en el tejido por medio de la técnica de inmunohistoquímica con diaminobenzidina (DAB). Los tejidos, fueron tratados con un Buffer de citratos durante 30 minutos a 90°C, seguido de la incubación en una solución de bloqueo durante 30 minutos, para finalmente colocar el anticuerpo primario de ratón anti-Ki67 (1:1000) durante una noche a 4°C. Al día siguiente se agregaron los anticuerpos secundarios

correspondientes, biotinilado anti- conejo (1:250). Dos horas después el tejido se incubó con el complejo AB (Vector) y finalmente la reacción antígeno anticuerpo se reveló con DAB. Los cortes fueron montados con el medio neomount y se dejaron secar para realizar la cuantificación de las células positivas a Ki67 en el giro dentado del hipocampo.

Golgi Cox

En este trabajo la técnica de impregnación se realizó con el Kit FD Rapid GolgiStain TM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al finalizar la impregnación, el tejido se seccionó en un microtomo Leica SM 2010R 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. La cuantificación se hizo en neuronas del giro dentado del hipocampo en las que se identificara una dendrita secundaria, ahí se tomaron fotos con el objetivo de 100x para su posterior análisis en 10µm, con el software Reconstructor y se realizó la clasificación en base a su estado de maduración; esta clasificación nos permite obtener cinco tipos de espinas 1) *Filo-* filiforme, 2) *Long thing-* largas largas delgadas, 3) *Thing-* delgadas, 4) *Stubby-* gruesas y 5) *Mushroom-* tipo hongo.

Estadística

Para evaluar las diferencias en los distintos parámetros medidos entre los diferentes grupos experimentales, se realizaron ANOVAS de una vía o de dos vías de medidas repetidas, seguidas de la prueba *pos hoc* de Bonferroni considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para evaluar las diferencias de los parámetros medidos entre los controles negativos (grupo ECI) de cada cepa, se utilizó una prueba de t de Student. El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa estadístico Graph Prisma 6 u 8.

VI. Resultados

Conducta

1. Estado de pelaje (EP)

En el EP analizado cada semana durante todo el protocolo se observaron diferencias en cada uno de los grupos excepto en el grupo control (**Figura 6**). El ANOVA de dos vías de medias repetidas reflejó la interacción entre el factor tratamiento (factor A) y el tiempo en semanas (factor B) ($F_{5,380}=12.207$, $p<0.001$). El análisis post-hoc indicó que el grupo ECI+V+Sham incremento el deterioro del EP de manera significativa a partir de la segunda semana de la aplicación del ECI, comparado con la semana 0, y se mantuvo incrementando de manera significativa hasta la semana 6 permaneciendo el deterioro del EP (**Figura 6**) ($p=0.001$). El grupo ECI+V+E presentó diferencias significativas a partir de la semana 2, aumentando hasta la semana 4, posteriormente disminuyó de manera significativa en la semana 8 comparado con la semana 4 (dos semanas después de haber iniciado el tratamiento con EMTr a 5Hz) y continuó disminuyendo hasta la semana 10 (**Figura 6**) ($p=0.002$). El grupo ECI+T+Sham presentó diferencias significativas a partir de la segunda semana del protocolo con ECI, comparado con la semana 0, las cuales siguieron incrementando de manera significativa hasta la semana 6 (**Figura 6**) ($p=0.001$) manteniéndose con un valor elevado hasta el final del protocolo. Por último, el grupo ECI+T+E mostró diferencias significativas a partir de la segunda semana del protocolo comparado con su semana 0, el aumento continuó hasta la semana 4 y posteriormente empezó a disminuir el deterioro del EP en semana 9 (tres semanas después de empezado el tratamiento con EMTr y continuo así la semana restante cuando concluyó el protocolo (**Figura 6**) ($p=0.001$).

Además, se observó que desde las semanas 3 y 4, los ratones expuestos al ECI presentaron un deterioro significativo en comparación con los ratones del grupo Ctrl. que no fueron expuestos al ECI (**Figura 6**) ($p=0.001$). Sin embargo, en el grupo ECI+V+E se encontró una mejora en el EP en comparación con el grupo ECI+V+Sham y el ECI+T+Sham a partir de la semana 8 (**Figura 6**) ($p=0.001$). Por su parte, el grupo ECI+T+E presento valores menores en el EP en la semana 9 comparado con el grupo ECI+T+Sham y en la semana 10 comparado con el grupo

ECI+V+Sham (**Figura 6**) ($p=0.001$).

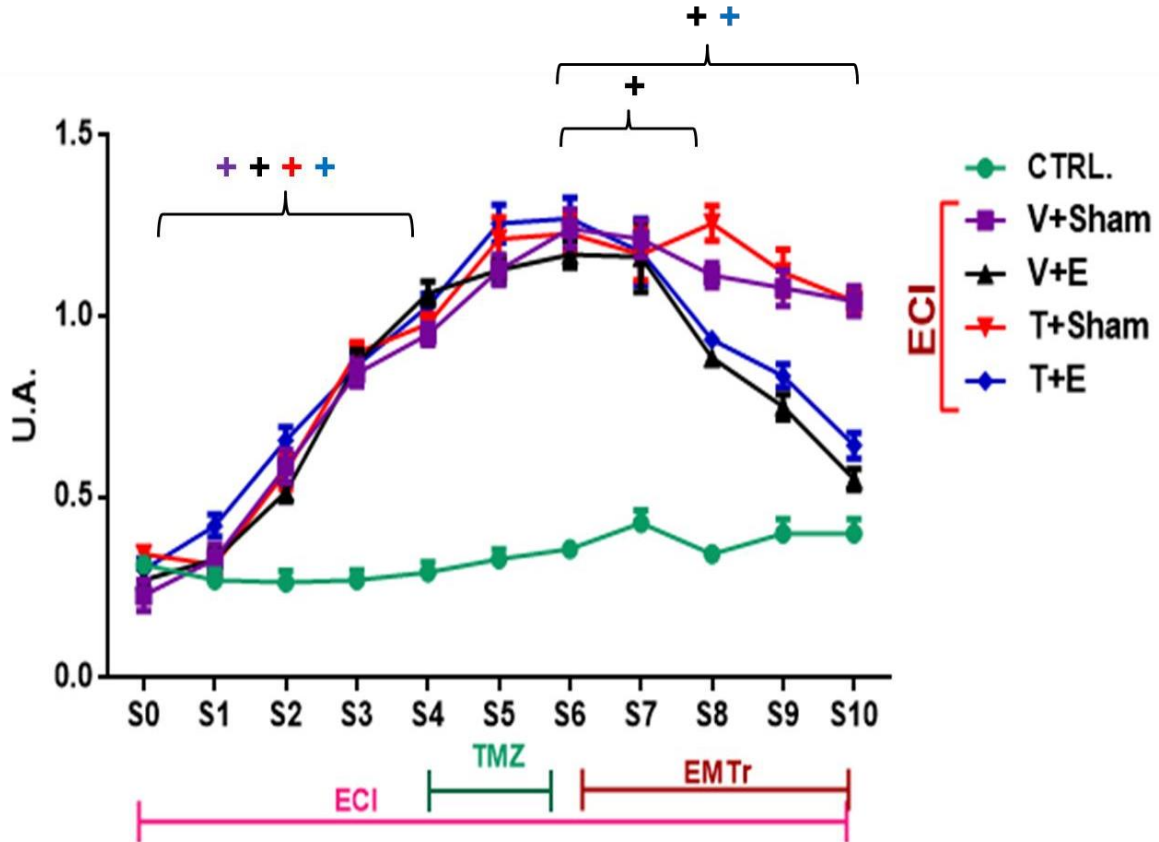


Fig. 6. Estado de pelaje. Puntaje del estado de pelaje a lo largo de todas las semanas de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI (estrés crónico impredecible) +V (vehículo) +Sham, ECI+V+E (EMTr), ECI+T (TMZ-temozolamida) +Sham y ECI+T+E. * comparación del mismo grupo a lo largo del tiempo $p<0.0001$. + comparación entre grupos en la S3, S4, S8, S9 y S10, $p<0.0001$. ANOVA dos vías, *pos hoc* Bonferroni. $n=7$.

2. Rotarod

En la prueba de Rotarod, el análisis de dos vías no mostró una interacción entre los dos factores (grupos x reto $F_{4,104}=0.380$, $p=0.929$). Aunque si se observó un efecto principal en la sesión de reto (reto $F_{4,104}=6.165$, $p=0.003$) pero no entre los grupos ($F_{4,104}=1.898$, $p=0.118$) (**Figura 7**).

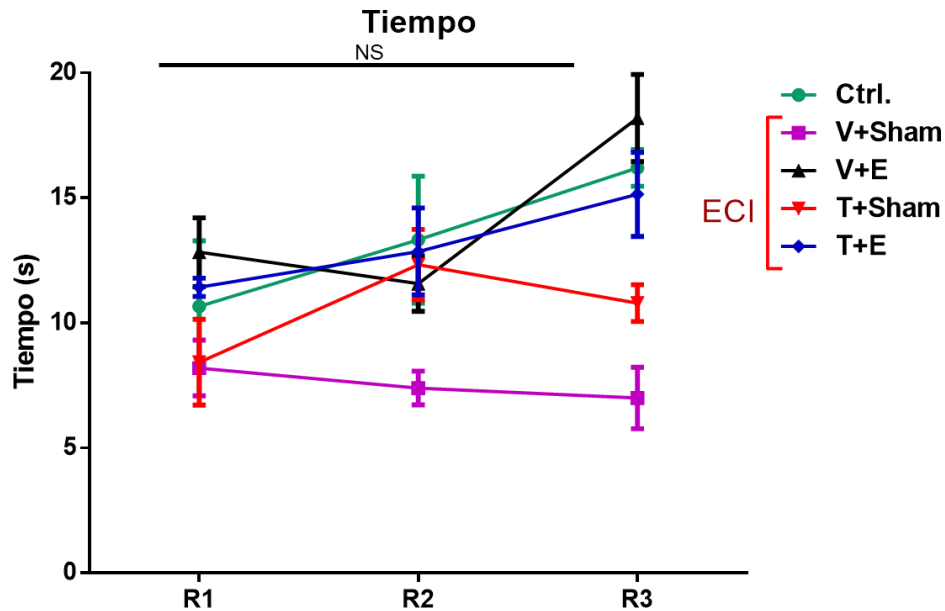


Fig. 7. Rotadod. Tiempo de permanencia en el Rotarod en las distintas fases (pre-prueba y fases de prueba) de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. ANOVA dos vías. n=7.

3. Campo abierto

El análisis del comportamiento de los roedores en el campo abierto se encontró que el número de cruces presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y el grupo tratado con EMTr ($p=0.018$). Este último grupo presentó un mayor número de cruces que los roedores tratados con TMZ ($p=0.018$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=7.617$, $p<0.001$) (**Figura 8a**). Respecto a las entradas al centro no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 8b**). Finalmente, el número de entradas en la periferia sólo mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo EMTr y TMZ (**Figura 8c**) ($q=4.758$) (ANOVA en rangos, entre grupos $H=13.229$, $p=0.010$).

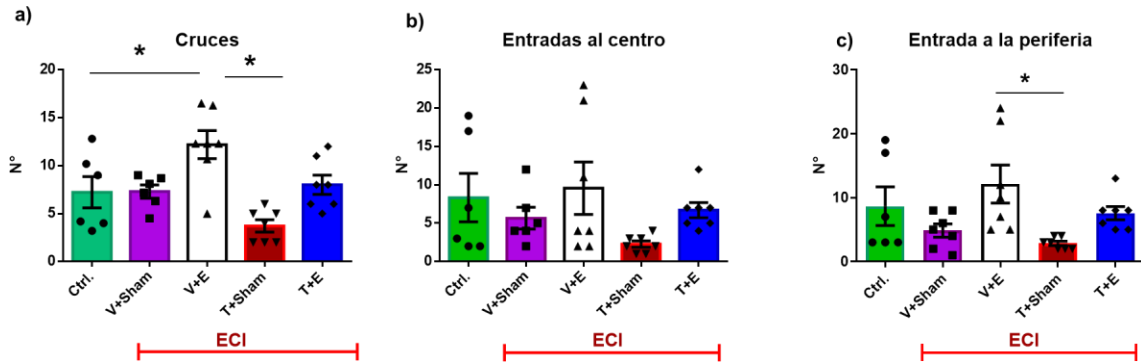


Fig. 8. Campo abierto. a) número de cruces de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.05$; b) número de entradas al centro de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.05$; c) número de entradas a la periferia de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+Er. * $p < 0.05$. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni y ANOVA en rangos. $n=7$.

4. Laberinto elevado en cruz

La evaluación de la conducta relacionada con la ansiedad en el paradigma del laberinto elevado en cruz reveló que no existen diferencias significativas en el número de entradas y tiempo en los brazos cerrados (**Figura 9 a, b**) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=3.334$, $p=0.023$) (ANOVA en rangos, entre grupos $H=6.699$, $p=0.153$). Respecto al número de entradas en los brazos abiertos tampoco se encontraron diferencias significativas (**Figura 9c**) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=1.691$, $p=0.178$). Finalmente, el análisis del tiempo en brazos abiertos mostró una diferencia significativa entre el grupo ECI+V+E comparado con el grupo ECI+T+Sham (**Figura 9d**) ($q=4.021$) (ANOVA en rangos, entre grupos $H=10.327$, $p=0.035$).

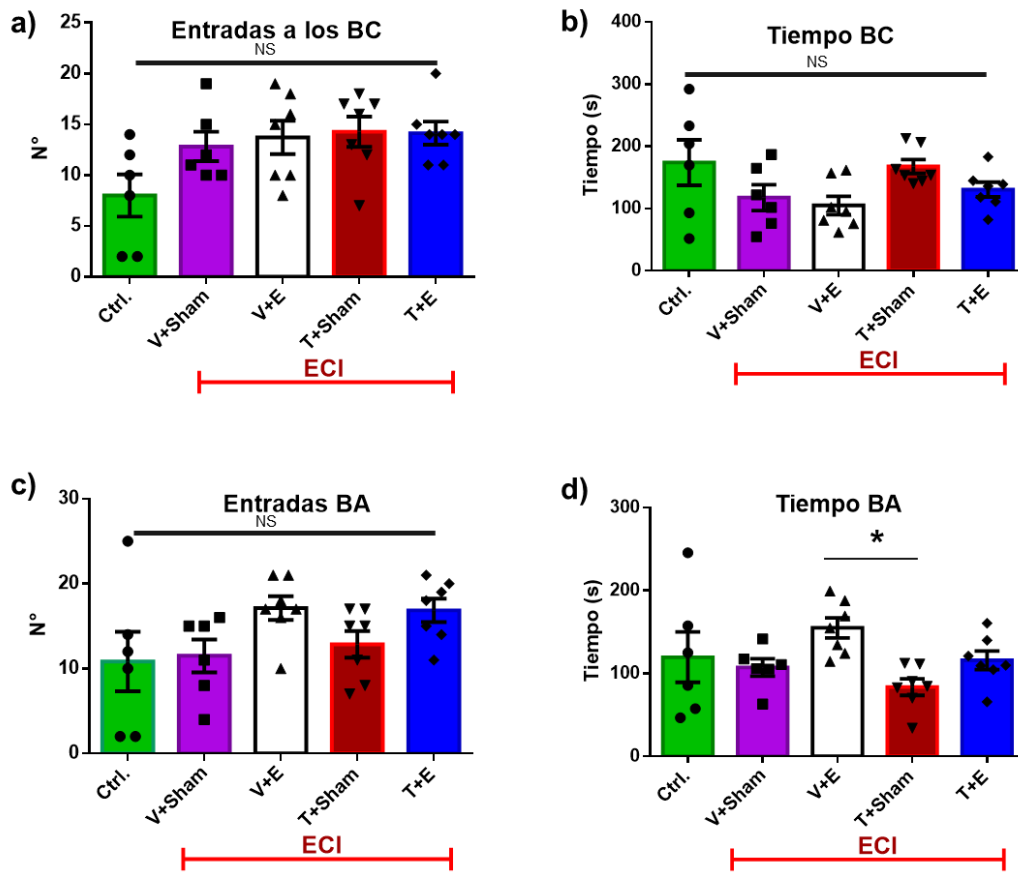


Fig. 9. Campo abierto. a) número de entrada a los brazos cerrados de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E.; b) tiempo en los brazos cerrados de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E; c) número de entrada a los brazos abiertos de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E.; d) tiempo en los brazos abiertos de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E.* $p < 0.05$. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni y ANOVA en rangos. $n = 7$.

5. Localización de objetos

El porcentaje de exploración del grupo control mostró que los roedores prefieren explorar el O2 (**Figura 10a**) (*t-Student* $p < 0.002$) mientras que el grupo ECI+NaCl mostró que los ratones preferían explorar el O1, y que es significativo (**Figura 10b**) (*t-Student* $p < 0.004$); para el grupo ECI+V+E no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los objetos (**Figura 10c**) (*t-Student* $p = 0.157$). El grupo ECI+T+Sham se encontraron diferencias significativas en la preferencia del

O1 (**Figura 10d**) (*t-Student* $p < 0.006$). Por último, para el grupo ECI+T+E no se encontraron diferencias significativas (**Figura 10e**) (*t-Student* $p = 0.528$).

El análisis del ID mostró diferencias significativas del grupo Ctrl. comparado con los grupos ECI+V+Sham ($p = 0.026$) y ECI+T+Sham ($p = 0.19$) (**Figura 10f**) (ANOVA de una vía $F_{4,31} = 5.010$, $p = 0.004$)

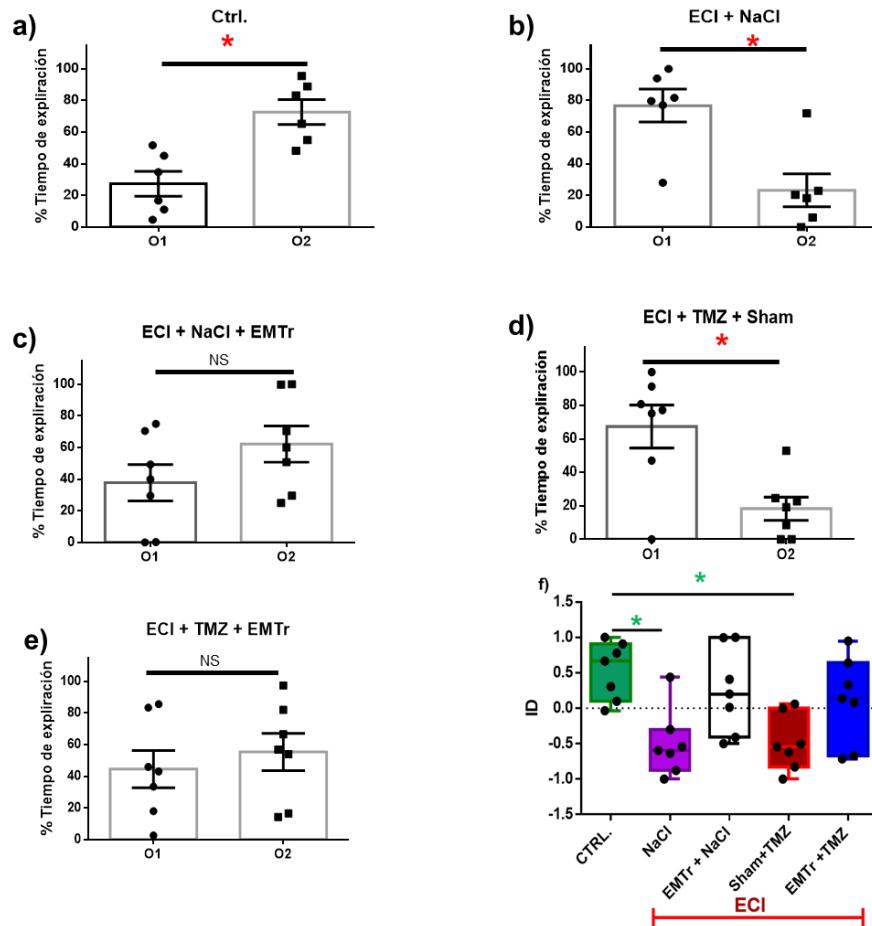


Fig. 10. Localización de objetos. a) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo Ctrl * $p < 0.05$; b) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+V+Sham * $p < 0.05$; c) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+V+E; d) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+T+Sham * $p < 0.05$; e) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+T+E; T-test, $n = 7$; f) Índice de discriminación de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.05$. *t-Student* y ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni. $n = 7$.

6. Reconocimiento de objeto novedoso

Para el porcentaje de exploración del grupo control se observó que preferían explorar el O2 de manera significativa (**Figura 11a**) (*Mann-Whitney* $p < 0.001$); para el grupo ECI+V+Sham no se observaron diferencias significativas en ninguno de los objetos (**Figura 11b**) (*Mann-Whitney* $p = 0.17$); para el grupo ECI+V+E se encontraron diferencias significativas entre explorar más el O1 (**Figura 11c**) (*t-Student* $p = 0.001$); para el grupo ECI+T+Sham no se encontraron diferencias significativas (**Figura 11d**) (*t-Student* $p = 0.069$); por último, para el grupo ECI+T+E se encontraron diferencias significativas en la preferencia del O1 (**Figura 11d**) (*t-Student* $p < 0.001$). Para el parámetro de ID se observó diferencias significativas por parte del grupo Ctrl. comparado con los grupos ECI+V+Sham y ECI+T+Sham, también se encontraron diferencias significativas del grupo ECI+V+E comparada con los grupos ECI+V+Sham y ECI+T+Sham, y finalmente una diferencia significativa entre el grupo ECI+T+E comparado con el grupo ECI+T+Sham (**Figura 11f**) ($p = 0.001$) (ANOVA de una vía $F_{4,31} = 12.540$, $p = 0.001$)

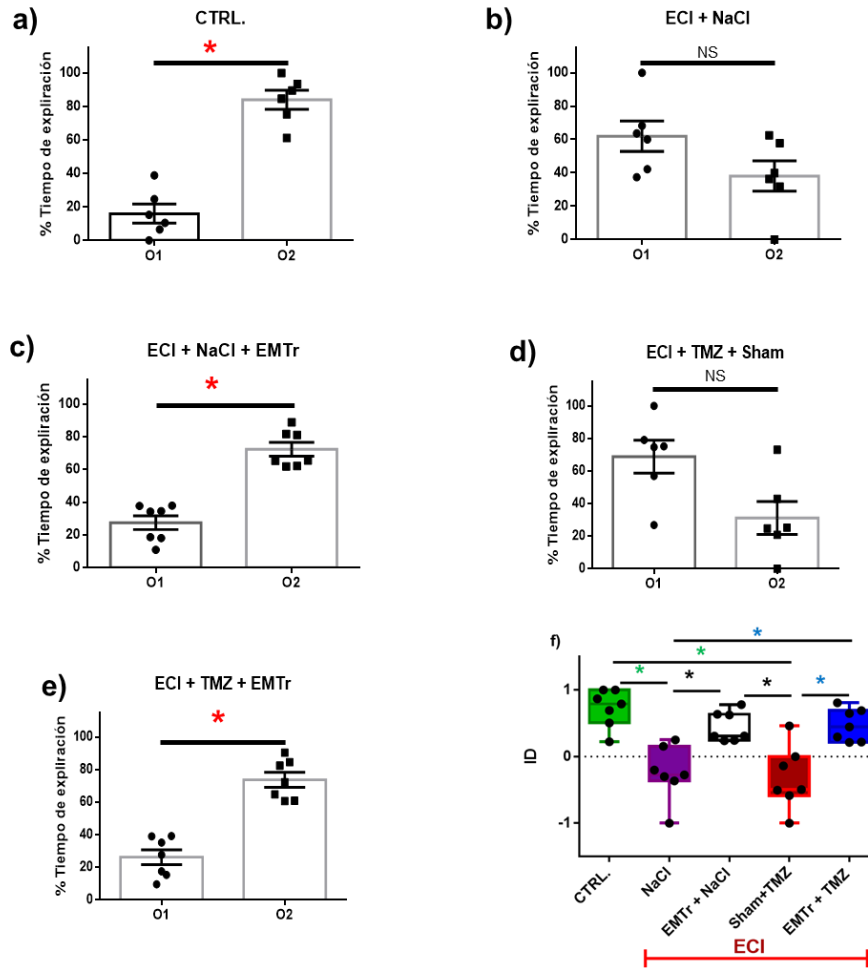


Fig. 11. Reconocimiento de objeto novedoso. a) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo Ctrl * $p < 0.05$; b) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+V+Sham; c) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+V+E * $p < 0.05$; d) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+T+Sham; e) porcentaje de exploración de ambos objetos del grupo ECI+T+E * $p < 0.05$. T-test, $n=7$; f) Índice de discriminación de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.05$. *t-Student* y ANOVA de una vía, *pos hoc* Bonferroni. $n=7$.

7. Splash Test

Referente a las conductas hedónicas y de autocuidado, el ST revela que los ratones que fueron sometidos al protocolo de ECI+V+Sham tienen una mayor latencia para iniciar la conducta de acicalamiento, respecto al grupo ECI+V+E (**Figura 12a**) ($q=3.226$) (ANOVA en rangos, entre grupos $H=13.048$, $p=0.011$). En cuanto a los episodios de acicalamiento se encontraron diferencias entre el grupo Ctrl.

comparado con los grupos ECI+V+Sham y el ECI+T+Sham, también del grupo ECI+V+E comparado con los grupos ECI+V+Sham y el ECI+T+Sham, y finalmente del grupo ECI+T+E comparado con el grupo ECI+T+Sham EMTr (**Figura 12b**) ($p=0.001$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=14.157$, $p=0.001$). Referente a la duración total de acicalamiento, existe diferencias por parte de los ratones del grupo Ctrl. comparado con los grupos ECI+V+Sham y el ECI+T+Sham, y del grupo ECI+V+E comparado con los grupos ECI+V+Sham y el ECI+T+Sham (**Figura 12c**) ($p=0.001$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=14.157$, $p=0.001$).

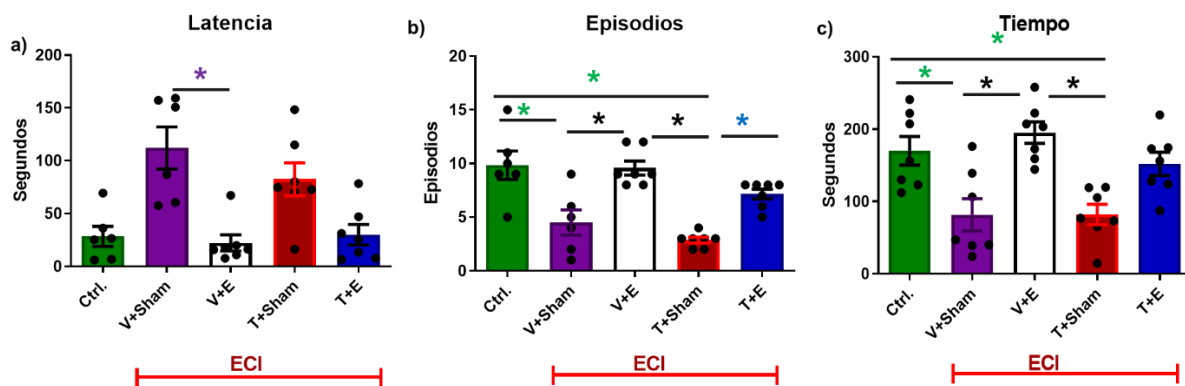


Fig. 12. Splash test. a) Latencia al primer episodio de acicalamiento de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.05$; b) Episodios de acicalamiento de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.05$; c) Tiempo de acicalamiento de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.05$. ANOVA de una vía, *pos hoc* Bonferroni y ANOVA en rangos. $n=7$

8. Nado forzado

Los resultados de la prueba de NF en ratones con ECI muestran que existe una reducción en la latencia al comienzo del primer episodio de inmovilidad, a comparación de los ratones Ctrl. (**Figura 13a**) ($p=0.001$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,31}=7.895$, $p<0.001$). En cuanto al tiempo de inmovilidad total, se observa que existe un aumento por parte del grupo ECI+V+Sham, a comparación del grupo Ctrl. y el ECI+V+E (**Figura 13b**) ($p=0.016$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=4.740$, $p=0.005$). Finalmente, para el parámetro de episodios de inmovilidad

se encontró que el grupo ECI+V+Sham comparado con el grupo Ctrl. (**Figura 13c**) ($p=0.026$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,34}=3.441$, $p=0.020$)

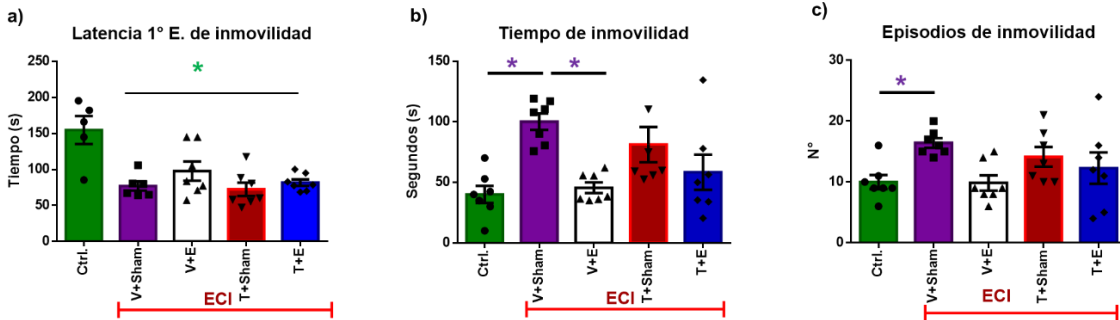


Fig. 13. Nado forzado. a) Latencia al primer episodio de inmovilidad de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.05$; b) Tiempo de inmovilidad de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.05$; c) Episodios de inmovilidad de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.05$. ANOVA de una vía, *pos hoc* Bonferroni. $n=7$.

Supervivencia celular

El análisis de la supervivencia celular con el CldU reflejo que el ECI disminuyo significativamente el número de células positivas a CldU ($p<0.001$) efecto que fue disminuido aún más por la administración de TMZ ($p=0.034$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,33}=31.423$, $p<0.001$) (**Figura 14a**). Por otro lado, la supervivencia celular marcada con IdU se encontró que el ECI disminuyo significativamente el número de células positivas a IdU ($p<0.05$) efecto que fue, parcialmente revertido por la EMTr ($p<0.05$). Sin embargo, la EMTr no logró revertir los efectos producidos por la TMZ ($p>0.05$). Un efecto similar se observó en el grupo que sólo recibió la TMZ ($p>0.05$). (ANOVA en rangos) (**Figura 14b**).

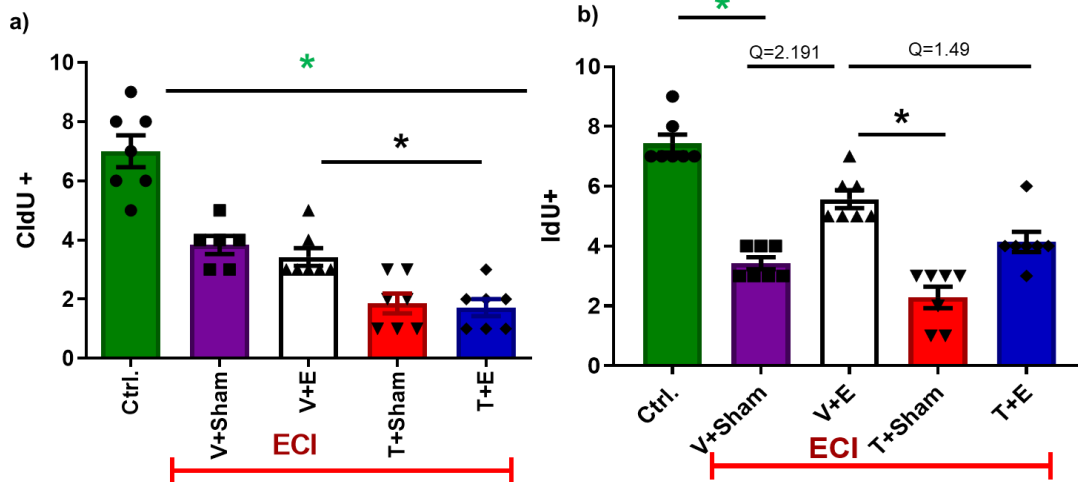


Fig. 14. Supervivencia celular. a) Células positivas a CldU de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.05$. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni. $n=7$. b) Células positivas a IdU de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.05$. ANOVA en rangos, *post hoc* Dunn. $n=7$.

Estadios intermedios del proceso de neurogénesis (DCx)

En el análisis de los estadios intermedios del proceso de neurogénesis analizados con la proteína DCx y para el primer parámetro a considerar fue el número total de células positivas a DCx en el giro dentado del hipocampo sin importar la morfología de las células. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron una disminución significativa en todos los grupos experimentales comparados con el control (**Figura**

15) ($p=0.001$) (ANOVA en rangos, $p=0.001$); también se encontró una disminución significativa de los grupos ECI+V+Sham, ECI+T+Sham y ECI+T+E comparados con el ECI+V+E (**Figura 15**) ($p=0.001$) (ANOVA en rangos, $p=0.001$); y finalmente una disminución significativa del grupo ECI+TMZ+Sham comparado con el ECI+T+E (**Figura 15**) ($p=0.001$) (ANOVA en rangos, $p=0.001$).

También se realizó la clasificación por morfología de acuerdo con la clasificación de Plümpe *et al.* 2006, que consta de 3 clasificaciones la C1 (Proliferación), C2 (estadios intermedios) y C3 (Post-mitótica). El análisis de varianza de dos vías mostró la interacción entre el factor grupos y categoría ($F_{4,104}=4.604$, $p < 0.001$).

Encontrando en la C1 una disminución significativa en los grupos ECI+V+Sham, ECI+T+Sham comparados con el control; para la C2 no se encontraron diferencias y, finalmente para la C3 lo primero que se observa es una disminución significativa de todos los grupos comparados con el control, seguido de una disminución de los grupos ECI+V+Sham, ECI+T+Sham y ECI+T+E comparados con el ECI+V+E y una disminución significativa del grupo ECI+T+Sham comparado con el ECI+T+E (Figura 16).

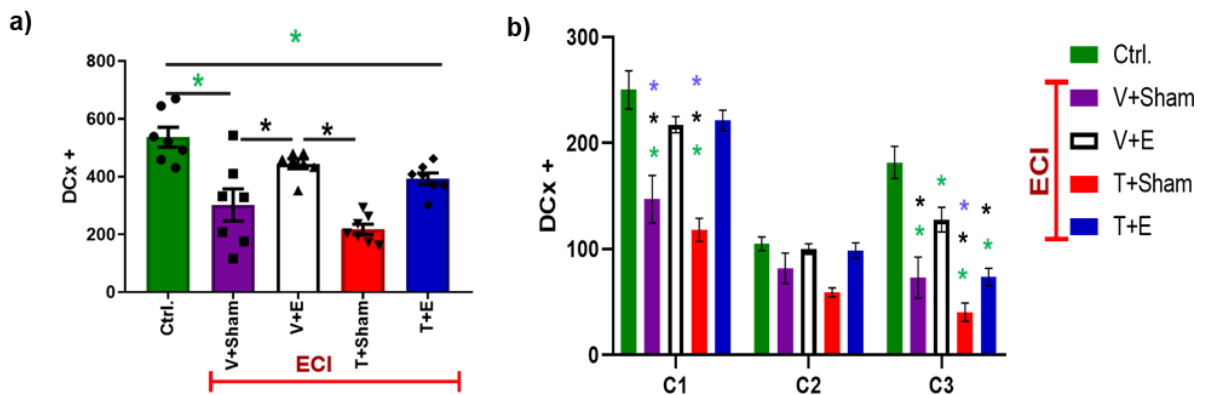


Fig. 15. Células positivas a DCx. a) Número total de células positivas a DCx de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.0001$. ANOVA en rangos, *post hoc* Dunnett $n=7$; b) Clasificación de DCx en C1 (Proliferación), C2 (estadios intermedios) y C3 (Post-mitótica) de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.0001$. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni. $n=7$

Estadios de proliferación (Ki67)

Dados los resultados obtenidos con el análisis de DCx, se procedió a profundizar en el estudio del estadio de proliferación del proceso de neurogénesis con el marcador Ki67, considerando únicamente las del giro dentado. Se encontró una disminución significativa en los grupos ECI+V+Sham y ECI+T+Sham comparados con el control (Figura 17) ($p=0.001$) (ANOVA en rangos, $p=0.001$); esto fue revertido por el grupo ECI+V+E (Figura 17) ($p=0.001$) (ANOVA en rangos, $p=0.001$) y casi revertido por el grupo ECI+T+E comparado con el grupo ECI+T+Sham (Figura 17) ($p=0.001$) (ANOVA en rangos, $p=0.001$).

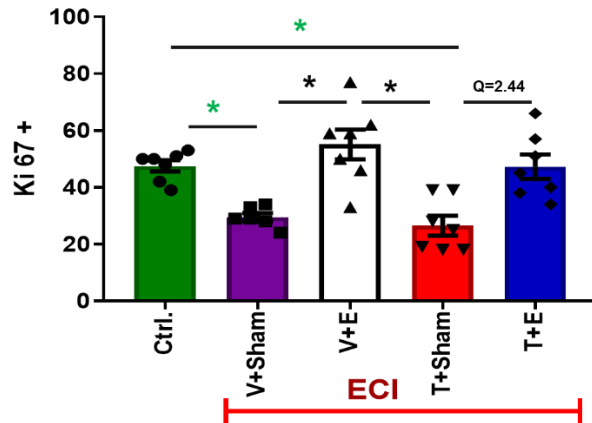


Fig. 17. Total, de células positivas a Ki67. Número total de células positivas a Ki67 de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.0001$. ANOVA en rangos, *post hoc* Dunnet $n=7$

Espinas dendríticas

Para el análisis de las espinas dendríticas, el primer parámetro a considerar fue el número total de espinas en $10\mu\text{m}$ de una dendrita secundaria de una neurona en el giro dentado del hipocampo, considerando 20 dendritas por individuo y finalmente reportando el promedio por cada $10\mu\text{m}$. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron una disminución significativa en los grupos ECI+V+Sham y ECI+T+Sham comparados con el grupo control, ECI+V+E y ECI+T+E (**Figura 17**) ($p=0.001$) (ANOVA de una vía, entre grupos $F_{4,14}=28.474$, $p=0.001$)

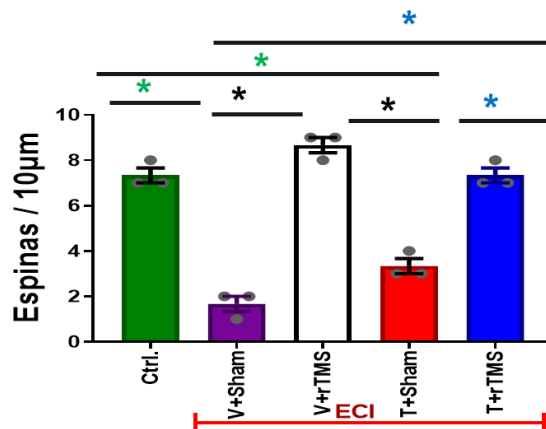


Fig. 18. Total, de espinas en $10\mu\text{m}$. Número total de espinas dendríticas en $10\mu\text{m}$ de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p < 0.0001$. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni. $n=3$.

También se realizó la clasificación por morfometría de las espinas dendríticas. El análisis de varianza de dos vías mostró la interacción entre el factor grupos y tipo ($F_{4,74}=223.591$, $p<0.001$). Empezando con el promedio de cada tipo de espinas dendríticas en $10\mu\text{m}$, donde se observó que en los grupos control, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+E+T hay una mayor cantidad de espinas tipo *mushroom* comparado con las otras clasificaciones (**Figura 18a**). También, se encontró una disminución significativa en el número de espinas tipo mushroom en los grupos ECI+V+Sham y ECI+T+Sham en la clasificación de espina tipo *mushroom* comparados con los grupos control, ECI+V+E y ECI+T+E (**Figura 18a**) (ANOVA de dos vías, espinas x grupo $F_{4,74}=23.903$, $p<0.001$).

Finalmente, se representan los porcentajes de cada clasificación para cada grupo en donde, de manera similar a la gráfica anterior, lo primero que se observa es un porcentaje significativamente mayor de espinas tipo *mushroom* comparado con las otras clasificaciones, en los grupos control, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E (**Figura 18b**) (ANOVA de dos vías, espinas $F_{4,74}=145.024$, $p<0.001$); de igual manera, al comparar entre grupos se encontró un mayor porcentaje de las tipo *mushroom* en los grupos control, ECI+V+E y ECI+T+E comparados con ECI+V+Sham y ECI+T+Sham (**Figura 18b**) (ANOVA de dos vías, espinas x grupo ($F_{4,74}=7.656$, $p<0.001$)).

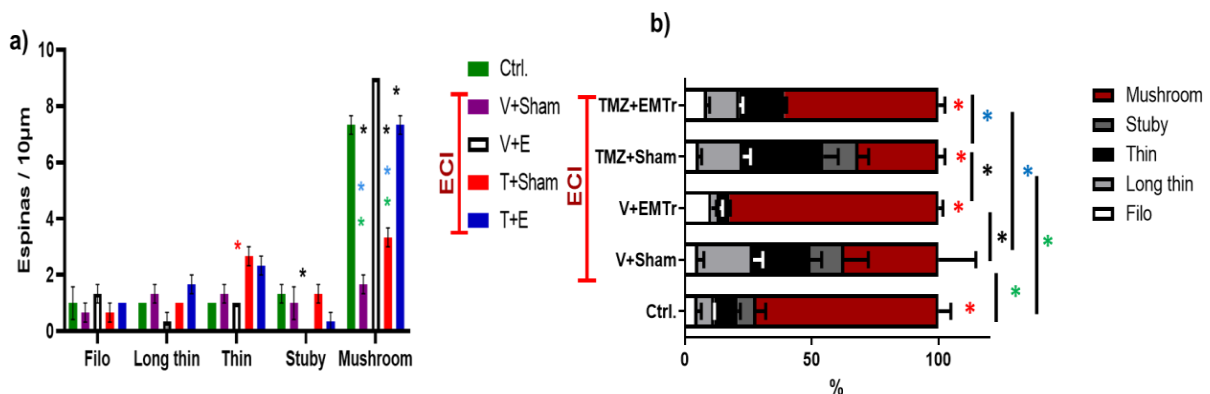


Fig. 18. Clasificación de espinas en $10\mu\text{m}$. a) Número total de espinas dendríticas en $10\mu\text{m}$ en las 6 clasificaciones de los distintos grupos experimentales: Ctrl., ECI+V+Sham, ECI+V+E, ECI+T+Sham y ECI+T+E. * $p<0.0001$. b) Porcentaje de espinas dendríticas en cada clasificación * $p<0.001$ ANOVA de una vía, *pos hoc* Bonferroni. $n=3$

Frotis vaginales

Dado que en nuestro modelo ocupamos ratones hembra por la mayor incidencia en pacientes a presentar depresión, se hicieron frotis vaginales *post mortem* y se identificó en que etapa del ciclo se encontraban (**Figura 19**) donde se observa que en la mayoría de los grupos había al menos un roedor en cada una de las etapas del ciclo estral, exceptuando al grupo control donde no había ninguna en la fase de proestro.

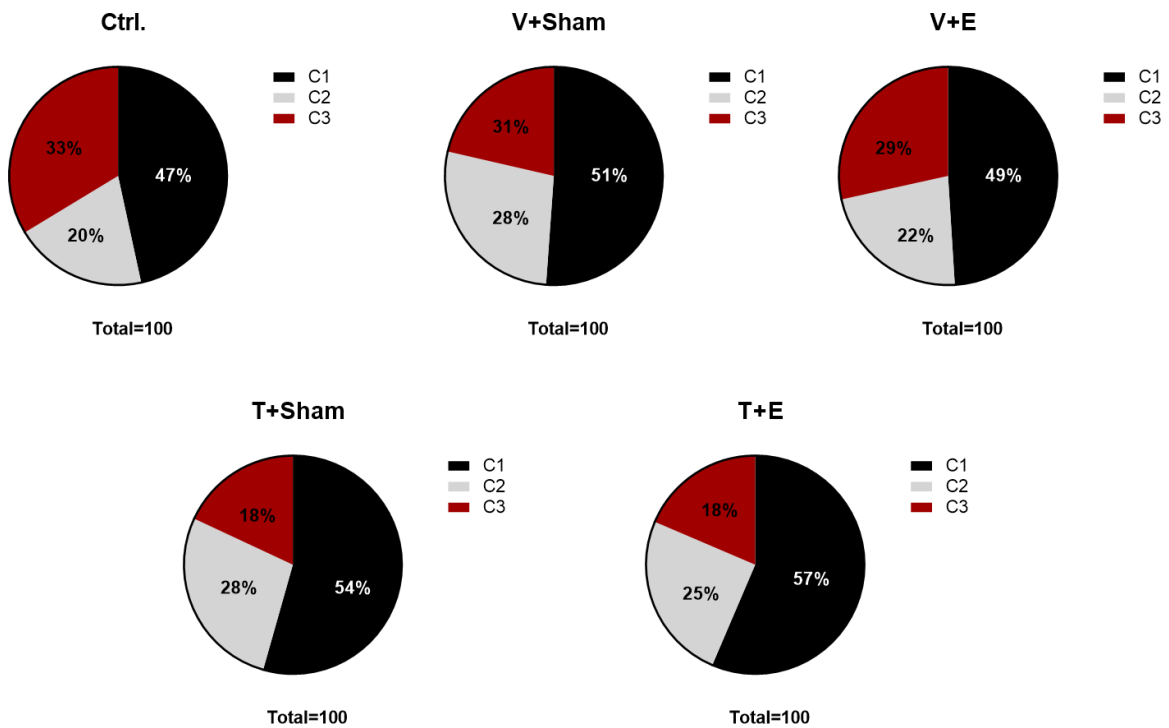


Fig. 19. Frotis vaginales. Porcentaje de ratones en las etapas del ciclo estral de cada grupo.

VII. Discusión

La depresión es uno de los desórdenes afectivos más comunes que en los últimos años se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Dada la complejidad de esta enfermedad, existen muchas formas de intervención farmacológica para disminuir sus síntomas, sin embargo, existe un considerable porcentaje de la población de pacientes que no remite aún con estos tratamientos. Como alternativa a ello, la EMTr ha surgido como un nuevo método para disminuir los síntomas de la depresión, a tal grado que a partir del 2008 la FDA la aprobó como un efectivo tratamiento antidepresivo, sin embargo, se desconoce los mecanismos plásticos por los cuales lleva a cabo su efecto antidepresivo, por lo que en este trabajo se abordan los procesos de remodelación de espinas dendríticas y el proceso de neurogénesis como un posible mecanismo por el cual la EMTr 5Hz lleva a cabo su efecto antidepresivo.

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en la actividad motora

Las alteraciones motoras en los pacientes con depresión se presenta en el 16% de ellos (Pacchiarotti *et al.* 2020). En nuestro trabajo observamos que los resultados obtenidos en la prueba de Rotarod no reflejaron diferencias significativas en ninguno de los grupos, pero lo que sí se puede observar es una alta dispersión de los valores, mientras que en la prueba de campo abierto las diferencias encontradas fueron en el grupo con ECI+NaCl+EMTr a explorar más, pero los demás grupos respecto al control no se encontraron diferencias significativas.

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en conductas ansiosas.

Los trastornos del estado de ánimo, como la depresión y la ansiedad en algunas ocasiones se presentan en comorbilidad, pero cada una tiene su sintomatología particular y no siempre se presentan las dos de manera simultánea, pero dada su comorbilidad el DSM-V ha propuesto una clasificación para ella, siendo la depresión ansiosa, la no ansiosa y los episodios de depresión mayor, en donde se han descrito que los sustratos neurobiológicos de éstas pueden llegar a tener variaciones principalmente en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que en la

depresión ansiosa está más afectado (Choi *et al.* 2020). Esto hace sentido con lo encontrado en la prueba de laberinto elevado en cruz, que es una prueba para medir conductas ansiosas, donde observamos que el protocolo de ECI, ni la administración de TMZ generan conductas ansiosas. Sin embargo, la diferencia reportada es únicamente en el grupo de ECI+NaCl+EMTr comparado con el ECI+Sham+TMZ en el parámetro de pasar más tiempo en los brazos abiertos, pero no es diferente con respecto al control.

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en el proceso de aprendizaje y memoria

Las alteraciones cognitivas forman parte del cuadro clínico del trastorno depresivo mayor, siendo que en pacientes los principales dominios cognitivos afectados son atención, aprendizaje, memoria y funciones ejecutivas, también se ha observado en pacientes con tratamientos antidepresivos que, mejoran su desempeño en estos dominios casi o igual al de las personas sanas (Roca *et al.* 2015), lo cual concuerda con nuestros datos obtenidos en las pruebas de localización de objeto y reconocimiento de objeto novedoso, donde observamos que la aplicación del protocolo de ECI afecta el proceso de aprendizaje y memoria, pero que el tratamiento con EMTr 5Hz es capaz de revertirlo. Nuestros resultados también sugieren que la supresión de la neurogénesis hipocampal con TMZ no afecta este proceso pues en los grupos donde se administró no se observa ninguna diferencia específica de estos grupos.

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en conductas tipo depresivas.

El EP fue evaluado semanalmente durante la exposición al protocolo de ECI, de la administración de TMZ y la aplicación del tratamiento con EMTr 5Hz, este parámetro es un buen indicador de autocuidado, el cual tiene validación farmacológica a través del uso de distintos fármacos antidepresivos (Santarelli *et al.* 2003). En nuestro trabajo, se observó que la exposición constante al estrés deteriora el EP, por otro lado, nuestros datos también demuestran que la EMTr 5Hz es capaz de mejorar las conductas de autocuidado y de revertir el deterioro del EP causado por el ECI, lo que concuerda con otros estudios donde ocupan tratamientos farmacológicos para revertir las alteraciones en el autocuidado provenientes del ECI (Santarelli *et al.*

2003; Tanti *et al.* 2012), y con los obtenidos con la EMTr 5Hz (Meneses-San Juan D., *et al.*, en proceso). Sin embargo, un dato novedoso que aportamos con la administración de TMZ es que en las primeras dos semanas del tratamiento con EMTr 5Hz en el grupo ECI+EMTr+TMZ no se observaba un mejoramiento significativo en la calidad del EP, sin embargo, al final de las cuatro semanas ya era posible observar el efecto de la EMTr, lo cual podría sugerir que la supresión de la neurogénesis no tendría un papel determinante en el parámetro de autocuidado que se evalúa con el EP.

La anhedonia puede ser definida como la falta de capacidad para experimentar placer y puede ser asociada con la apatía y la ausencia de satisfacción ante estímulos placenteros (Grillo 2016). La anhedonia es uno de los principales síntomas de la depresión mayor, para evaluar esta característica de la depresión en nuestro modelo, nosotros utilizamos la prueba de “acicalamiento artificial” también conocida como “Splash test”, la cual considera la disminución del tiempo y episodios de acicalamiento como un indicador de la pérdida de interés de actividades placenteras. En nuestros resultados encontramos que la exposición constante al estrés induce anhedonia, esto se ve reflejado en una disminución en el tiempo y episodios de acicalamiento por parte de los grupos con ECI que no recibieron tratamiento con EMTr lo cual es consistente con lo reportado previamente por el equipo de trabajo de Tanti (Tanti *et al.* 2012) y Meneses-San Juan (Meneses-San Juan D., *et al.*, en proceso); pero, de manera interesante la administración de TMZ en el grupo de ECI+EMTr+TMZ está dificultando, en pequeña escala, el efecto de la EMTr siendo que en el parámetro de tiempo de acicalamiento no llega a ser significativo, como sí lo es en el grupo ECI+EMTr+NaCl, esto podría sugerir que el proceso de neurogénesis en el tratamiento con EMTr 5Hz pudiera tener un papel relevante para las conductas de anhedonia y apatía.

La desesperanza es una conducta generada en modelos animales, análoga a la abulia en la depresión, es decir la pérdida de voluntad característica de pacientes con esta enfermedad. En este trabajo, se utilizó la prueba de NF para evaluar este comportamiento; los resultados obtenidos de ello apuntan a que el ECI induce desesperanza (Nollet, *et al.* 2013), que es revertida por el tratamiento con EMTr 5Hz (Peng *et al.* 2018; Meneses-San Juan *et al.*, en proceso). De igual manera,

observamos que la administración de TMZ no permite al tratamiento con EMTr 5Hz llevar a cabo su efecto antidepresivo como lo hace en el grupo de ECI+EMTr+NaCl, lo cual nos sugiere fuertemente que el proceso de neurogénesis tiene un rol importante para que la EMTr lleve a cabo su efecto antidepresivo.

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en la supervivencia de nuevas células en el giro dentado del hipocampo.

La supervivencia de nuevas células en el giro dentado del hipocampo y derivadas del tratamiento con EMTr 5Hz, se observa gracias a la administración de un análogo de la timidina que se adhiere a ella cuando la célula está en la replicación de ADN en el ciclo celular, en nuestro caso se ocuparon dos el CldU a la par de la administración de TMZ para observar el efecto del fármaco en la tasa de división y supervivencia celular, encontrando que el protocolo de ECI disminuye la supervivencia en todos los grupos (Lucassen *et al.*,2016) y que la administración de TMZ la disminuye aún más (Garthe *et al.*, 2009); por otro lado la administración del IdU que se inyectó a la par de las primeras tres sesiones del tratamiento con EMTr 5Hz, encontrando que la aplicación del protocolo de ECI disminuye la supervivencia de estas nuevas neuronas, con respecto al control y que el tratamiento con EMTr 5Hz revierte el efecto del protocolo de ECI, lo cual había sido sugerido en diversos estudios donde se reporta el papel de la neurogénesis en modelos de ECI y que son tratados tanto con fármacos (Park, 2019) y con EMTr a 5Hz (Meneses-San Juan *et al.*, en proceso).

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en los estadios intermedios de la neurogénesis evaluado con la DCx y estadios de proliferación con Ki67

Por su parte los estadios intermedios del proceso de neurogénesis, se observó que en el total de las células positivas a este marcador, pareciera que la administración de TMZ no impidió que la EMTr tuviera efecto en este proceso, esto probablemente debido a que la administración del fármaco después de cuatro meses, ya no estaba actuando a este nivel, por ello, resulto importante hacer un análisis de acuerdo a la clasificación de las ramificaciones dendríticas, donde se encontró de manera

interesante que la TMZ estaba afectando principalmente a células en estadios post-mitóticos más que estadios de proliferación, por lo que probablemente esta disminución en la maduración de estas nuevas células esté relacionado con los efectos antidepresivos de la EMTr, dado que los estadios de maduración de la neurogénesis se han correlacionado con la disminución de conductas tipo depresivas (Ma. *et al.*, 2017; Snyder *et al.*, 2011) Sí bien, este dato apoya nuestra hipótesis de que la neurogénesis es un mecanismo importante para que la EMTr lleve a cabo su efecto antidepresivo, serían los estadios post- mitóticos en los que actúa la EMTr para lograr este efecto, pero los estadios previos como los de proliferación, no se vieron afectados por el fármaco, pero sí favorecidos con la EMTr, por lo que se procedió a hacer el análisis con un marcador específico para estadios de proliferación que fue el Ki67 donde se observó de manera similar que, con la DCx, que la administración de la TMZ ya no afecta a estos estadios, dado el tiempo que ha pasado desde su administración hasta su análisis (0) y por su parte la EMTr revierte parcialmente las alteraciones provenientes de la TMZ, pues se había reportado previamente que la EMTr favorece diferentes etapas del proceso de neurogénesis dentro de las que están los estadios intermedios y de proliferación (Meneses-San Juan *et al.*, en proceso).

Efecto del ECI, el tratamiento con EMTr 5hz y la supresión de la neurogénesis hipocampal en la remodelación de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo.

La depresión está estrechamente asociada con alteraciones en la morfología y densidad de las espinas dendríticas. De manera general, se ha descrito que los modelos de depresión causan atrofia dendrítica, así como pérdida en las espinas dendríticas tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal (Qiao *et al.* 2016) lo cual concuerda con lo que encontramos, pues nuestro protocolo de ECI disminuye la cantidad de espinas, lo cual es revertido por el tratamiento con EMTr 5Hz.

Por su parte la clasificación en las seis morfologías como un indicador del estado de madurez y funcionalidad de las espinas, se utilizó la metodología descrita por Risher (Risher *et al.* 2014), pues se ha demostrado que los protocolos con ECI atrofian las espinas dendríticas así como una disminución de la conectividad de

circuitos del sistema límbico (Leuner & Shors, 2014), lo cual es consistente con nuestros datos donde observamos que los grupos con ECI y sin tratamiento antidepressivo, no solo tienen un menor número de espinas sino que dentro de la clasificación, hay un menor número de espinas tipo *mushroom* que son el tipo de espina considerada funcional para recibir transmisión sináptica, comparado con el control y con los grupos tratados con EMTr 5Hz (Rocha-Martínez *et al.*, en proceso). Además, observamos que la administración de TMZ no está afectando el proceso de remodelación dendrítica en el giro dentado del hipocampo, lo cual hace sentido, dado que el mecanismo de acción de la TMZ es sobre células que están en ciclo celular (Schreck, 2018) mientras que la técnica de impregnación de metales pesados de Golgi Cox es en neuronas ya maduras (Du, 2019). Finalmente, existe una amplia literatura que describe las diferencias por sexo que hay en la remodelación dendrítica en protocolos de estrés (Galea *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2009), donde reportan que es más complicado observar esta disminución en la densidad dendrítica por el papel neuroprotector de las hormonas, sin embargo, eso no quiere decir que los protocolos de estrés no tengan efecto en las dendritas, en el hipocampo se ha descrito que se generalizan ciertos factores derivados del estrés y que no ocurren, necesariamente, diferentes dependiendo el sexo, sino que están en diferentes grados (Leuner & Shors, 2014).

VIII. Conclusión:

Hasta este punto se ha demostrado la eficacia del tratamiento antidepresivo con EMTr 5Hz en un modelo de ECI, pero que esta no se observa de manera clara en la presencia de la TMZ dado que parece que la presencia del fármaco está dificultando que la EMTr revierta conductas asociadas con la desesperanza y anhedonia, pero que no interfiere en que se reviertan las alteraciones en conductas de autocuidado y en procesos cognitivos, y al relacionarlo con la supervivencia de nuevas células en el giro dentado del hipocampo donde también se encontró que la presencia de la TMZ impide el efecto del tratamiento con EMTr a 5Hz, de manera similar con los estadios intermedios de la neurogénesis se observó que la TMZ afectaba principalmente a los estadios post-mitóticos y que estos están muy relacionados con la disminución de conductas tipo depresivas, lo cual observamos en nuestras pruebas para evaluar desesperanza y anhedonia; pero que el fármaco no estaría afectando estadios de proliferación que marcamos con la proteína doblecortina. Finalmente, en los análisis morfométricos de las espinas dendríticas donde la presencia de TMZ no afecta su densidad ni estado de maduración, observamos una similitud con las conductas para evaluar el proceso de aprendizaje y memoria por lo que estos procesos podrían no ser directamente dependientes de la neurogénesis, pero sí de otros mecanismos de la neuroplasticidad en el hipocampo, como es la maduración de espinas dendríticas.

IX. Referencias:

- Altman J, Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Armas-Castañeda, G., Ricardo-Garcell, J., Romo-Nava, F., Heinze-Martin, G., & González-Olvera, J. J. (2015). Transcranial Magnetic Stimulation: antidepressant efficacy and three-month follow-up. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, 8(2), 343.
- Baptista, P. y Andrade, J. (2018) Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Frontiers in Neuroanatomy*. 12(44): 2546-2561.
- Benjet, Corina, Dra Psicol, and Guilherme Borges. 2004. "La Depresión Con Inicio Temprano Prevalencia, Curso Natural y Latencia Para Buscar Tratamiento" 46 (5): 417–24.
- Brandt, M. D., S. Jessberger. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24(3): 603-613.
- Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya AC. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules*. 2011 Sep 15;16(9):7980-93. doi: 10.3390/molecules16097980
- Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, Terskikh AV. (2013). SOX2–LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 110: E3017-E26.
- Choi KW, Kim YK, Jeon HJ. Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1191:219-235. doi: 10.1007/978-981-32-9705-0_14.
- Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr*. 2017 Jun;27:101-111. doi: 10.1016/j.ajp.2017.01.025. Epub 2017 Jan 29.
- Díaz VBA, González GC. (2012). Actualidades en neurobiología de la depresión. *Rev Latinoam Psiquiatría*.;11(3):106-115.
- Dioli, C. *et al.* (2019). Chronic stress triggers divergent dendritic alterations in

immature neurons of the adult hippocampus , depending on their ultimate terminal fields. *Transl. Psychiatry* doi:10.1038/s41398-019-0477-7

- Dominguez, M. I., J. M. Blasco-Ibanez. (2003). Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 966(2): 206-217.
- Duan, Lishu y Peng, Chian-Yu y Pan, Liuliu y Kessler, John. (2015). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Radial Glia Recapitulate Developmental Events and Provide Real-Time Access to Cortical Neurons and Astrocytes. *Stem cells translational medicine*. 4. 10.5966/sctm.2014-0137.
- Duman, C. H. & Duman, R. S. (2014). Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci. Lett.* 601, 20–29
- Du F. Golgi-Cox Staining of Neuronal Dendrites and Dendritic Spines With FD Rapid GolgiStain™ Kit. *Curr Protoc Neurosci*. 2019 Jun;88(1):e69.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*; 25:10074–86
- FDA. 2011. “Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Class II Special Controls Guidance Document: Electrocardiograph Electrodes,” 1–15.
- Fortin, K. Agster, H. Eichenbaum, Critical role of the hippocampus in memory consequences of events, *Nat. Neurosci.* 5 (5) (2002) 458–462
- Friedman HS, Kerby T, Calvert H. (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul;6(7):2585-97
- Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS (1997) Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 81:689–697.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*. 2009;4(5):e5464. doi: 10.1371/journal.pone.0005464. Epub 2009 May 7. PMID: 19421325
- Ge, S., Goh, E.LI Sailor, K.A., Kitabatake, U., Ming, G.L., Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-583.

- Hansen, R A, G Gartlehner, K N Lohr, B N Gaynes, and T S Carey. 2005. "Efficacy and Safety of Second-Generation Antidepressants in the Treatment of Major Depressive Disorder." *Ann.Intern.Med* 143 (1539–3704 (Electronic)): 415–26.
- Hill AS, Sahay A, Hen R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Sep;40(10):2368-78. doi: 10.1038/npp.2015.85. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25833129
- Hummel F, Celnik P, Giroux P, Floel A, Wu W-H, Gerloff C, Cohen LG: Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. *Brain* 2005, 128(Pt 3):490–499
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenber, G. (2004). Milestones of neural development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27, 447-252.
- Kempermann G., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg. (2014) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus, *Trends Neurosci*. 27 447–452
- Kempermann, G. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Neurosci*. 2012; 13:727-36
- Klomjai, Wanalee, Rose Katz, and Alexandra Lackmy-Vallée. 2015. "Basic Principles of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) and Repetitive TMS (RTMS)." *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 58 (4). Elsevier Masson SAS: 208–13. doi:10.1016/j.rehab.2015.05.005.
- Kim HS. (2014). PSA-NCAM+ Neural Precursor Cells from Human Embryonic Stem Cells Promote Neural Tissue Integrity and Behavioral Performance in a Rat Stroke Model. *Stem Cell Rev*; 10: 761-771.
- Knierim, The hippocampus, *Curr. Biol.* 25 (23) (2015) R1116–R1121
- Leuner B, Shors TJ. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience*. 2013 Oct 22;251:108-19. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.021. Epub 2012 Apr 20. PMID: 22522470.
- Little, Alison. 2009. "Treatment-Resistant Depression." *American Family Physician* 80 (2): 167–72. doi:10.1136/thx.2008.108217.
- Luan D, Zhao MG, Shi YC, Li L, Cao YJ, Feng HX, Zhang ZJ. Mechanisms of repetitive transcranial magnetic stimulation for anti-depression: Evidence from

preclinical studies. *World J Psychiatry*. 2020 Oct 19;10(10):223-233.

- Lucassen, P. J., Oomen, C. A., Schouten, M., Encinas, J. M., & Fitzsimons, C. P. (2016). Chapter 8 - Adult Neurogenesis, Chronic Stress and Depression. In J. J. B. T.-A. N. in the H. Canales (Ed.) (pp. 177–206). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801977-1.00008-8>
- Luo Y, Kuang S, Xue L, Yang J. The mechanism of 5-lipoxygenase in the impairment of learning and memory in rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav*. 2016 Dec 1;167:145-153. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.010. Epub 2016 Sep 14.
- Ma Z, Zang T, Birnbaum SG, Wang Z, Johnson JE, Zhang CL, Parada LF. TrkB dependent adult hippocampal progenitor differentiation mediates sustained ketamine antidepressant response. *Nat Commun*. 2017 Nov 21;8(1):1668. doi: 10.1038/s41467-017-01709-8.
- Madsen TM, Kristjansen PEG, Bolwig TG, Wörtwein G (2003) Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119(3):635–642
- Maramis, M. M., Mahajudin, M. S., & Khotib, J. (2021). Impaired Cognitive Flexibility and Working Memory Precedes Depression: A Rat Model to Study Depression. *Neuropsychobiology*, 80(3), 225–233. <https://doi.org/10.1159/000508682>
- Markakis, E. A., Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 406, 449-460.
- Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, Tirone F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull*. 2018 Oct;143:181-193. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.09.002. Epub 2018 Sep 17.
- McLaughlin KJ, Baran SE, Conrad CD (2009) Chronic stress- and sex-specific neuromorphological and functional changes in limbic structures. *Molec Neurobiol* 40:166–18
- Nacher, J., J. M. Blasco-Ibanez. (2002). Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 930(1-2): 1-11

- Nestler, Eric J, Michel Barrot, Ralph J Dileone, Amelia J Eisch, Stephen J Gold, and Lisa M Monteggia. 2002. "Neurobiology of Depression (Review Summaries)" 34: 13–25.
- Nishiyama J. Plasticity of dendritic spines: Molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019 Sep;73(9):541-550. doi: 10.1111/pcn.12899. Epub 2019 Jul 8
- Nollet, Mathieu, Anne-Marie Le Guisquet, and Catherine Belzung. 2013. "Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice." *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna (Editor-in-Chief) ... [et Al.]* Chapter 5 (June): Unit 5.65. doi:10.1002/0471141755.ph0565s61.
- OMS. (1982). NNeuroplasticidad
- Overstreet, Wadiche, L., Bromberg, D. A., Bensen, A. L., Westbrook, G. L., (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus *J Neurophysiol*, 94, 4528-4532.
- Pacchiarotti I, Kotzalidis GD, Murru A, Mazzarini L, Rapinesi C, Valentí M, Anmella G, Gomes-da-Costa S, Gimenez A, Llach C, Perugi G, Vieta E, Verdolini N. Mixed Features in Depression: The Unmet Needs of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition. *Psychiatr Clin North Am*. 2020 Mar;43(1):59-68. doi: 10.1016/j.psc.2019.10.006. Epub 2019 Nov 28.
- Park SC. Neurogenesis and antidepressant action. *Cell Tissue Res*. 2019 Jul;377(1):95-106. doi: 10.1007/s00441-019-03043-5. Epub 2019 Jun 4.
- Peng Z, Zhou C, Xue S, Bai J, Yu S, Li X, Wang H, Tan Q. Mechanism of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Depression. *Shanghai Arch Psychiatry*. 2018 Apr 25;30(2):84-92.
- Philip NS, Ridout SJ, Albright SE, Sanchez G, Carpenter LL. 5-Hz Transcranial Magnetic Stimulation for Comorbid Posttraumatic Stress Disorder and Major Depression. *J Trauma Stress*. 2016 Feb;29(1):93-6. doi: 10.1002/jts.22065. Epub 2016 Jan 7.

- Planchez B, Surget A, Belzung C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J Neural Transm (Vienna)*. 2019 Nov;126(11):1383-1408. doi: 10.1007/s00702-019-02084-y. Epub 2019 Oct 4.
- Pohar R, Farrah K. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Patients with Depression: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness and Guidelines – An Update [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2019 Jun 28.
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*, 7, 77. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-7-77>
- Qiao H, Li MX, Xu C, Chen HB, An SC, Ma XM. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast*. 2016;2016:8056370. doi: 10.1155/2016/8056370. Epub 2016 Jan 10.
- Ramírez-Rodríguez GB, Olvera-Hernández S, Vega-Rivera NM, Ortiz-López L. Melatonin Influences Structural Plasticity in the Axons of Granule Cells in the Dentate Gyrus of Balb/C Mice. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 25;20(1):73
- Reyes-López J, Ricardo-Garcell J, Armas-Castañeda G, García-Anaya M, Arango-De Montis I, González-Olvera JJ, Pellicer F. Clinical improvement in patients with borderline personality disorder after treatment with repetitive transcranial magnetic stimulation: preliminary results. *Braz J Psychiatry*. 2018 Jan-Mar;40(1):97-104. doi: 10.1590/1516-4446-2016-2112. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28614492; PMCID: PMC6899410.
- Ridding, Michael C., and John C. Rothwell. 2007. "Is There a Future for Therapeutic Use of Transcranial Magnetic Stimulation?" *Nature Reviews Neuroscience* 8 (7): 559–67. doi:10.1038/nrn2169.
- Risher WC, Ustunkaya T, Singh Alvarado J, Eroglu C. Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One*. 2014 Sep 10;9(9):e107591. doi: 10.1371/journal.pone.0107591. PMID: 25208214; PMCID: PMC4160288

- Roca M, Vives M, López-Navarro E, García-Campayo J, Gili M. Cognitive impairments and depression: a critical review. *Actas Esp Psiquiatr*. 2015 Sep;43(5):187-93. Epub 2015 Sep 1
- Rosenblat JD, Kakar R, McIntyre RS. The Cognitive Effects of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015 Jul 25;19(2):pyv082. doi: 10.1093/ijnp/pyv082. Erratum in: *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016 Apr 27;: PMID: 26209859; PMCID: PMC4772818.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9.
- Schreck KC, Grossman SA. Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System. *Oncology (Williston Park)*. 2018 Nov 15;32(11):555-60, 569.
- Schulze-Rauschenbach Loo, Colleen K., and Philip B. Mitchell. 2005. "A Review of the Efficacy of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) Treatment for Depression, and Current and Future Strategies to Optimize Efficacy." *Journal of Affective Disorders* 88 (3): 255–67. doi:10.1016/j.jad.2005.08.001.
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476(7361), 458–461.
- Song, Hongjun y Stevens, Charles y Gage, Fred. (2002). Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39-44. Soriano E, Frotscher M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res*, 503, 170–74.
- Tuttle AH, Rankin MM, Teta M, Sartori DJ, Stein GM, Kim GJ, Virgilio C, Granger A, Zhou D, Long SH, Schiffman AB, Kushner JA. Immunofluorescent detection of

two thymidine analogues (CldU and IdU) in primary tissue. *J Vis Exp*. 2010 Dec 7;(46):2166. doi: 10.3791/2166.

- Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, Yamamoto M, Kawaguchi S, Ishii R, Shinosaki K. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2011 Feb;65(1):77-81.
- Wan, Deborah. 2012. "A Global Crisis." World Federation of Mental Health, 1–32.
- Willner, Paul, Richard Muscat, and Mariusz Papp. 1992. "Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/S0149-7634(05)80194-0.
- Willner Nollet, Mathieu, Anne-Marie Le Guisquet, and Catherine Belzung. 2013. "Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice." *Current Protocols in Pharmacology*, no. June: 1–17. doi:10.1002/0471141755.ph0565s61.
- World Health Organization. 1992. "The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders." *International Classification 10*: 1–267. doi:10.1002/1520-6505(2000)9:5<201::AID-EVAN