



**UNAM UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**APROXIMACIONES PARA UN NUEVO TRATAMIENTO  
ANTIDEPRESIVO EN UN MODELO ANIMAL DE  
DEPRESIÓN**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

QUE PRESENTA

**CARMEN DANIELA FRANCIA RAMÍREZ**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. SALVADOR LEONARDO HERNÁNDEZ LÓPEZ**

REVISOR

**DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO**

SINODALES

**DRA. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN**

**DR. ÓSCAR VLADIMIR ORDUÑA TRUJILLO**

**MTRO. JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ SANTOS**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD., MX., 2025**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

*A Dios; por permitirme culminar esta etapa e iniciar una nueva. Que nunca me falte la gratitud hacia Ti y el deseo de entregarte mi vida por completo.*

*A mis padres, Carmen y Antonio; por su dedicación y sacrificio que me han permitido llegar hasta aquí. Por su amor incondicional y apoyo constante, que han sido la base de la confianza en mí misma. Gracias por guiarme con su ejemplo de fe y mostrarme lo que significa vivir una vida plena en el Señor.*

*A mi hermano, Pablo; mi principal alentador y compañero en mis sueños. Gracias por creer en mí cuando yo no lo hice, prometo acompañarte en cada una de tus metas y anhelos, ¡espero un día llegar a ser como tú!*

*A toda mi familia, Ramírez Rodríguez y Francia Zúñiga; por sus constantes muestras de cariño, confianza y ejemplos de fortaleza y esperanza que han dejado en mí. Su amor ha sido un refugio y una inspiración en mi vida.*

*A mis amigos, Miguel y Karen, quienes me han acompañado en los momentos buenos y no tan buenos de los últimos 10 años de mi vida. No hay duda de que encontrar su amistad ha sido un verdadero tesoro.*

*A mi amiga y mentora a lo largo de este caminar en el mundo de la investigación, Andrea Mondragón; por tu paciencia, confianza y constante impulso a superarme. Admiro tu fortaleza y anhelos a siempre ser mejor. Sigue siendo una inspiración para los que te rodean, tal como lo has sido para mí. Te deseo todo el éxito en esta nueva etapa de tu vida.*

*A mi mentor y amigo, Enrique Ramírez; por ser un ejemplo de dedicación y ambición. Tu confianza, paciencia y honestidad han sido fundamentales para mi crecimiento. Tu esfuerzo y determinación han sido y seguirán siendo una inspiración para todos los que vamos iniciando en el mundo de la ciencia. Espero un día alcanzar el nivel de entrega que tienes.*

*A los doctores, Salvador Hernández y Julieta Garduño; que me brindaron la oportunidad de crecer en su laboratorio y compartir conmigo su conocimiento. Al igual que a todo el laboratorio de electrofisiología de la Facultad de Medicina, por compartir sus conocimientos y acompañarme durante esta etapa.*

Agradecimiento a DGAPA-PAPIIT por el financiamiento del proyecto IN207423 del Dr. Salvador L. Hernández López.

Este trabajo es una extensión del proyecto de doctorado la Mtra. Andrea Mondragón García que lleva por título "*Estudio de los efectos antidepresivos de la Mecamilamina en el Núcleo Dorsal del Rafé*".

*“La sabiduría verdadera se demuestra con el ejemplo, no solo con palabras.” – San Gregorio Magno.*

## Índice

Agradecimientos .....	2
<b>Capítulo 1</b> .....	7
Antecedentes .....	7
<b>Capítulo 2</b> .....	11
Marco Teórico .....	11
2.1 El sistema serotoninérgico y la depresión .....	11
2.2.- Núcleo dorsal del rafe .....	12
2.3 Receptores Nicotínicos .....	13
2.4 Mecamilamina .....	16
2. 5 Planteamiento del problema .....	18
2.6 Justificación .....	19
2.7 Hipótesis .....	20
2.8 Objetivos .....	21
<b>Capítulo 3</b> .....	22
Materiales y Métodos .....	22
Capítulo 4 .....	26
Resultados .....	26
<b>Capítulo 5</b> .....	38
Discusión .....	38
Capítulo 6 .....	41
Conclusiones .....	41
Referencias .....	42

## Resumen

El Trastorno Depresivo Mayor (TDM) es uno de los trastornos del estado del ánimo más comunes y de las principales causas de discapacidad, afectando a 280 millones a nivel mundial. Este estudio investigó el efecto del enantiómero S-mecamilamina (S-mec) como posible herramienta terapéutica para el TDM, enfocándose en su capacidad para modular la actividad neuronal en el núcleo dorsal del rafe (NDR) y reducir conductas tipo depresivas en un modelo animal de estrés crónico impredecible (ECI).

En los experimentos electrofisiológicos, realizados mediante la técnica de patch clamp, se evaluó la actividad neuronal en el NDR. Los resultados mostraron que S-mec (3 $\mu$ M) incrementó la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas (5-HT). Este efecto estuvo mediado por los receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  de alta sensibilidad, que regulan la liberación de glutamato en el NDR.

Posteriormente, para la evaluación del efecto antidepresivo del enantiómero S-mec, se utilizaron ratas Wistar sometidas a una batería de ECI, a las cuales se les administraron S-mec y el agonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  de alta sensibilidad, TC-2559. Las pruebas incluyeron campo abierto, nado forzado y preferencia de sacarosa. Los resultados mostraron que la combinación de S-mec y TC-2559 redujo significativamente las conductas tipo depresivas y ansiosas, mejorando parámetros como escalamiento en la prueba de nado forzado y el consumo de sacarosa, asociado a la disminución de conductas tipo anhedonia.

Estos hallazgos sugieren la combinación de S-mec y TC-2559 como una alternativa terapéutica innovadora para el TDM. Sin embargo, se requiere mayor investigación para confirmar su eficacia clínica y validar este enfoque como tratamiento complementario.

# Capítulo 1

## Antecedentes

El Trastorno Depresivo Mayor (TDM) es descrito por la Asociación Americana de Psicología (2017) como uno de los desórdenes del estado de ánimo más comunes. Según el Manual de Diagnóstico de Trastornos Mentales en su edición 5, los principales síntomas que una persona con depresión mayor exhibe son:

- Estado de tristeza la mayor parte del día.
- Disminución del interés o placer por actividades (anhedonia).
- Pérdida de peso significativa, sin hacer dieta.
- Insomnio o hipersomnia.
- Agitación o retraso psicomotor identificado por otros.
- Fatiga o pérdida de energía.
- Sentimiento de inutilidad o culpabilidad excesiva.
- Disminución para la capacidad de pensar o concentrarse.
- Pensamiento de muerte recurrente.

Para poder ser diagnosticado como TDM, al menos 5 de estos síntomas deben presentarse y tener una duración promedio de 2 semanas (American Psychiatric Association, 2013).

A nivel mundial, este trastorno afecta al 3.8% de la población, con un aproximado de 280 millones de personas. Su consecuencia más severa es el suicidio, que es la cuarta causa de muerte en personas de 15 a 29 años de edad (WHO, 2021). En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud Pública (2023), el 5.3% de la población vive con depresión, siendo la primera causa de discapacidad en mujeres y la novena causa en hombres. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica, al menos 9.2% de la población mexicana ha experimentado depresión a lo largo de su vida.

Además de la alta prevalencia, el TDM implica un impacto significativo en la salud física y social de quienes viven con este trastorno. Se ha registrado que los individuos que viven con depresión presentan una mayor tasa de comorbilidad de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, lo que afecta su desarrollo en ambientes escolares, laborales y sus relaciones personales (Marx et al., 2023). Este trastorno también está asociado con factores de riesgo genéticos, inmunológicos, ambientales o bien, la combinación de estos tres factores. La función irregular del sistema inmunológico se ha relacionado con la depresión, ya que se han identificado algunos decrementos de este sistema y la presencia TDM, como es la disminución

de la respuesta adaptativa del sistema inmunológico, un incremento de células inmunológicas, un incremento de respuesta autoinmune y un aumento de la actividad de la microglía (Drevets et al., 2022). Tras realizar estudios asociados al genoma, se identificaron ciertos genes relacionados a la depresión, como ZNF584 en el hipocampo, LINC01252 en la corteza cerebral, AP004609.3 en la amígdala cerebral, al igual que ciertos genes involucrados en el sistema monoaminérgico (Won y Ham, 2016, Singh et al., 2024). Por último, los factores ambientales, como lo son vivir en países con guerras, delincuencia, violencia de género, carencia de servicios de salud, entre otros, también son factores que predisponen al desarrollo del TDM (Lara et al. 2017; Marx et al., 2023).

Las personas que viven con TDM enfrentan un impacto significativamente mayor del estrés en comparación con aquellas sin este trastorno, esto refuerza la vulnerabilidad de este grupo ante las problemáticas cotidianas (Erritzoe et al., 2022). El estrés es la respuesta adaptativa que tiene el organismo ante una amenaza, ya sea real o imaginaria (Erritzoe et al., 2022). La constante exposición a estresores ha sido relacionada con un incremento en la probabilidad de desarrollar depresión. El estrés también puede provocar alteraciones en el sistema inmunológico, sistema cardiovascular, problemas metabólicos y neuronales, donde la plasticidad neuronal y glial, disminuye (Dale et al., 2015, Sheng et al., 2021). Se ha visto que circuitos neuronales involucrados en el estrés trabajan de manera distinta en personas con TDM, lo cual provoca una hiperactividad ante estímulos amenazantes, un pobre manejo del estrés y un escaso manejo de estados emocionales internos y ambientales. A pesar de la gran variabilidad de TDM, la hiperactividad del eje del estrés puede desencadenar cambios extremos de emociones como permanecer en un estado negativo la mayor parte del tiempo, síntoma característico en pacientes con depresión (McEwen y Akil, 2020).

Uno de los principales circuitos activados durante el estrés es el eje neuroendocrino Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), en el cual participan 3 estructuras: el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), la glándula pituitaria y la glándula renal. Este eje comienza en el NPV, el cual sintetiza y secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), ante estos niveles de CRH, la glándula pituitaria estimula la síntesis de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) al torrente sanguíneo. Ésta al llegar a la glándula adrenal sintetiza glucocorticoides, los cuales se unen a sus receptores para promover la respuesta ante el estrés. Es a través estas mismas hormonas que se establece un mecanismo de regulación basado en la

retroalimentación negativa. Sin embargo, se ha observado que, ante una constante liberación de estas hormonas y la sobreactivación de este eje, se puede inducir un estado patológico en el individuo, frecuentemente resultando en depresión (Mineur et al., 2013; Oyola y Handa, 2017; Sheng et al., 2021)

Ante los distintos factores del TDM, es importante entender los mecanismos que lo conforman. Dentro de las diversas hipótesis neurobiológicas para explicar este trastorno se encuentra aquella que propone que la depresión se debe a una desregulación de sistemas monoaminérgicos, como la dopamina (DA), norepinefrina (NE) y en particular de la serotonina (5-HT), planteando que la concentración de estos neurotransmisores influye en la presencia de síntomas depresivos. El mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos sustenta esta hipótesis, ya que su principal mecanismo de acción se enfoca en incrementar los niveles de concentración de estos neurotransmisores. Estos fármacos son los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO), los tricíclicos (TCA) y los inhibidores de la recaptura de serotonina (SSRI) (Cosci y Chouinard, 2019; Lee y Cho, 2021). Es importante recalcar que los tratamientos farmacológicos van de la mano con las terapias psicológicas, ya que se ha observado que el porcentaje de recaída es menor a diferencia de solo terapia farmacológica y su efecto terapéutico se mantiene aún terminado el tratamiento (McCarron et al., 2021).

El mecanismo de acción de los IMAO es bloquear la actividad de la enzima monoaminoxidasa encontrada en terminales nerviosas, la cual es la encargada de degradar neurotransmisores como la DA, 5-HT y NE; el bloqueo de la enzima permite que la concentración de estos neurotransmisores sea mayor en la hendidura sináptica (Hillhouse y Porter, 2015). El mecanismo de los TCA es inhibir la recaptura de los neurotransmisores 5-HT y NE en las terminales presinápticas, y así incrementar sus niveles en la hendidura sináptica, algunos de estos fármacos son la amitriptilina, amoxapina y desipramina. La actual primera línea de tratamiento para el TDM son los inhibidores de la recaptura de 5-HT o NE (SSRI-NSRI). Su mecanismo de acción es bloquear selectivamente el transportador de la 5-HT (SERT) en la terminal presináptica. Este mecanismo evita la recaptura de 5-HT y eleva la concentración de 5-HT en la hendidura sináptica lo que prolonga su acción sobre los receptores postsinápticos. Algunos de estos fármacos son citalopram, fluoxetina, paroxetina, escitalopram, duloxetina, venlafaxina, desvenlafaxina (Chu y Wadhwa, 2023).

Los SSRI son igualmente ocupados como primera línea de tratamiento para la ansiedad, sin embargo, su efecto antidepresivo y ansiolítico se observan hasta 2 o 4

semanas después de iniciar el tratamiento. También, pacientes reportan tener una serie de efectos secundarios como una disminución de funciones cognitivas, disfunción sexual, tendencias suicidas, y se ha observado una efectividad de entre el 50% y el 70%. Actualmente, se sabe que el 30% de las personas en tratamiento con antidepresivo de SSRI no responden a este, mostrando una resistencia al fármaco (Yohn et al., 2017; Gaynes et al., 2020; Li, 2020; Caldiroli et al., 2021).

Es debido a este índice de resistencia al fármaco, que es importante la investigación y propuesta de nuevos fármacos que tengan propiedades antidepresivas. Para comprobar la efectividad de estos nuevos fármacos propuestos como tratamientos antidepresivos, se hace uso de modelos animales los cuales son sujetos a protocolos experimentales con el objetivo de provocar condiciones de estrés crónico similares al de los humanos (Strekalova et al., 2022). Estos modelos se basan en que el estrés constante es un factor de riesgo para desarrollar TDM. No obstante, la respuesta al estrés varía entre individuos, ya que muchos de estos estresores resultan ser impredecibles, como es el caso de problemas laborales, dificultades económicas o la incertidumbre respecto al futuro. Para imitar esta falta de control y crear una situación de desesperanza, se han diseñado distintos modelos de estrés en ratas, considerando estresores como los sonidos, ventilación, luces, aspectos del hogar, con distinta duración, frecuencia e intensidad. (Willner, 2017; Maggio y Segal, 2019; Strekalova et al., 2022). Entre estos modelos destaca el paradigma de Estrés Crónico Impredecible (ECI), utilizado principalmente en la investigación de la depresión, dado que la exposición prolongada a estresores durante semanas induce en los animales comportamientos similares a los observados en trastornos depresivos y ansiosos (Fuchs y Flügge, 2004; Monteiro et al., 2015; Gaynes et al., 2020).

Este protocolo de estrés crónico ha demostrado ser eficaz para evaluar las características antidepresivas de fármacos en modelos animales (Nollet, 2021). Para la medición de estas conductas tipo depresivas inducidas por estos modelos, se utilizan principalmente las pruebas de nado forzado, en las que la conducta de tipo desesperanza se evalúa por la inmovilidad y hundimiento del animal en el agua (Yankelevitch-Yahav et al., 2015); la prueba de preferencia a sacarosa, en la que el menor consumo de solución con sacarosa se atribuye al desarrollo de anhedonia en los animales (Primo et al., 2023). En modelos de ECI, se ha visto una mejora en las conductas tipo anhedonia, medido en la prueba de preferencia a sacarosa, al administrar ISSR (Yang et al., 2013).

## Capítulo 2

### Marco Teórico

#### 2.1 El sistema serotoninérgico y la depresión

Uno de los principales tratamientos de la depresión, se basa en la teoría de que existe una desregulación de neurotransmisores, en específico, de la 5-HT. El sistema serotoninérgico está involucrado en conductas de recompensa y castigo, conductas depresivas y ansiosas, interacción social y agresión (Paquelet et al., 2022).

La mayoría de los receptores a 5-HT son receptores acoplados a una proteína G. Los receptores de 5-HT ligados a proteínas  $G_i$  son los de la familia 5-HT<sub>1</sub>: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> y 5-HT<sub>5A</sub>; los que están ligados a la proteína  $G_q$  son los receptores: 5-HT<sub>2</sub>: 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>; los receptores ligados a la proteína  $G_s$  pertenecen a la familia 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (Nichols & Nichols, 2008). Todos estos receptores son metabotrópicos, por lo que dependen de la activación de una proteína G y activan diversas cadenas de señalización intracelular. Por último, están los receptores 5-HT<sub>3</sub> los cuales son los únicos receptores ionotrópicos activados por la 5-HT.

En el estudio de los receptores 5-HT, se ha identificado que la familia de los receptores subtipo 5-HT<sub>1</sub>, está involucrada en distintas funciones, como es la regulación emocional, la ansiedad, percepción de dolor y se ha propuesto como blanco terapéutico para trastornos como la depresión y la esquizofrenia. Uno de los subtipos más estudiados, es el autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, cuya principal tarea es regular el disparo de las neuronas 5-HT, y es asociado también con la regulación de emociones y el sueño, siendo propuesto como blanco terapéutico para el tratamiento de trastornos emocionales, ansiedad, problemas de cognición, trastornos del sueño y dolor crónico (García-García et al., 2014; Yohn et al., 2017; Parajulee y Kim, 2023).

La disminución de 5-HT en el cerebro, se ha relacionado con la presencia de síntomas depresivos. Esta disminución se podría deber a la baja liberación sináptica de 5-HT por la depleción de triptófano, que es el precursor endógeno de la 5-HT, o bien por una alteración del transportador de serotonina (SERT) el cual acumula el neurotransmisor en las vesículas sinápticas, pues se ha observado una disminución de este transportador en personas con depresión (Moncrieff et al., 2023). En estudios en roedores, también se ha encontrado que la eliminación de este transportador genera conductas tipo depresivas. Incluso, este tipo de alteración genera variantes

proteicas que pueden provocar una predisposición para desarrollar depresión (Hamon y Blier, 2013; Liu et al., 2017; López-Echeverri et al., 2023).

## 2.2.- Núcleo dorsal del rafe

En el sistema nervioso central (SNC), la principal fuente de serotonina son los núcleos del rafe, los cuales se ubican en la línea media del cerebro, a nivel del mesencéfalo. Los núcleos que se encuentran en la zona rostral de esta área son el caudal linear, el núcleo dorsal del rafe (NDR) y el medial del rafe (Walker y Tadi, 2024). Dentro de las principales funciones de la 5-HT producida en el NDR se encuentran la facilitación e inhibición motora, funciones emotivas y la interacción social. Las alteraciones de la 5-HT se han relacionado con distintas enfermedades mentales, como el trastorno obsesivo compulsivo, la esquizofrenia y el trastorno depresivo mayor. Es por esto que, las vías serotoninérgicas son consideradas como objetivo para distintos tratamientos terapéuticos (Huang et al., 2019).

El NDR contiene la mayor población de neuronas serotoninérgicas y tiene eferencias a la corteza frontal y prefrontal (Li et al., 2021), a la habénula lateral (Zhao et al., 2015), núcleo accumbens (Tao y Ma, 2012), sustancia nigra y el caudoputamen; también tienen eferencias hacia el hipocampo y corteza entorrinal. Neuronas serotoninérgicas y de corticotropina proyectan hacia el núcleo paraventricular y el núcleo central de la amígdala (Imai et al., 1986; Van Bockstaele et al., 1993; Michelsen et al., 2008; Waselus et al., 2011). Axones de las neuronas serotoninérgicas del NDR proyectan también hacia neuronas dopaminérgicas del VTA, involucrado en el sistema de recompensa (Wang et al., 2019). También se ha reportado que axones de neuronas 5-HT, llegan a las áreas sensoriomotoras y al colículo superior, las cuales están involucradas en el procesamiento de imágenes (Nakamura, 2013).

El NDR recibe aferencias GABAérgicas del núcleo ventral tegmental (VTA) y de interneuronas localizadas dentro del propio NDR (Kauer y Polter, 2019), así como proyecciones glutamatérgicas de la corteza frontal, de áreas hipotalámicas, la amígdala y la habénula lateral (Takahashi et al., 2022). Por último, el NDR recibe proyecciones colinérgicas de los núcleos tegmentales latero-dorsal (LDT) y pedunculopontino (PPT) (Woolf and Butcher, 1989; Martinez-Gonzalez et al., 2011; French y Muthusamy, 2018). Se ha observado que el sistema colinérgico modula el tono serotoninérgico, en particular en el NDR (Hernandez-Lopez et al., 2013). Las

señales colinérgicas se han visto involucradas en procesos como la ansiedad, depresión, memoria y atención. Puesto que el NDR recibe abundantes aferencias colinérgicas, se ha considerado es importante entender el mecanismo de acción de la acetilcolina (ACh) en este núcleo (Garduño et al., 2012).

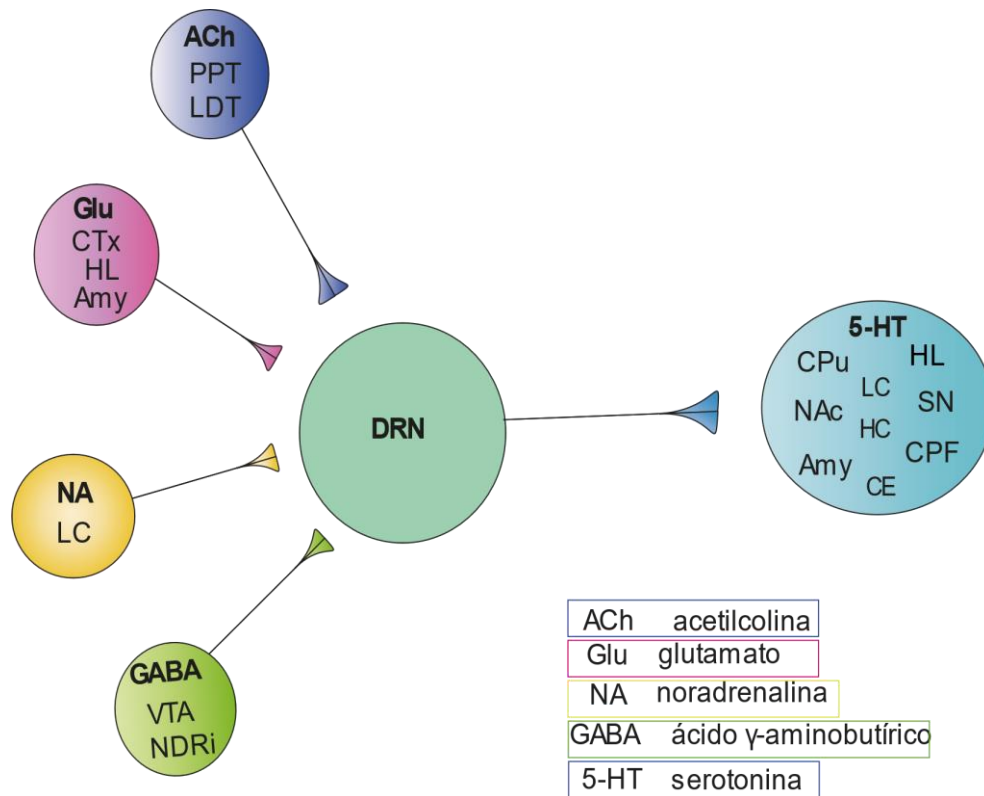


Diagrama de aferencias y eferencias del Núcleo Dorsal del Rafé, modificado de Hernández-López et al., (2013).

### 2.3 Receptores Nicotínicos

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que actúa como neuromodulador en el SNC y SNP, lo que significa que altera el estado de una neurona o un grupo de neuronas, sin ser específicamente excitatorio, mediado por liberación de glutamato, o inhibitorio, mediado por la liberación de GABA (Picciotto et al., 2012). Igualmente, la ACh, la cual participa como modulador neuroendocrino, fisiológico y emocional de las respuestas ante el estrés, es considerada como factor para predisponer a las personas a desarrollar un trastorno del estado del ánimo. En modelos animales, se ha observado que la hiperactividad del sistema colinérgico genera conductas tipo ansiosas, esto tras haber realizado la prueba de laberinto elevado, en la que los

animales pasaron mayor tiempo en los brazos cerrados, observándose mayor actividad de los receptores de ACh (Shytle et al., 2002; Dągystę et al., 2011; Picciotto et al., 2015).

De los principales receptores de acetilcolina, se encuentran los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) que pertenecen a la familia de los canales iónicos pentaméricos dependientes de ligandos (Hogg et al., 2003). En el sistema nervioso, estos receptores son activados por el neurotransmisor endógeno, ACh, pero poseen una alta afinidad por la nicotina y están conformados por distintas subunidades que pueden ser:  $\alpha 2$ – $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ , y los  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ . Los nAChR se encuentran en terminales presinápticas, cuerpos celulares y en axones, la estimulación de estos receptores puede incrementar la secreción de neurotransmisores como la DA, GABA, glutamato, ACh, NE y 5-HT (Wonnacott, 1997; Sher et al., 2004; Jensen et al., 2005; Picciotto et al., 2012).

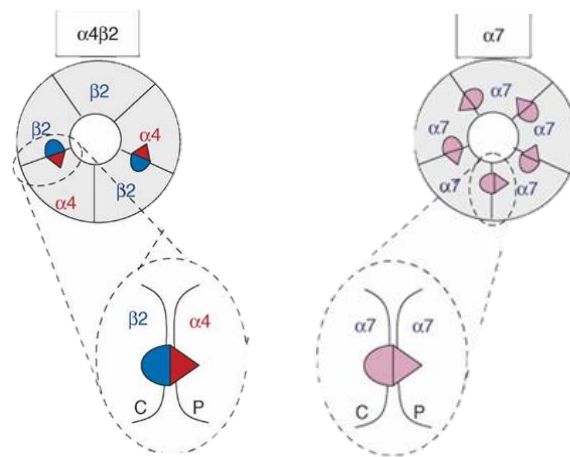
En particular, los receptores  $\alpha 4\beta 2$  se encuentran en grandes cantidades en vías dopaminérgicas del mesencéfalo, entre ellas el VTA. Estos receptores se han estudiado en modelos de consumo crónico de nicotina, teniendo una regulación dependiente de la región cerebral y dependientes del tiempo de exposición a la nicotina (Semenova et al., 2018). También se ha visto su participación en trastornos del estado de ánimo, pues se ha registrado un incremento de la actividad de estos receptores generando conductas tipo ansiosas en los animales (Schulz et al., 2013). Incluso, se ha observado una actividad mayor de estos receptores en circuitos involucrados en la atención y aprendizaje (McGranahan et al., 2011; Azimi et al., 2020). Asimismo, se ha identificado su participación en áreas relacionadas con la depresión, como los ganglios basales, estriado, tálamo, hipotálamo, amígdala, locus coeruleus y en el NDR, donde se encuentran particularmente los receptores  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  (Philip et al., 2010; Hernandez-Lopez et al., 2013).

Los receptores  $\alpha 4\beta 2$  se expresan en dos distintas estequiometrías,  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  denominados de alta sensibilidad (HS) y  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  de baja sensibilidad (LS), los cuales tienen distintos perfiles farmacológicos (Hamouda et al., 2016). Se ha observado que los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  HS tienen una mayor afinidad a la ACh y una baja permeabilidad al calcio mientras que los  $\alpha 4\beta 2$  LS muestran una baja sensibilidad a la ACh y los agonistas y una alta permeabilidad al calcio (Buisson y Bertrand, 2001; Moroni y Bermudez., 2006; Briggs et al., 2006; Tapia et al., 2007; Wu et al., 2015). Ambas estequiometrías se expresan en el SNC, sin embargo, aún no hay claridad acerca de la región cerebral en la que estos subtipos se encuentran.

Comparados con los receptores nicotínicos que contienen la subunidad  $\beta 2$ , los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  tienen una afinidad menor a los agonistas más conocidos como la acetilcolina y la nicotina, también muestran una desensibilización más rápida y una permeabilidad al calcio diez veces mayor a los receptores  $\alpha 4\beta 2$  (Noviello et al., 2021).

El NDR tiene una gran cantidad de nAChRs los cuales contienen las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  (Bitner et al., 2000; Bitner y Nickel, 2002; Galindo-Charles et al., 2008; Garduño et al., 2012). Los receptores  $\alpha 4\beta 2$ , son encontrados en terminales presinápticas donde modulan la liberación de glutamato, mediado por la permeabilidad del calcio en estos receptores e indirectamente mediado por canales dependientes de voltaje (Garduño et al., 2012; Grupe et al., 2015). De manera indirecta, la nicotina promueve la actividad de las neuronas serotoninérgicas en el NDR por un mecanismo dependiente de glutamato, en donde el tono colinérgico, a través de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  de alta afinidad encontrados en terminales glutamatérgicas, regulan la actividad excitatoria de las neuronas 5-HT (Garduño et al., 2012). A diferencia de los receptores  $\alpha 4\beta 2$ , los receptores  $\alpha 7$ , se encuentran en terminales presinápticas de neuronas GABAérgicas. Al ser activados por la nicotina, incrementan la liberación de GABA, el cual ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas 5-HT del NDR (Hernández-Vázquez et al., 2014).

En parte, el incremento en la actividad de las neuronas 5-HT puede explicar la mayor prevalencia a la adicción a nicotina en pacientes con depresión, con un porcentaje del 46%, comparado con la población sin depresión, con un porcentaje del 26%. Por ello, se ha hipotetizado que fumar representa una forma de automedicación para pacientes con depresión (Pomerleau y Pomerleau, 1984; Mihailescu et al., 2002; Secades-Villa et al., 2017). Además, distintos estudios han mostrado que los fumadores que han presentado episodios de TDM tienen mayor riesgo de recaída al intentar dejar de fumar que aquellos fumadores sin historial de depresión (Doherty et al., 1996; Fergusson et al., 1996).



**Sitio de unión de la ACh en los receptores nAChR  $\alpha 4 \beta 2$  y  $\alpha 7$ .** El receptor  $\alpha 4 \beta 2$  tiene dos sitios de unión del agonista constituidos por la junta entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (izquierda). El receptor  $\alpha 7$  contiene cinco sitios de unión constituidos por la junta de dos subunidades  $\alpha$  (derecha) (Modificado de Gotti et al., 2006).

#### 2.4 Mecamilamina

La mecamilamina (MEC) es un fármaco que originalmente se utilizó como agente anti-hipertensivo (Stone et al., 1956), sin embargo, fue retirado del mercado debido alto porcentaje de efectos secundarios como constipación, retención urinaria, boca y piel seca. En los años 80s se demostró que la MEC actuaba como un antagonista no selectivo y no competitivo de los nAChRs a dosis mucho más bajas de las requeridas para el tratamiento de la hipertensión y sin la misma tasa de efectos secundarios. Asimismo, la MEC tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que fue utilizada para el tratamiento de distintos trastornos incluyendo la adicción al tabaco y al alcohol y el síndrome de Tourette (Nickell et al., 2013; Petrakis et al., 2018; Rose et al., 1998; Shytle et al., 2002). Sorprendentemente, la MEC a dosis bajas, también exhibió efectos antidepresivos y ansiolíticos tanto en modelos animales de depresión como en estudios clínicos (ver Philip et al., 2010, para revisión).

Los efectos antidepresivos de la MEC parecen contradictorios ya que son semejantes a los que se observan tras la administración de nicotina; y dado que la nicotina es un agonista mientras que la MEC es un antagonista de los nAChRs se esperarían efectos opuestos (Ebrahimi-Ghiri et al., 2020). En modelos animales usando la MEC a concentraciones de 0.3mg/kg, se ha visto un decremento de conductas tipo depresivas, como la inmovilidad en la prueba de nado forzado.

También, se han realizado pruebas como laberinto de brazos abiertos donde la MEC ha mostrado tener efectos ansiolíticos (Ebrahimi-Ghiri et al., 2020; Newman et al., 2002; Philip et al., 2010). Sin embargo, en pruebas clínicas no se observaron mejoras convincentes sobre las conductas depresivas (Lippiello et al., 2011).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio (Hernández-González et al., 2020) se observó que en concentraciones bajas (1-6  $\mu\text{M}$ ), la MEC actúa como agonista de los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  ubicados en las terminales glutamatérgicas del NDR, mientras que se comporta como antagonista de los receptores  $\alpha 7$  encontrados en las terminales GABAérgicas de este mismo núcleo. Estas acciones conjuntas tienen un efecto excitatorio aumentando su tasa de disparo un 53% sobre las neuronas 5-HT a una concentración 3  $\mu\text{M}$ . Este mecanismo puede ser la explicación de los efectos antidepresivos que se han atribuido a la MEC. En síntesis, la MEC puede comportarse como agonista de los receptores nAChRs en concentraciones entre 3  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{M}$  o como antagonista de los nAChRs en concentraciones mayores a 9  $\mu\text{M}$ , asimismo, este mecanismo depende de los subtipos de receptores sobre los que actúa.

La MEC está compuesta por dos isómeros, la S-(+)-mecamilamina (S-mec) y R-(-)-mecamilamina (R-mec) (Rabenstein et al., 2006) por lo que su efecto depende también de estos isómeros. Se ha analizado la selectividad y potencia de ambos isómeros sobre los nAChRs y se observó que la S-mec potencia la actividad de los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  HS, actuando como un modulador alostérico positivo de este receptor, mientras que la R-mec es un antagonista de estos mismos receptores (Fedorov et al., 2009; Papke et al., 2013). Sin embargo, aún queda por investigar qué papel juegan los diferentes isómeros de la MEC en la liberación de glutamato y de GABA dentro del NDR. Tampoco se sabe dónde se localizan y que función tienen los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  de alta y baja sensibilidad. Comprender estos mecanismos, podría ayudar al desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para tratamiento del TDM.

## 2.5 Planteamiento del problema

Se sabe que la mecamilamina es la mezcla racémica de los enantiómeros S-(+) mec y R-(-) mec. A bajas concentraciones, la mecamilamina ha mostrado tener efectos antidepresivos. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la mecamilamina actúa sobre nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  en el NDR, induciendo la liberación de glutamato lo cual, a su vez, incrementa la excitabilidad de las neuronas del NDR. También, se ha propuesto que la S-(+) mec actúa como un modulador alostérico de los receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  de alta sensibilidad. Sin embargo, se desconoce si la sola activación de estos receptores encontrados en las terminales presinápticas de células de glutamato puede aumentar la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas del NDR e inhibir las conductas tipo depresivo en un modelo animal de depresión. En este proyecto, se propone probar los efectos del fármaco S-mec sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR modulado por un mecanismo dependiente de glutamato. Asimismo, se propone probar su efecto sobre las conductas tipo depresivo en un modelo de estrés crónico impredecible (ECI) en ratas. Además, se indagará si el S-mec puede potenciar el efecto de un agonista selectivo de los receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  de alta sensibilidad tanto sobre el disparo neuronal como sobre las conductas tipo depresivo.

## 2.6 Justificación

Según las predicciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2030 la depresión será una de las principales causas de discapacidad a nivel mundial (Liu et al., 2024). Considerando esta información y el hecho de que los fármacos de primera línea para el tratamiento de la depresión no son completamente efectivos, es esencial explorar nuevas perspectivas para un tratamiento antidepresivo que reduzca la posibilidad de generar resistencia y ofrezca una mejor calidad de vida a las personas que viven con TDM. En este proyecto, se plantea que el S-mec el cual, ya ha sido propuesto como un posible fármaco antidepresivo, pudiera ser utilizado como una nueva alternativa para tratamiento de las conductas depresivas ya sea solo, o en combinación con un agonista selectivo de los receptores  $\alpha\beta_2$ .

## 2.7 Hipótesis

Si los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  de alta sensibilidad se localizan en las terminales glutamatérgicas del NDR, la S-mec activará a las neuronas 5-HT incrementando su excitabilidad y produciendo efectos antidepresivos en un modelo animal de depresión.

## 2.8 Objetivos

### *General*

Evaluar el potencial antidepressivo de la S-mecamilamina en un modelo animal de depresión y comprender los mecanismos de acción de este fármaco como blanco terapéutico mediante técnicas electrofisiológicas.

### *Particulares*

1. Evaluar el efecto de la S-mecamilamina sobre la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del raquí.
2. Analizar el efecto antidepressivo de la S-mecamilamina en un modelo animal de estrés crónico impredecible, mediante la evaluación de parámetros conductuales.

## Capítulo 3

### Materiales y Métodos

#### *Consideraciones éticas*

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y de acuerdo con lo establecido por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional Autónoma de México de la Facultad de Medicina. Los animales de experimentación fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina.

#### *Extracción de cerebro y rebanadas*

Para este trabajo se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 25 días de edad. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (80mg/kg) y xilacina (15mg/kg) para la posterior decapitación y extracción del cerebro. El cerebro se remueve rápidamente para ser sumergido en solución Ringer a 4°C la cual está compuesta por: 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 25 mM glucosa, 300 mOsm/L, pH 7.3 burbujeada a 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, mediante el uso de un vibrátomo, se obtuvieron rebanadas coronales de 250 micras de espesor conteniendo el NDR y se mantuvieron a temperatura ambiente en la solución Ringer por al menos una hora antes de comenzar los registros electrofisiológicos.

#### *Electrofisiología*

Las rebanadas se transfieren a la cámara de registro perfundida a 4-5 ml/min de solución Ringer. Las micropipetas (4-7 MΩ) utilizadas para los registros contenían solución interna compuesta por: 140 mM K-gluconato, 5 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Mg<sup>2+</sup>-ATP, 0.5 Na<sub>2</sub>GTP y 0.1% biocitina, pH 7.2–7.3 con Trizma base, 280 –300 mOsm/L. Los registros se hicieron mediante la configuración de célula completa, en la modalidad de fijación de corriente o fijación de voltaje, utilizando un amplificador 700B (Axons Instruments). Las señales se filtraron a 3 KHz y fueron digitalizadas haciendo uso de una interfase análoga (Digidata 1422A; Molecular Devices) con una velocidad de muestreo de 5 KHz.

La visualización de neuronas se hizo por medio de un microscopio vertical (BX51WI; Olympus Instruments) equipado con un objetivo de inmersión en agua 80X. Las neuronas seleccionadas fueron localizadas cerca de la línea central, del fascículo y el acueducto. Estas fueron registradas mediante la técnica de fijación de voltaje para

realizar el sello y en fijación de corriente para examinar sus características electrofisiológicas y comprobar la identidad de la neurona 5-HT. En cada uno de los experimentos, se hizo una comparación de las neuronas en condición control y tras aplicar S-mec, S-mec+tubocurarina, TC-2559 y S-mec+TC-2559. Para evaluar el efecto de las drogas sobre el disparo neuronal, se realizaron registros en fijación de corriente y se aplicaron pulsos de corriente despolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV con incrementos de 10 pA, hasta alcanzar la frecuencia máxima de disparo (130 pA de corriente inyectada). Con los datos obtenidos se construyeron gráficas de intensidad-frecuencia (IF) para comparar el disparo neuronal en condiciones control y en presencia de los diferentes fármacos. Los valores de la frecuencia de disparo neuronal fueron representados como la *media +/- error estándar*.

#### *Fármacos*

Los fármacos fueron preparados el mismo día del experimento, fueron disueltos en solución de Ringer y se aplicaron a través de un sistema de perfusión por gravedad. Se hizo una grabación de registro control previo a la aplicación del fármaco, una vez aplicado el fármaco, el tiempo considerado para comenzar los registros fue de 5 y 15 minutos.

#### *Inmunocitoquímica*

Durante el registro las neuronas fueron llenadas con biocitina (1%) disuelta en solución interna. Al término del experimento, las rebanadas fueron fijadas en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.1 M) con paraformaldehído al 4%.

Posteriormente, la rebanada se lavó con PBS y se mantuvo en sacarosa al 30% por 24 hrs. Enseguida, el tejido se incluyó en un bloque de agar al 6% para obtener rebanadas de 40  $\mu$ m de grosor con un vibratomo (Serie 1000). Estas rebanadas fueron incubadas de 4 – 6 horas en PBS conteniendo 0.25% de Tritón X-100 y streptavidina conjugada a Cy3 (1 mg/ml; Zymed) para marcar la neurona registrada. Enseguida, las rebanadas fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia para detectar la marca de la neurona. Una vez encontrada se realizó un bloqueo con albúmina con suero bovino (BSA) al 1% durante 30 minutos y se incubó con un anticuerpo primario policlonal de oveja anti-TPH (dilución 1:200) por 24 hrs. Posteriormente, las rebanadas se lavaron con PBS Tritón y fueron reincubadas con el anticuerpo secundario conjugado a FITC (dilución 1:250; Vector Laboratories, Burlingame), para posteriormente colocarlas en un medio de montaje y ser observadas en un microscopio confocal (MRC 1024, Bio-Rad, Natford, United

Kingdom) equipado con un láser de kriptón/argón. Un láser con dos líneas de emisión, de 500 y 550 nm de longitud de onda, fue utilizado para excitar al Cy3 y la FICT, respectivamente. Las imágenes digitalizadas fueron transferidas a una computadora con un software de captura de imagen (Confocal Assistant, T. C. Brelje, Minneapolis, MN). En experimentos control, la omisión del anticuerpo primario anuló la detección de la señal.

#### *Experimentos conductuales*

Para el modelo conductual, se ocuparon ratas machos Wistar de 60 días de edad. Se mantuvieron con agua *ad libitum* y restricción de alimento a 1 hora al día bajo un ciclo de luz-obscuridad (12 horas) y una temperatura de 22° C. Se dividieron los animales en cuatro grupos: grupo control (n=8), el cual fue inyectado con solución salina al 0.9%; grupo estrés (ECI) (n=9), el cual fue administrado con solución salina al 0.9%; el tercer grupo ECI el cual fue administrado con S-mec a 1mg/kg (ECI+S-mec) (n=8); y el cuarto grupo ECI administrado con S-mec 1mg/kg y TC-2559 1mg/kg (ECI+S-mec+TC-2559) (n=9).

Se llevó a cabo un modelo de depresión basado en una batería de Estrés Crónico Impredecible (ECI). Previo a iniciar el protocolo, se realizó una semana de habituación de los animales. Los estresores que se utilizaron fueron: hacinamiento, por 12 hrs; cuarto frío a 4°C, por 1 hr; restricción de movimiento, por 1 hr; ruido blanco por 5 hrs; agitación de caja, por 1 hr; luz estroboscópica, por 24 hrs; cama húmeda, por 24 hrs; caja inclinada, por 24 hrs; inversión de ciclo, por 24 hrs; caja vacía, por 24 hrs; y pellizco de cola, por 3 minutos. Estos se aplicaron de manera aleatoria por 3 semanas, cuidando que no se repitieran en un lapso menor a 48 hrs. Al finalizar el protocolo, se administraron de manera aguda, por vía intraperitoneal, los fármacos S-mec (1 mg/kg) y la combinación de S-mec+TC-2559 (1 mg/kg), ambos diluidos en solución salina al 0.9%. Estas administraciones se realizaron antes de llevar a cabo las pruebas de campo abierto, nado forzado y preferencia de sacarosa, con el propósito de evaluar los efectos inmediatos de los fármacos durante las pruebas.

La prueba de campo abierto consiste en el análisis de conductas exploratorias de la rata, como caminata por todo el espacio indiscriminadamente, movimientos lentos, movimientos circulares y posicionándose en las patas traseras. Asimismo, se observó que el fármaco no haya afectado la motricidad de los animales. En este trabajo, se colocó a la rata en un cuadrante de 4 x 4 cuadros de 2m x 2m, en cuarto oscuro durante 5 minutos. Al finalizar se contabilizó la distancia recorrida total, el tiempo que el animal estuvo en el centro y la periferia.

La prueba de nado forzado consistió en introducir a la rata en un cilindro con agua a una temperatura de 25°C. El primer día, el animal fue sometido a una exposición de 15 minutos al agua. El segundo día, por 5 minutos. Durante el segundo día, se grabaron las pruebas para después analizar la conducta de nado, la cual se identificó como un constante movimiento de las patas y en círculo. La conducta de escalamiento, en la cual se identificaron los movimientos de la rata tratando de subir por las paredes del cilindro y nadando desde el fondo hasta el límite del agua. La inmovilidad consistió en el movimiento de sólo una o dos patas o si la rata pasó más de 3 segundos sin moverse.

Finalmente, se realizó la prueba de preferencia a sacarosa, la cual tiene como objetivo evaluar las conductas tipo anhedonia en las ratas. Esta prueba consiste en la exposición de dos bebederos, uno que contenga agua y el otro con sacarosa al 1%. El primer día se presentó por 6 horas para habituar a las ratas a estos dos bebederos. Tras 24 horas de abstinencia, se les presentó las mismas botellas, una con agua natural y la otra con agua con sacarosa. Pasada una hora, se midió y se obtuvo el porcentaje de consumo de sacarosa (Liu et al., 2018; He et al., 2020).

$$\text{Preferencia de sacarosa} = \frac{\text{Consumo de azúcar (mL)}}{\text{Consumo de azúcar (mL)} + \text{Consumo de agua (mL)}}$$

#### *Análisis de datos*

Para el análisis de datos electrofisiológicos, se hizo uso del software Clampfit 11 (Molecular Devices) y softwares con programas estadísticos: Origin (version 9), SPSS y GraphPad (version 8). Para comprobar la distribución normal, se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Para la comparación de los datos de las neuronas en estado control y con el fármaco, se usó la prueba de t de Student, considerando como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

Para el análisis de los datos conductuales, se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos. Para pruebas no paramétricas se usó la prueba de Kruskal-Wallis (valor de  $p < 0.05$  como significativo) con prueba post hoc Dunn. Para pruebas paramétricas, se realizó la prueba de ANOVA de una vía (valor de  $p < 0.05$  como significativo) y una prueba post hoc Tukey.

## Capítulo 4

### Resultados

Para el registro individual de las propiedades electrofisiológicas, se identificaron y analizaron  $n=35$  células serotoninérgicas del NDR.

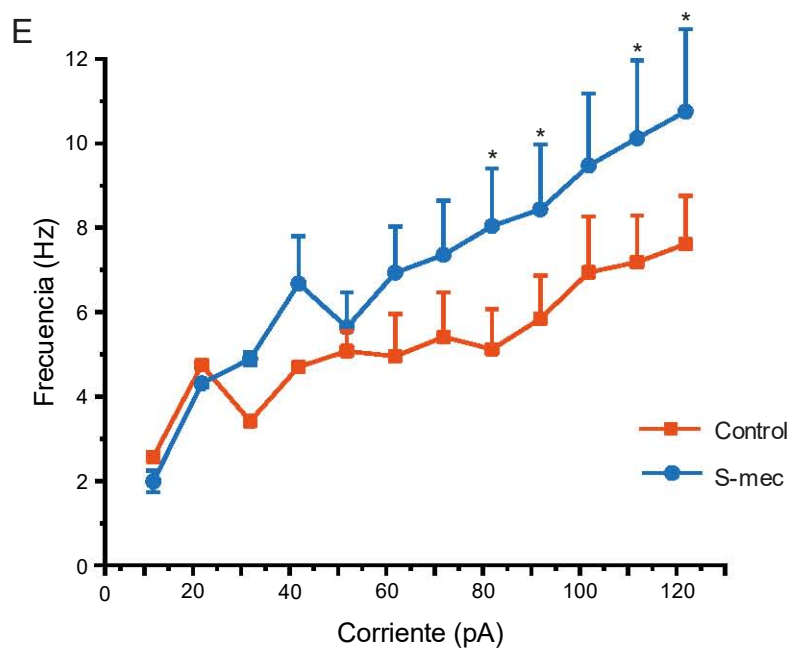
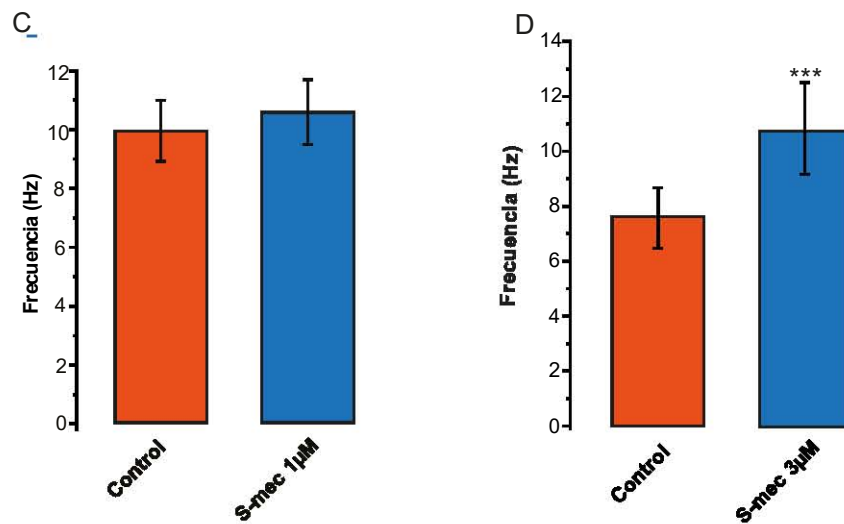
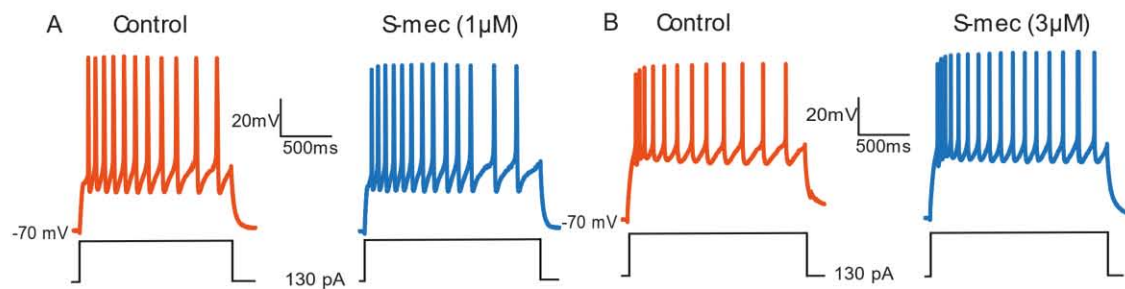
#### **La S-mec aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT**

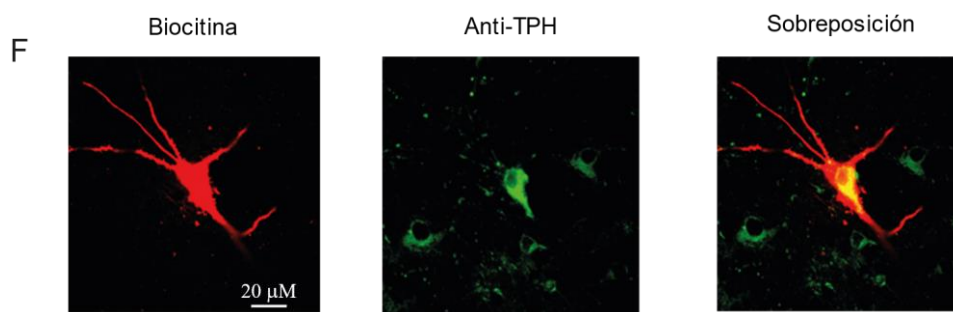
En la figura uno, se pueden observar los trazos representativos de voltaje de neuronas 5-HT en condición control y después de la aplicación de dos distintas concentraciones de S-mec. Para la identificación electrofisiológica de estas neuronas, se seleccionaron células que presentaron potenciales de acción con una larga duración (4-6 ms), una baja frecuencia de disparo ( $<15\text{Hz}$ ) con ligera adaptación, un postpotencial hiperpolarizante prolongado ( $>350$  ms), y una inflexión en la fase descendente del potencial de acción (Galindo-Charles et al., 2008; Garduño et al., 2012).

El registro de estas células se realizó en fijación de corriente a partir de un potencial de mantenimiento de  $-70\text{mV}$  y se aplicaron pulsos despolarizantes desde  $-10$  pA hasta  $130$  pA con un aumento progresivo de  $10\text{pA}$ . Se midió la respuesta de las neuronas y con estos datos se realizaron las gráficas corriente-frecuencia (IF).

La figura 1 (A, B) muestra trazos representativos de voltaje de dos neuronas en condiciones control (trazo naranja) y en presencia de S-mec ( $1\ \mu\text{M}$  ó  $3\ \mu\text{M}$ ) (trazo azul) donde se observa un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT. S-mec ( $1\ \mu\text{M}$ ) causó un incremento en la frecuencia de disparo un  $17 \pm 0.38\%$  Hz (t-student,  $t=0.5220$ ,  $df=7$ ,  $p=0.6178$ ,  $n=6$ ). Por otra parte, S-mec ( $3\ \mu\text{M}$ ) causó un incremento en la frecuencia de disparo de  $33 \pm 0.30\%$  el cual fue estadísticamente significativo (t-student,  $t=4.653$ ,  $df=11$ ,  $p=0.0007$ ,  $n=5$ ). Las gráficas de barras muestran los promedios de las frecuencias de disparo (Hz) de una sola neurona registradas en condición control (naranja) y en presencia de S-mec (azul) a ambas concentraciones. La frecuencia de disparo promedio de cada neurona se obtuvo con un pulso de corriente de  $130$  pA (Fig. 1C, D). Por último, se realizaron curvas I-F utilizando una concentración de S-mec de  $3\ \mu\text{M}$  a un pulso despolarizante de  $130$  pA (Fig. 1E), donde se observa el aumento de frecuencia de disparo de las células 5-HT en condiciones control y en presencia del fármaco (t-student,  $t=7.213$ ,  $df=5$ ,  $p=0.0008$ ,  $n=6$ ).

Además de identificar a las células por sus propiedades electrofisiológicas, se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas para corroborar la naturaleza serotoninérgica de las neuronas. En la figura 1F se muestra la célula registrada en B marcada con biocitina (izq, rojo), con un anticuerpo policlonal anti-TPH (medio, verde) y finalmente el sobrelapamiento de ambas imágenes (derecha, naranja).

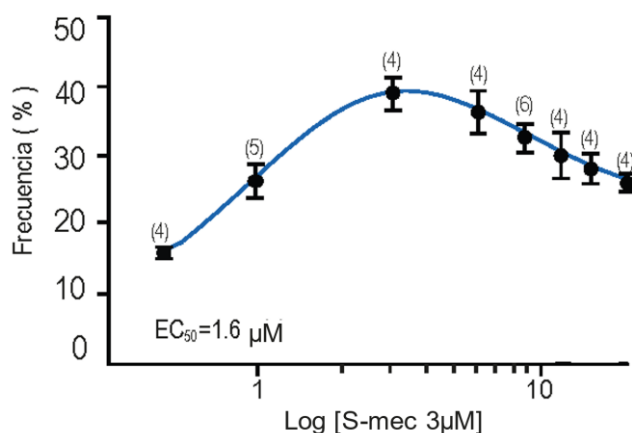




**Fig. 1. S-mec aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT.** (A-B) Trazos de corrientes de voltaje de dos células 5-HT ante una corriente despolarizante de 130 pA en condiciones control y después de aplicar las dosis de S-mec: 1 $\mu$ M y 3 $\mu$ M. C-D) Se muestra el resumen estadístico obtenido del promedio de distintas células 5-HT tras la aplicación de S-mec a 1 $\mu$ M (t-student,  $t=0.5220$ ,  $df=7$ ,  $p=0.6178$ ,  $n=6$ ) y tras la aplicación de S-mec a 3 $\mu$ M con un incremento del  $33 \pm 1\%$  (t-student,  $t=4.653$ ,  $df=11$   $***p=0.0007$ ,  $n=5$ ). E) Gráfica corriente-frecuencia de células 5-HT tras un pulso despolarizante de 130 pA en estado control y con S-mec al 3 $\mu$ M donde se registra el incremento de la frecuencia de disparo tras la aplicación de S-mec (t-student,  $t=7.213$ ,  $df=5$ ,  $p=0.0008$ ,  $n=6$ ). F) Fotografías de la célula registrada en B con marcaje de biocitina (rojo), anticuerpo policlonal anti-TPH (verde) y la superposición de ambos marcajes (naranja).

### **El efecto excitatorio de la S-mec es dependiente de la concentración**

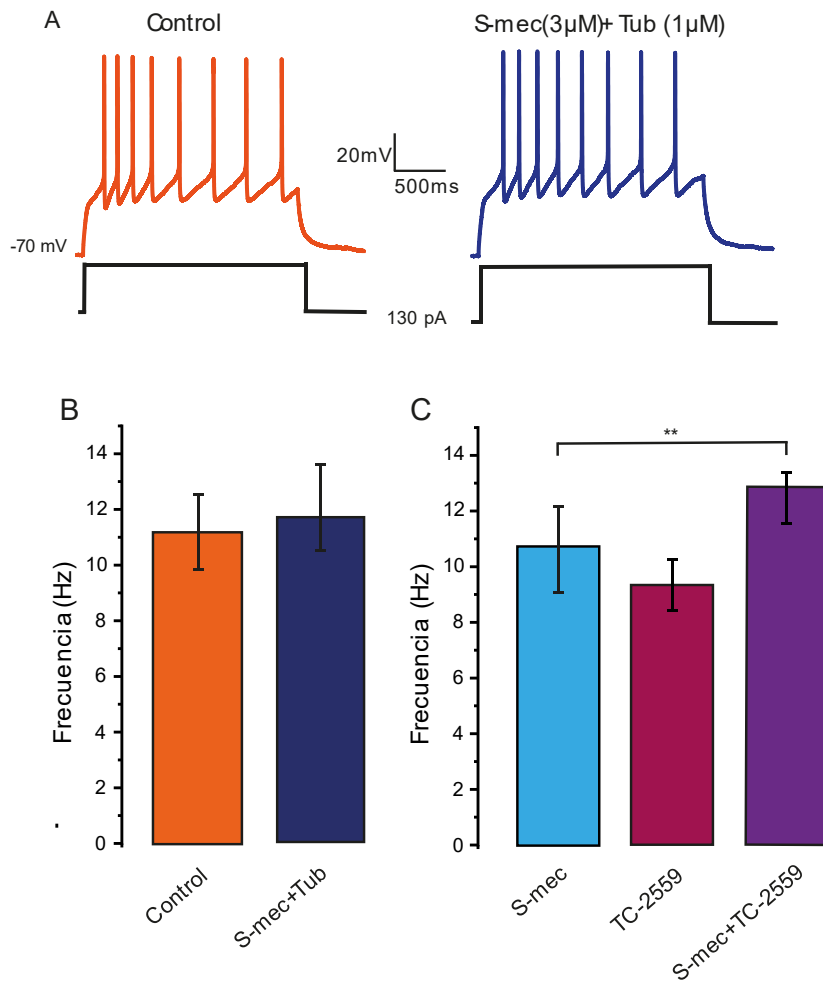
Se realizó una curva concentración-respuesta para comprobar el efecto de la S-mec a diferentes concentraciones sobre la actividad de las neuronas 5-HT del NDR, esto se observó durante registros electrofisiológicos, en células control y aplicando las siguientes dosis de S-mec: 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 9 $\mu$ M y 12 $\mu$ M (Fig. 2). El efecto de la S-mec depende de la concentración y es bifásico, lo que significa que a pequeñas concentraciones hay un efecto excitatorio, mientras que, a mayores concentraciones, se ve un efecto inhibitorio. Se obtuvo un efecto máximo a una concentración de 3 $\mu$ M con una  $EC_{50}$  de 1.6  $\mu$ M. Basándose en estos datos, se utilizó la dosis de 3 $\mu$ M para llevar a cabo los experimentos electrofisiológicos. Las células analizadas fueron identificadas en las regiones dorsales y proximales a la línea media del NDR.



**Fig. 2. Curva concentración-respuesta de S-mec.** Actividad registrada de n=35 células ante distintas concentraciones de S-mec y analizadas por medio de Patch-Clamp. La repuesta máxima se obtuvo a una concentración de 3 µM con una EC<sub>50</sub> de 1.6 µM. El coeficiente de determinación fue de R<sub>2</sub> = 0.78 con error estándar de s.e.m. = 2.46.

### **El efecto excitatorio de S-mec es inhibido por el antagonista de los receptores α4β2 HS y es potenciado por el agonista**

Para comprobar la presencia de los receptores α4β2 HS, se repitió el protocolo anterior en fijación de corriente, aplicando S-mec (3 µM) en presencia de tubocurarina (1 µM) un antagonista selectivo de los nAChRs α4β2 HS. En la figura 3-A, se presenta el trazo de voltaje de una sola célula 5-HT en condiciones control (naranja) y después de la administración de tubocurarina (azul marino) y se observa cómo la tubocurarina, bloquea el efecto de S-mec, y no se observa ningún cambio en la frecuencia de disparo de la célula 5-HT. En la figura 3B, se observa el resumen estadístico del promedio de célula 5-HT en condiciones control y al aplicar S-mec y tubocurarina, sin ser observado algún cambio en la frecuencia de disparo de las células (t-student, t=2.013, df=4, p=0.114, n=6). En la figura 3-C, se observa un resumen estadístico tras la aplicación de S-mec (3 µM) y el agonista selectivo de los receptores α4β2HS, TC-2559 (5 µM), donde se identificó que la sola aplicación de TC-2559 no produjo incremento en la frecuencia de disparo de las células (ANOVA, f=6.260, p=0.5166, n=6). Sin embargo, este efecto se vio potenciado cuando TC-2559 y S-mec se administraron de manera conjunta (ANOVA, p=0.0036) en comparación con la sola administración de S-mec. Este efecto producido por la administración conjunta de TC-2559 y S-mec, demuestra que hay receptores α4β2HS expresados en el NDR.



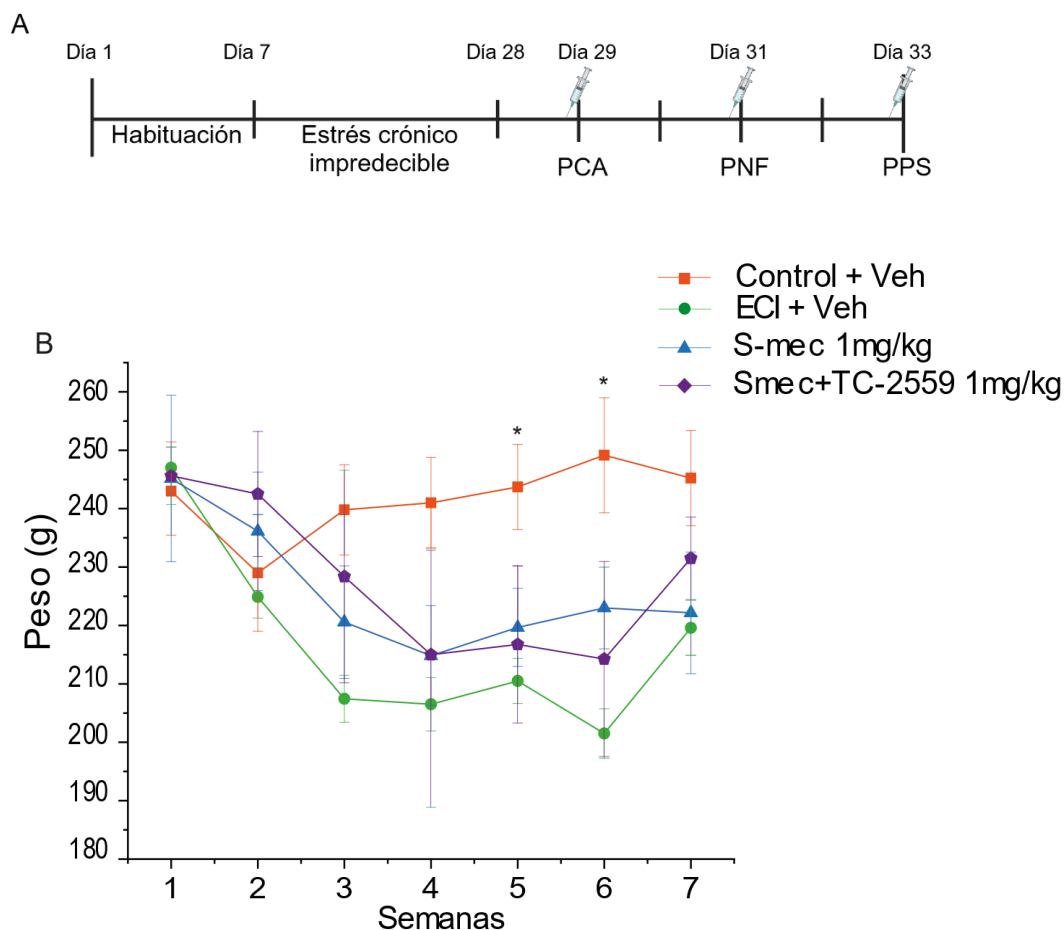
**Fig. 3. El efecto excitatorio de S-mec es inhibido por el antagonista de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  HS y es potenciado por el agonista selectivo de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  HS.**

A) Trazos de corrientes de voltaje de una sola célula 5-HT ante una corriente despolarizante de 130 pA en condiciones control y después de aplicar las dosis: de S-mec 3µM y de tubocurarina 1µM (t-student,  $t=2.013$ ,  $df=4$ ,  $p=0.114$ ,  $n=6$ ) comparado al control. B) Gráfica de promedio de una célula en estado control, tras la aplicación de: S-mec+Tub (ANOVA,  $f=6.260$ ,  $p=0.5166$ ,  $n=6$ ). C) Gráfica de promedio de una neurona tras la aplicación de: S-mec, TC-2559 y S-mec+TC-2559. En estas gráficas se observa el incremento de la frecuencia de disparo de las células 5-HT producido al aplicar S-mec y TC-2559 en conjunto (ANOVA, \*\*  $p=0.0036$ ) en comparación con la sola aplicación de S-mec.

### **La S-mec demostró tener propiedades antidepressivas en un modelo animal de estrés crónico impredecible**

Una vez identificado el efecto de la S-mec en las neuronas 5-HT del NDR, se evaluaron las propiedades antidepressivas de la S-mec con un modelo conductual de depresión. El protocolo utilizado para inducir conductas tipo depresivas en los

animales fue el de estrés crónico impredecible (ECI). Se dividieron los grupos en control con administración de vehículo, ECI con administración de vehículo, ECI con administración de S-mec (1mg/kg) y ECI con administración de S-mec+TC-2559 (1mg/kg) como tratamiento antidepresivo.

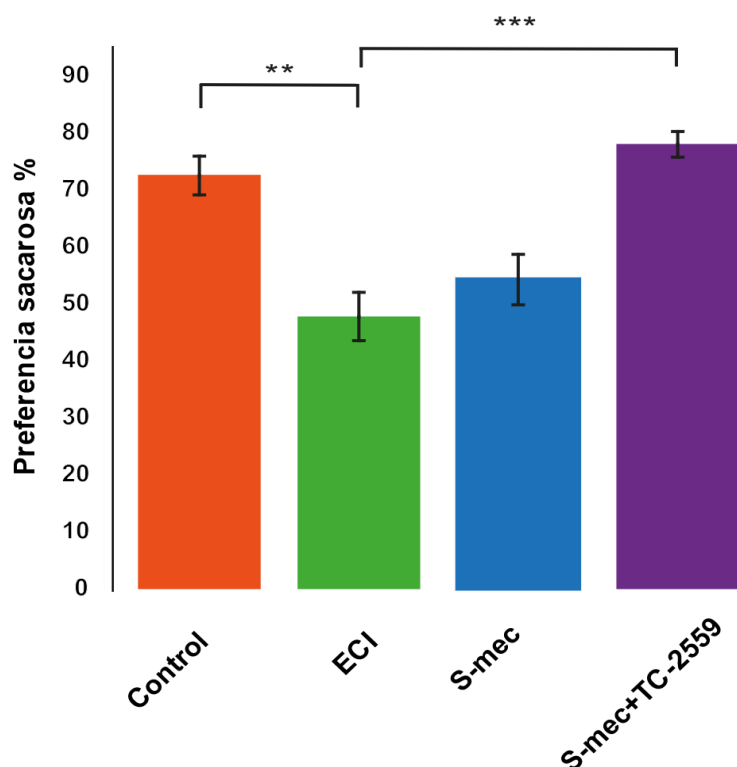


**Fig. 4. Protocolo conductual y peso de ratas a lo largo del tiempo.** A) Protocolo de conducta a lo largo de las semanas. Cada jeringa representa la administración de solución salina o fármaco una hora antes de iniciar la prueba conductual. B) Registro del aumento o decremento del peso de las ratas durante las 7 semanas de protocolo. En naranja, se observa el peso de las ratas control, en verde el grupo ECI, el cual tuvo decremento de peso en comparación con el grupo control (ANOVA,  $f= 5.194$ ,  $* p=0.0352$ ). En color azul se representó el peso de las ratas ECI con administración de S-mec (1mg/kg) y en morado el peso de las ratas administradas con S-mec+TC-2559 (1mg/kg).

En la figura 4A, se ilustra la línea del tiempo del protocolo que se siguió. La figura 4B muestra el registro del peso de las ratas control, ECI, ECI+S-mec y ECI S-mec+TC-2559. Se llevó una medición semanal del peso de las ratas ya que se ha visto que el peso de los animales en protocolo de estrés suele disminuir junto con el incremento de conductas tipo depresivas (Monteiro et al., 2015). Se observó un decremento significativo del grupo ECI en comparación con el grupo control, el cual

tuvo un incremento de su peso a lo largo de las 7 semanas (ANOVA,  $f= 5.194$ ,  $p=0.0352$ ). El grupo ECI+S-mec tuvo un decremento de peso durante las semanas de estrés, sin embargo, una vez que se inició la administración, hubo un ligero incremento de peso, no obstante, no fue significativo. Por último, el grupo administrado con S-mec+TC-2559, incrementó de peso al empezar los días de tratamiento y este efecto se mantuvo días después de terminar las pruebas conductuales.

Se realizó la prueba de preferencia a sacarosa, usada para medir las conductas tipo anhedonia de las ratas. Se comparó la preferencia de sacarosa en cada uno de los grupos bajo distintos protocolos y se observó un menor consumo de sacarosa del grupo ECI del  $35 \pm 0.21$  % en comparación con el grupo control (Kruskal-Wallis,  $p=0.0008$ ,  $n=9$ ). El grupo administrado con S-mec, no mostró un cambio en su preferencia de sacarosa, sin embargo, el grupo administrado con S-mec+TC-2559, tuvo un aumento significativo en su consumo del  $70 \pm 0.20$  % comparado con el grupo ECI (Fig. 5). Esto significa que la administración de S-mec+TC-2559, disminuye la conducta tipo anhedonia inducida por el estrés crónico impredecible.



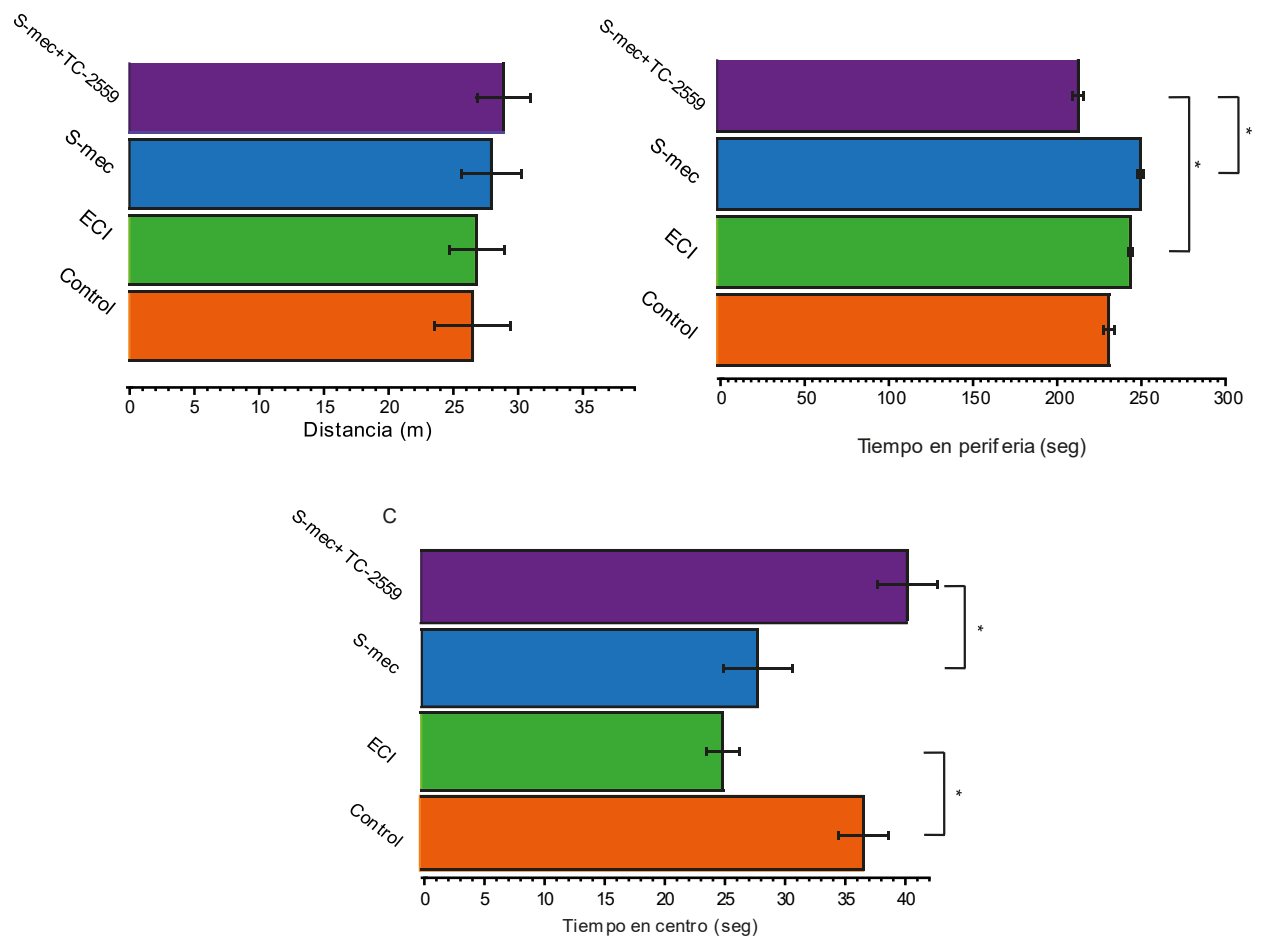
**Fig. 5. Prueba de preferencia de sacarosa.** Registro del porcentaje de preferencia de sacarosa. En color naranja, se observa el consumo de sacarosa de las ratas control, en verde el consumo de sacarosa de grupo ECI, con una disminución de consumo del  $35 \pm 0.21$  % (Kruskal-Wallis,  $** p=0.0070$ ), el color azul representa el consumo de sacarosa del grupo ECI con administración de S-

mec (1mg/kg) y de morado el porcentaje de preferencia en el grupo S-mec+TC-2559 con un aumento en consumo del  $70 \pm 0.20$  % (Kruskal-Wallis, \*\*\*  $p=0.0008$ ,  $n=9$ ).

Para comprobar que la S-mec y S-mec+TC-2559 no tuvieran algún efecto sobre la motricidad, marcha y conducta exploratoria de las ratas ante un espacio novedoso, se llevó a cabo la prueba de campo abierto. En esta prueba, uno de los parámetros que se registraron fue la distancia recorrida, y no se observó diferencia estadística entre los grupos control, el grupo ECI, el grupo con S-mec y el grupo S-mec+TC-2559 (Kruskal-Wallis,  $p=0.8509$ ) (Fig5.A). Esto sugiere que no hubo afectación en la motricidad y marcha de las ratas al ser administradas con S-mec y S-mec+TC-2559.

Asimismo, se registró el tiempo que las ratas pasaron en la periferia, en particular, se observó que el grupo ECI presentó mayor número de conductas tipo ansiosas al pasar más tiempo en la periferia, en comparación con el grupo administrado con S-mec+TC-2559, el cual tuvo menor número de conductas tipo ansiosas (Kruskal-Wallis,  $p=0.0038$ ). Igualmente, el grupo administrado con S-mec+TC-2559, presentó un decremento en el tiempo que pasó en la periferia en comparación con el grupo administrado con solo S-mec (Kruskal-Wallis,  $p=0.0295$ ).

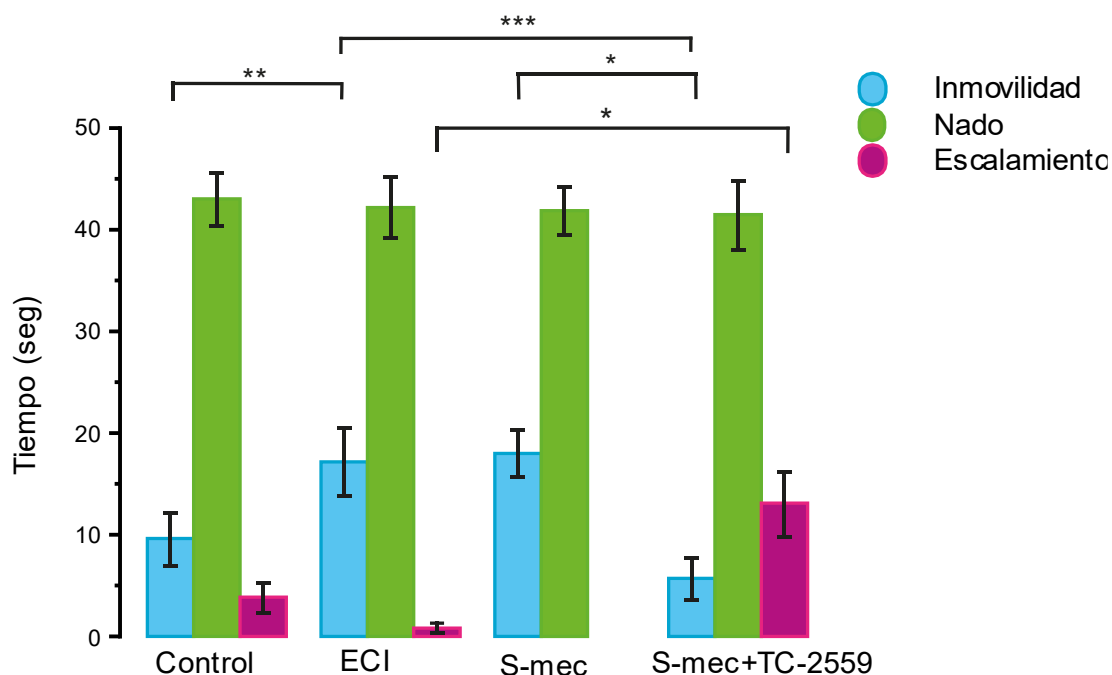
Por último, se midió el tiempo que pasaron en el centro, observándose que el grupo ECI paso menor tiempo en el centro a comparación al grupo control (Kruskal-Wallis,  $p=0.0238$ ). De manera similar, el grupo ECI paso menor tiempo en el centro en comparación con el grupo S-mec+TC-2559 (Kruskal-Wallis,  $p=0.0018$ ). Por último, el grupo con sola administración de S-mec paso menor tiempo en el centro en comparación con el grupo administrado con TC-2559 (Kruskal-Wallis,  $p=0.0219$ ). Estos resultados demuestran que las ratas del grupo S-mec+TC-2559 mostraron menor número de conductas tipo ansiosas y mayor conducta exploratoria a diferencia de los grupos ECI y S-mec que se sometieron al protocolo de estrés. Los datos sugieren que la S-mec, por sí sola, no disminuye las conductas tipo ansiosas, presentando mayor potencial como antidepresivo.



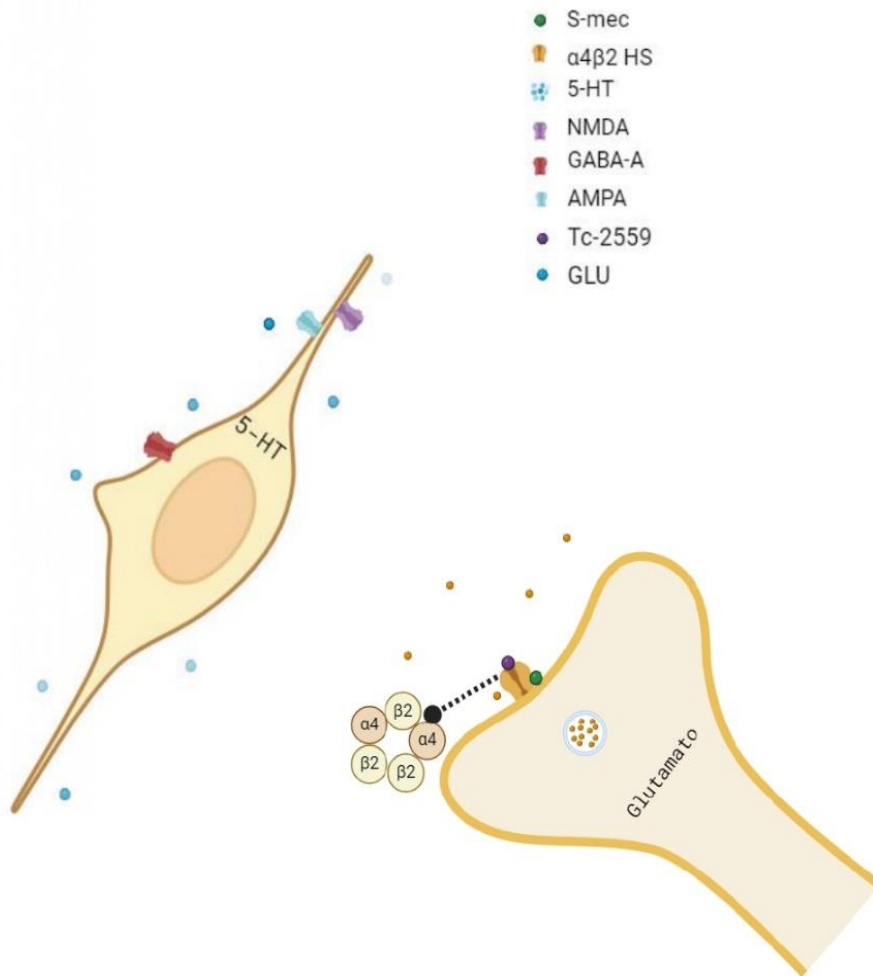
**Fig. 6. Pruebas de campo abierto.** A) El promedio total de la distancia recorrida representada en metros, no fue significativa entre los grupos (Kruskal-Wallis,  $p=0.8509$ ). B) Promedio del tiempo en la periferia, la cual fue significativa entre el grupo ECI y el grupo administrado con S-mec+TC-2559 (Kruskal-Wallis, \*  $p=0.0038$ ). Igualmente, hubo un cambio significativo del tiempo que pasaron en la periferia entre el grupo administrado con TC-2559 y S-mec (Kruskal-Wallis, \*  $p=0.0295$ ). C) Promedio del tiempo en el centro. Hubo un decremento del tiempo en el centro que pasó el grupo ECI en comparación con el grupo control (Kruskal-Wallis, \*  $p=0.0238$ ). Se vieron reducidas las conductas tipo ansiosas en el grupo administrado con S-mec+TC-2559 en comparación con el grupo con sola administración de S-mec (Kruskal-Wallis, \*  $p=0.0005$ ) y el grupo ECI (Kruskal-Wallis, \*  $p=0.0018$ ).

Por último, se realizó la prueba de nado forzado, esta prueba mide conductas tipo depresivas y tipo desesperanza, como lo es la inmovilidad y hundimiento, (Mezadri et al., 2011). En este protocolo, se observaron tres conductas, la de nado, en la que se consideró que la rata presentara un constante movimiento de las patas y se moviera en círculo; la conducta de escalamiento, la cual se identificó como la rata buscando subir el cilindro y la rata nadando desde el fondo hasta el límite del agua; e inmovilidad, la cual consistió en el movimiento de sólo una o dos patas o si la rata pasó más de 3 segundos sin moverse.

En la conducta de nado, no se observó algún cambio entre los cuatro grupos (Kruskal-Wallis,  $p=0.9835$ ). Al medir la conducta de escalamiento, se registró un marcado incremento en el grupo ECI con la administración de S-mec+TC-2559 en comparación con el grupo ECI (Kruskal-Wallis,  $p=0.0145$ ). Finalmente, se midió la conducta de inmovilidad, y se identificó que el grupo ECI paso mayor tiempo en inmovilidad en comparación con el grupo control (Kruskal-Wallis,  $p=0.0033$ ), efecto que también se observó al comparar al grupo ECI con el grupo S-mec+TC-2559 (Kruskal-Wallis,  $p=0.0002$ ), y al comparar al grupo administrado con S-mec+TC-2559 con el grupo con sola administración de S-mec (Kruskal-Wallis,  $p=0.0147$ ). Esto demuestra que la S-mec administrada sola no es suficiente para disminuir las conductas tipo depresivas representadas en la prueba de nado forzado, sin embargo, la combinación de S-mec+TC-2559 administrada a 1mg/kg sí logró disminuir estas conductas.



**Fig. 7. Prueba de nado forzado.** Se observaron tres conductas: nado, escalamiento e inmovilidad. No hubo un cambio en la conducta de nado entre los 4 grupos (Kruskal-Wallis,  $p=0.9835$ ). El grupo administrado con S-mec+TC-2559 presentó mayor número de conducta de escalamiento en comparación con el grupo ECI (Kruskal-Wallis, \*  $p=0.0145$ ). Por último, el grupo ECI presentó mayor número de conductas de inmovilidad en comparación el grupo control (Kruskal-Wallis, \*\*  $p=0.0033$ ) y el grupo con administración de S-mec+TC-2559 (Kruskal-Wallis, \*\*\*  $p=0.0002$ ). Al comparar los grupos con sola administración de S-mec y con administración de S-mec+TC2559, se observó un cambio significativo en la prueba de inmovilidad observándose una marcada disminución de esta conducta en el grupo S-mec+TC2559 (Kruskal-Wallis,  $p=0.0147$ ). La concentración de 1 mg/kg de S-mec y TC-2559 es suficiente para revertir las conductas tipo depresivas representadas en esta prueba.



**Fig. 8. Mecanismo de acción de la S-mec.** Se identificó que el enantiómero (+) S-mecamilamina actúa como modulador alostérico positivo en los receptores  $\alpha 4\beta 2$  HS en neuronas glutamatérgicas, promoviendo la liberación de glutamato. Este efecto excitatorio se vio potenciado en presencia del agonista selectivo de estos receptores, TC-2559. Además, conserva su mecanismo en los receptores  $\alpha 7$ , reduciendo la liberación de GABA.

Previamente, Hernández-González et al. (2020) identificaron el mecanismo de acción de la mecamilamina, la cual, promueve la excitabilidad de las neuronas 5-HT mediado a través de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  encontrados en la terminal presináptica de las neuronas glutamatérgicas, fomentando la liberación de glutamato. Al mismo tiempo, la mecamilamina disminuye la liberación de GABA al bloquear los receptores  $\alpha 7$  encontrados en la terminal presinápticas de las neuronas GABAérgicas. En este trabajo, se identificó el mecanismo de acción del enantiómero (+) S-mecamilamina, el cual actúa en los receptores  $\alpha 4\beta 2$  HS encontrados en la terminal presináptica de las neuronas de glutamato, promoviendo la liberación de glutamato. La S-mec, al ser un modulador alostérico positivo, permite que el sitio de unión ortostérico al ligando esté libre, favoreciendo la unión del agonista selectivo de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  HS, TC-

2559, lo que potencia su efecto. A la vez, la S-mec mantiene el mecanismo de la mecamilamina y bloquea a los receptores  $\alpha 7$  encontrados en la terminal presináptica de las células GABAérgicas, disminuyendo la liberación de GABA. Todo esto promueve un incremento de la frecuencia de disparo y excitabilidad de las neuronas 5-HT.

## Capítulo 5

### Discusión

El principal hallazgo de este proyecto fue que el enantiómero de la mecamilamina, S-mec, demostró tener efectos excitatorios sobre las neuronas 5-HT del núcleo dorsal del rafé. También, se observó que S-mec potenció el incremento de disparo de las neuronas 5-HT producido por TC-2559, un agonista selectivo de receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  HS. Asimismo, los experimentos conductuales mostraron que la administración conjunta de S-mec y TC-2559 disminuyeron las conductas tipo depresivas en animales sometidos a un protocolo de ECI. Los registros electrofisiológicos mostraron que S-mec tiene un efecto bifásico y dependiente de concentración, observándose que a concentraciones bajas hubo un aumento en la frecuencia del disparo de las neuronas 5-HT, con una  $EC_{50}$  de 1.6  $\mu$ M.

Experimentos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la activación de los receptores tipo  $\alpha 4\beta 2$ , aumenta la liberación de glutamato causando un efecto excitatorio sobre las neuronas 5-HT del NDR (Garduño et al., 2012; Hernández-López et al., 2013; Hernández-Vázquez et al., 2014). Asimismo, en un trabajo más reciente, se mostró que la mecamilamina activa los receptores  $\alpha 4\beta 2$  en terminales glutamatérgicas estimulando la liberación de este neurotransmisor y simultáneamente bloquea receptores nicotínicos tipo  $\alpha 7$  inhibiendo la liberación de GABA (Hernández-González et al., 2020).

El presente trabajo, fuertemente sugiere que el efecto excitatorio mediado por glutamato es debido a la activación de los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$ HS ya que, el antagonista selectivo de estos receptores, tubocurarina, bloqueó por completo el efecto de S-mec sobre la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT (ver Moroni et al., 2006). En congruencia con estos datos, se observó que la sola aplicación de TC-2559 produjo un ligero efecto excitatorio sobre el disparo de las neuronas 5-HT. Estos hallazgos son de gran importancia fisiológica, ya que la serotonina actúa como un neurotransmisor regulador del estado del ánimo. Es bien sabido, que una disminución en el tono 5-HT se correlaciona con un aumento de los síntomas asociados a la depresión (Erritzoe et al., 2022). Los resultados del presente estudio permiten sugerir que la utilización de un agonista selectivo de los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$ HS como el TC-2559 en combinación con S-mec puede ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo, en específico del trastorno depresivo mayor (B. Liu et al., 2017; Moncrieff et al., 2023).

Para comprobar sus efectos antidepresivos, se administraron bajas concentraciones de S-mec y TC-2559 (1mg/Kg) a grupos conductuales sometidos a un protocolo de estrés crónico impredecible. Este modelo ha comprobado ser efectivo para inducir conductas tipo depresivas en estudios preclínicos (Monteiro et al., 2015; Antoniuk et al., 2019; Strekalova et al., 2022). La validación del modelo conductual se realizó a través de tres pruebas que han demostrado ser precisas y reproducibles para medir conductas tipo depresivas y tipo ansiosas, las cuales fueron: campo abierto para medir conductas tipo ansiosas y conductas de exploración; nado forzado para medir conductas tipo desesperanza y prueba de preferencia a sacarosa para medir conductas tipo anhedónicas (Yankelevitch-Yahav et al., 2015, Primo et al., 2023).

En la prueba de preferencia de sacarosa, el grupo conductual administrado con S-mec+TC-2559 fue el que presentó mayor porcentaje de preferencia de sacarosa, similar al grupo control, en comparación con el grupo bajo protocolo de estrés con vehículo, esto sugiere que la combinación de estos fármacos disminuye conductas tipo anhedónicas.

Durante la prueba de campo abierto, se confirmó que ninguno de los fármacos afectó la marcha y motricidad de los distintos grupos conductuales. En cuanto a las conductas tipo ansiosas, el grupo control, mostró un mayor número de conductas exploratorias. Sin embargo, los grupos bajo el protocolo de estrés mantuvieron las conductas tipo ansiosas en distinta magnitud, esto se determinó al comparar los tiempos que pasaron en la periferia y en el centro de la arena. La combinación de S-mec+TC-2559, logró disminuir las conductas ansiosas, observándose que pasaron menor tiempo en la periferia. A pesar de que no se observó un cambio en la marcha de los animales en la prueba de campo abierto, y estadísticamente no hubo un cambio, se podría completar esta área de motricidad con una prueba de equilibrio. De esta manera, se descartaría algún efecto del fármaco por las distintas señalizaciones del NDR hacia áreas motoras.

En la prueba de nado forzado, el grupo control mantuvo las conductas de nado, escalamiento y menor tiempo de inmovilidad, sin presentar algún episodio de hundimiento. A diferencia de éste, los grupos bajo el protocolo de estrés tuvieron mayor tiempo de inmovilidad. De manera interesante, el grupo que fue sometido a ECI, pero que fue inyectado con S-mec+TC-2559, presentó mayor conducta de escalamiento ante la de nado exhibiendo menor tiempo de inmovilidad, y revirtiendo así, conductas típicas de la depresión que se conocen como desesperanza

aprendida. Por otra parte, la sola aplicación de S-mec (1mg/Kg) no logró disminuir las conductas tipo depresivas en los grupos sometidos a ECI. Esto concuerda con un trabajo realizado por Lippiello et al. (2008) en que se muestra que S-mec (1mg/Kg) no decreta la inmovilidad en un modelo de nado forzado en roedores.

Los efectos descritos en este trabajo sugieren que la administración de TC-2559 potenciado por S-mec, podrían ser fármacos para considerar como antidepressivos, con gran afinidad por los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  HS, y que promueven la excitabilidad de las neuronas 5-HT, lo cual aumentaría los niveles de este neurotransmisor en el SNC. A diferencia de los SSRI, la combinación de estos fármacos no involucra el mecanismo de la recaptura de 5-HT, lo cual se sabe, conduce a una desensibilización de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y al desarrollo de una resistencia al tratamiento, como se ha observado en un alto porcentaje de pacientes con depresión (Vahid-Ansari et al., 2019).

El mecanismo que se asume, en esta alternativa terapéutica, es que S-mec, al actuar como un modulador alostérico de los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  HS (Fedorov et al., 2009), facilita la acción del agonista en el sitio ortostérico de estos receptores potenciando su efecto. La combinación de ambos fármacos a bajas dosis tendría una gran selectividad al potenciar únicamente el efecto a través de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  HS. Es por ello por lo que podría proponerse como un tratamiento coadyuvante de los SSRI, ya que, al usar dosis pequeñas de los fármacos, los efectos adversos disminuirían. Sin embargo, esta propuesta tiene que ser estudiada y analizada a mayor profundidad.

Asimismo, el uso de estos fármacos considera dos de las hipótesis más importantes de la depresión: aquella que propone que una disminución de los niveles de la 5-HT en el cerebro promueve la depresión y la otra que propone que ante una hipersensibilidad del eje HHA, los niveles altos de acetilcolina se vuelven tóxicos para el cuerpo, promoviendo estados patológicos, como la depresión (Juruena et al., 2020; Sheng et al., 2021). En síntesis, este trabajo propone que el isómero de la mecamilamina, S-mec, administrado en conjunto con el agonista selectivo de los  $\alpha 4\beta 2$  HS, TC-2559 podrían cooperar para desarrollar un tratamiento farmacológico que tuviera el objetivo de disminuir las conductas tipo depresivas mejorando la calidad de vida de las personas que padecen este trastorno.

## Capítulo 6

### Conclusiones

1. La S-mec a 3 $\mu$ M incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT en el NDR.
2. El efecto de la S-mec es mediado por los receptores  $\alpha 4\beta 2$  de alta sensibilidad que se encuentran en terminales presinápticas de neuronas glutamatérgicas del NDR.
3. La dosis 1mg/kg de S-mec administrada sola no es suficiente para revertir las conductas tipo depresivos y tipo ansiosas.
4. La S-mec y el agonista TC-2559 administrados juntos a 1 mg/kg disminuye las conductas tipo depresivas en grupos de ratas bajo el protocolo de estrés crónico impredecible.

## Referencias

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association.  
<https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Antoniuk, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., & Wlodarczyk, J. (2019). Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *99*, 101–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.002>
- Azimi, M., Oemisch, M., & Womelsdorf, T. (2020). Dissociation of nicotinic  $\alpha 7$  and  $\alpha 4/\beta 2$  sub-receptor agonists for enhancing learning and attentional filtering in nonhuman primates. *Psychopharmacology*, *237*(4), 997–1010. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05430-w>
- Caldirolì, A., Capuzzi, E., Tagliabue, I., Capellazzi, M., Marcatili, M., Mucci, F., Colmegna, F., Clerici, M., Buoli, M., & Dakanalis, A. (2021). Augmentative Pharmacological Strategies in Treatment-Resistant Major Depression: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 13070.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222313070>
- Cosci, F., & Chouinard, G. (2019). The Monoamine Hypothesis of Depression Revisited: Could It Mechanistically Novel Antidepressant Strategies? En *Neurobiology of Depression* (pp. 63–73). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813333-0.00007-X>
- Dagytė, G., Den Boer, J. A., & Trentani, A. (2011). The cholinergic system and depression. *Behavioural Brain Research*, *221*(2), 574–582.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.023>
- Doherty, K., Militello, F. S., Kinnunen, T., & Garvey, A. J. (1996). Nicotine gum dose and weight gain after smoking cessation. *Journal of consulting and clinical psychology*, *64*(4), 799–807.
- Drevets, W. C., Wittenberg, G. M., Bullmore, E. T., & Manji, H. K. (2022). Immune targets for therapeutic development in depression: towards precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, *21*(3), 224–244. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00368-1>
- Ebrahimi-Ghiri, M., Mohammadi-Mahdiabadi-Hasani, M.-H., Nasehi, M., & Zarrindast, M.-R. (2020). Better antidepressant efficacy of mecamylamine in combination with L-

- NAME than with L-arginine. *Behavioural Brain Research*, 386, 112604.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112604>
- Erritzoe, D., Godlewska, B. R., Rizzo, G., Searle, G. E., Agnorelli, C., Lewis, Y., Ashok, A. H., Colasanti, A., Boura, I., Farrell, C., Parfitt, H., Howes, O., Passchier, J., Gunn, R. N., Politis, M., Nutt, D. J., Cowen, P. J., Knudsen, G. M., & Rabiner, E. A. (2022). Brain Serotonin Release Is Reduced in Patients With Depression: A [11C]Cimbi-36 Positron Emission Tomography Study With a d-Amphetamine Challenge. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.10.012>
- Fedorov, N. B., Benson, L. C., Graef, J., Lippiello, P. M., & Bencherif, M. (2009). Differential pharmacologies of mecamylamine enantiomers: Positive allosteric modulation and noncompetitive inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), 525–532. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146910>
- Fergusson, D. M., Horwood, L. J., & Lynskey, M. T. (1996). Childhood Sexual Abuse and Psychiatric Disorder in Young Adulthood: II. Psychiatric Outcomes of Childhood Sexual Abuse. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 35(10), 1365–1374. <https://doi.org/10.1097/00004583-199610000-00024>
- French, I. T., & Muthusamy, K. A. (2018). A Review of the Pedunculopontine Nucleus in Parkinson's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 99.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00099>
- Fuchs, E., & Flügge, G. (2004). Cellular consequences of stress and depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(2), 171–183.  
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2004.6.2/efuchs>
- Galindo-Charles, L., Hernandez-Lopez, S., Galarraga, E., Tapia, D., Bargas, J., Garduño, J., Frías-Dominguez, C., Drucker-Colin, R., & Mihailescu, S. (2008). Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse*, 62(8), 601–615. <https://doi.org/10.1002/syn.20526>
- Garcia-Garcia, A. L., Newman-Tancredi, A., & Leonardo, E. D. (2014). P5-HT1A receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology*, 231(4), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3389-x>
- Garduño, J., Galindo-Charles, L., Jiménez-Rodríguez, J., Galarraga, E., Tapia, D., Mihailescu, S., & Hernandez-Lopez, S. (2012). Presynaptic  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors Increase Glutamate Release and Serotonin Neuron Excitability in the Dorsal Raphe Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 32(43), 15148–15157. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0941-12.2012>

- Gaynes, B. N., Lux, L., Gartlehner, G., Asher, G., Forman-Hoffman, V., Green, J., Boland, E., Weber, R. P., Randolph, C., Bann, C., Coker-Schwimmer, E., Viswanathan, M., & Lohr, K. N. (2020). Defining treatment-resistant depression. *Depression and Anxiety*, *37*(2), 134–145. <https://doi.org/10.1002/da.22968>
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 27, Issue 9, pp. 482–491). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.07.004>
- Grupe, M., Grunnet, M., Bastlund, J. F., & Jensen, A. A. (2015). Targeting  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in Central Nervous System Disorders: Perspectives on Positive Allosteric Modulation as a Therapeutic Approach. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *116*(3), 187–200. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12361>
- Hamon, M., & Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *45*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.009>
- Hamouda, A. K., Deba, F., Wang, Z.-J., & Cohen, J. B. (2016). Photolabeling a Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) with an  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  nAChR-Selective Positive Allosteric Modulator. *Molecular Pharmacology*, *89*(5), 575–584. <https://doi.org/10.1124/mol.116.103341>
- He, L., Zeng, L., Tian, N., Li, Y., He, T., Tan, D., Zhang, Q., & Tan, Y. (2020). Optimization of food deprivation and sucrose preference test in SD rat model undergoing chronic unpredictable mild stress. *Animal Models and Experimental Medicine*, *3*(1), 69–78. <https://doi.org/10.1002/ame2.12107>
- Hernández-González, O., Mondragón-García, A., Hernández-López, S., Castillo-Rolon, D. E., Arenas-López, G., Tapia, D., & Mihailescu, S. (2020). Mechanisms of stimulatory effects of mecamylamine on the dorsal raphe neurons. *Brain Research Bulletin*, *164*, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.08.031>
- Hernández-López, S., Garduño, J., & Mihailescu, S. (2013). Nicotinic modulation of serotonergic activity in the dorsal raphe nucleus. *Reviews in the Neurosciences*, *24*(5). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0012>
- Hernández-Vázquez, F., Chavarría, K., Garduño, J., Hernández-López, S., & Mihailescu, S. P. (2014). Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neurophysiology*, *112*(12), 3154–3163. <https://doi.org/10.1152/jn.00223.2014>

- Hillhouse, T. M., & Porter, J. H. (2015). A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 23(1), 1–21. <https://doi.org/10.1037/a0038550>
- Hogg, R. C., Raggenbass, M., & Bertrand, D. (s/f). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. En *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (pp. 1–46). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0005-1>
- Huang, K. W., Ochandarena, N. E., Philson, A. C., Hyun, M., Birnbaum, J. E., Cicconet, M., & Sabatini, B. L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.46464>
- Imai, H., Steindler, D. A., & Kitai, S. T. (1986). The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 243(3), 363–380. <https://doi.org/10.1002/cne.902430307>
- Juruena, M. F., Eror, F., Cleare, A. J., & Young, A. H. (2020). *The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety* (pp. 141–153). [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_9)
- Kauer, J. A., & Polter, A. M. (2019). Two-Pronged Control of the Dorsal Raphe by the VTA. *Neuron*, 101(4), 553–555. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.059>
- Lee, S.-H., & Cho, S. J. (2021). *Cognitive Behavioral Therapy and Mindfulness-Based Cognitive Therapy for Depressive Disorders* (pp. 295–310). [https://doi.org/10.1007/978-981-33-6044-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-33-6044-0_16)
- Li, L., Zhang, L.-Z., He, Z.-X., Ma, H., Zhang, Y.-T., Xun, Y.-F., Yuan, W., Hou, W.-J., Li, Y.-T., Lv, Z.-J., Jia, R., & Tai, F.-D. (2021). Dorsal raphe nucleus to anterior cingulate cortex 5-HTergic neural circuit modulates consolation and sociability. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.67638>
- Li, Y.-F. (2020). A hypothesis of monoamine (5-HT) – Glutamate/GABA long neural circuit: Aiming for fast-onset antidepressant discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 208, 107494. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107494>
- Lippiello, P. M., Beaver, J. S., Gatto, G. J., James, J. W., Jordan, K. G., Traina, V. M., Xie, J., & Bencherif, M. (2008). TC-5214 (S-(+)-Mecamylamine): A Neuronal Nicotinic Receptor Modulator with Antidepressant Activity. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14(4), 266–277. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00054.x>
- Liu, B., Liu, J., Wang, M., Zhang, Y., & Li, L. (2017). From Serotonin to Neuroplasticity: Evolvement of Theories for Major Depressive Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00305>

- Liu, J., Ning, W., Zhang, N., Zhu, B., & Mao, Y. (2024). Estimation of the Global Disease Burden of Depression and Anxiety between 1990 and 2044: An Analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Healthcare*, *12*(17), 1721. <https://doi.org/10.3390/healthcare12171721>
- Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., Chen, H., Zhu, D.-Y., & Zhou, Q.-G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, *13*(7), 1686–1698. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0011-z>
- López-Echeverri, Y. P., Cardona-Londoño, K. J., Garcia-Aguirre, J. F., & Orrego-Cardozo, M. (2023). Effects of serotonin transporter and receptor polymorphisms on depression. *Revista Colombiana de Psiquiatría (English ed.)*, *52*(2), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.rcpeng.2021.07.003>
- Maggio, N., & Segal, M. (2019). Stress, Corticosterone, and Hippocampal Plasticity. En *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 93–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00008-4>
- Martinez-Gonzalez, C., Bolam, J. P., & Mena-Segovia, J. (2011). Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Frontiers in neuroanatomy*, *5*, 22. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00022>
- Marx, W., Penninx, B. W. J. H., Solmi, M., Furukawa, T. A., Firth, J., Carvalho, A. F., & Berk, M. (2023). Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, *9*(1), 44. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00454-1>
- McCarron, R. M., Shapiro, B., Rawles, J., & Luo, J. (2021). Depression. *Annals of Internal Medicine*, *174*(5), ITC65–ITC80. <https://doi.org/10.7326/AITC202105180>
- McEwen, B. S., & Akil, H. (2020). Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. *The Journal of Neuroscience*, *40*(1), 12–21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019>
- McGranahan, T. M., Patzlaff, N. E., Grady, S. R., Heinemann, S. F., & Booker, T. K. (2011).  $\alpha 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors on Dopaminergic Neurons Mediate Nicotine Reward and Anxiety Relief. *Journal of Neuroscience*, *31*(30), 10891–10902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0937-11.2011>
- Mezadri, T. J., Batista, G. M., Portes, A. C., Marino-Neto, J., & Lino-de-Oliveira, C. (2011). Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. *Journal of Neuroscience Methods*, *195*(2), 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.015>

- Michelsen, K., Prickaerts, J., & Steinbusch, H. (2008). The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. En *Serotonin&#x2013;Dopamine Interaction: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance* (pp. 233–264). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00912-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00912-6)
- Mihailescu, S., Guzmán-Marín, R., Frías Domínguez, M. del C., & Drucker-Coliín, R. (2002). Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons. *European Journal of Pharmacology*, *452*(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02244-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02244-6)
- Mineur, Y. S., Obayemi, A., Wigstrand, M. B., Fote, G. M., Calarco, C. A., Li, A. M., & Picciotto, M. R. (2013). Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3573–3578. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219731110>
- Moncrieff, J., Cooper, R. E., Stockmann, T., Amendola, S., Hengartner, M. P., & Horowitz, M. A. (2023). The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Molecular Psychiatry*, *28*(8), 3243–3256. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01661-0>
- Monteiro, S., Roque, S., de Sá-Calçada, D., Sousa, N., Correia-Neves, M., & Cerqueira, J. J. (2015). An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice. *Frontiers in Psychiatry*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00006>
- Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B. K., & Bermudez, I. (2006).  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Receptors with High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity to Long-Term Exposure to Nicotine. *Molecular Pharmacology*, *70*(2), 755–768. <https://doi.org/10.1124/mol.106.023044>
- Nakamura, K. (2013). The role of the dorsal raphé nucleus in reward-seeking behavior. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00060>
- Newman, M. B., Manresa, J. J., Sanberg, P. R., & Shytle, R. D. (2002). Anxiolytic effects of mecamylamine in two animal models of anxiety. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, *10*(1), 18–25. <https://doi.org/10.1037/1064-1297.10.1.18>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, *108*(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>

- Nickell, J. R., Grinevich, V. P., Siripurapu, K. B., Smith, A. M., & Dwoskin, L. P. (2013). Potential therapeutic uses of mecamylamine and its stereoisomers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *108*, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.04.005>
- Nollet, M. (2021). Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice. *Current Protocols*, *1*(8). <https://doi.org/10.1002/cpz1.208>
- Noviello, C. M., Gharpure, A., Mukhtasimova, N., Cabuco, R., Baxter, L., Borek, D., Sine, S. M., & Hibbs, R. E. (2021). Structure and gating mechanism of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Cell*, *184*(8), 2121–2134.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.049>
- Oyola, M. G., & Handa, R. J. (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*, *20*(5), 476–494. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523>
- Papke, R. L., Stokes, C., Muldoon, P., & Imad Damaj, M. (2013). Similar activity of mecamylamine stereoisomers in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, *720*(1–3), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.018>
- Paquelet, G. E., Carrion, K., Lacefield, C. O., Zhou, P., Hen, R., & Miller, B. R. (2022). Single-cell activity and network properties of dorsal raphe nucleus serotonin neurons during emotionally salient behaviors. *Neuron*, *110*(16), 2664–2679.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.015>
- Parajulee, A., & Kim, K. (2023). Structural studies of serotonin receptor family. *BMB Reports*, *56*(10), 527–536. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2023-0147>
- Petrakis, I. L., Ralevski, E., Gueorguieva, R., O'Malley, S. S., Arias, A., Sevarino, K. A., Jane, J. S., O'Brien, E., & Krystal, J. H. (2018). Mecamylamine treatment for alcohol dependence: a randomized controlled trial. *Addiction*, *113*(1), 6–14. <https://doi.org/10.1111/add.13943>
- Philip, N. S., Carpenter, L. L., Tyrka, A. R., & Price, L. H. (2010). Nicotinic acetylcholine receptors and depression: a review of the preclinical and clinical literature. *Psychopharmacology*, *212*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1932-6>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*, *76*(1), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- Picciotto, M. R., Lewis, A. S., van Schalkwyk, G. I., & Mineur, Y. S. (2015). Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: A potential pathway to modulate aggression and related behavioral states. *Neuropharmacology*, *96*, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.028>

- Pomerleau, O. F., & Pomerleau, C. S. (1984). Neuroregulators and the reinforcement of smoking: Towards a biobehavioral explanation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8(4), 503–513. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90007-1)
- Primo, M. J., Fonseca-Rodrigues, D., Almeida, A., Teixeira, P. M., & Pinto-Ribeiro, F. (2023). Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. *European Neuropsychopharmacology*, 77, 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2023.08.496>
- Rabenstein, R. L., Caldarone, B. J., & Picciotto, M. R. (2006). The nicotinic antagonist mecamylamine has antidepressant-like effects in wild-type but not  $\beta 2$ - or  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice. *Psychopharmacology*, 189(3), 395–401. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0568-z>
- Rose, J. E., Behm, F. M., & Westman, E. C. (1998). Nicotine–mecamylamine treatment for smoking cessation: The role of pre-cessation therapy. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 6(3), 331–343. <https://doi.org/10.1037/1064-1297.6.3.331>
- Schulz, K. M., Andrud, K. M., Burke, M. B., Pearson, J. N., Kreisler, A. D., Stevens, K. E., Leonard, S., & Adams, C. E. (2013). The effects of prenatal stress on Alpha4 Beta2 and Alpha7 hippocampal nicotinic acetylcholine receptor levels in adult offspring. *Developmental Neurobiology*, 73(11), 806–814. <https://doi.org/10.1002/dneu.22097>
- Secades-Villa, R., González-Roz, A., García-Pérez, Á., & Becoña, E. (2017). Psychological, pharmacological, and combined smoking cessation interventions for smokers with current depression: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 12(12), e0188849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188849>
- Semenova, S., Jin, X., McClure-Begley, T. D., Tadman, M. P., Marks, M. J., & Markou, A. (2018). Differential effects of withdrawal from intermittent and continuous nicotine exposure on reward deficit and somatic aspects of nicotine withdrawal and expression of  $\alpha 4\beta 2^*$  nAChRs in Wistar male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 171, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.06.002>
- Sheng, J. A., Bales, N. J., Myers, S. A., Bautista, A. I., Roueifar, M., Hale, T. M., & Handa, R. J. (2021). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14(January), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.601939>
- Shytle, R. D., Penny, E., Silver, A. A., Goldman, J., & Sanberg, P. R. (2002). Mecamylamine (Inversine®): an old antihypertensive with new research directions. *Journal of Human Hypertension*, 16(7), 453–457. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001416>

- Shytle, R. D., Silver, A. A., Lukas, R. J., Newman, M. B., Sheehan, D. V., & Sanberg, P. R. (2002). Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Molecular Psychiatry*, 7(6), 525–535. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001035>
- Singh, K., Lee, H., Sealock, J. M., Miller-Fleming, T., Straub, P., Cox, N. J., Wells, Q. S., Smoller, J. W., Hodges, E. C., & Davis, L. K. (2024). Genes associated with depression and coronary artery disease are enriched for cardiomyopathy and inflammatory phenotypes. *Nature Mental Health*, 2(5), 574–582. <https://doi.org/10.1038/s44220-024-00219-z>
- Strekalova, T., Liu, Y., Kiselev, D., Khairuddin, S., Chiu, J. L. Y., Lam, J., Chan, Y.-S., Pavlov, D., Proshin, A., Lesch, K.-P., Anthony, D. C., & Lim, L. W. (2022). Chronic mild stress paradigm as a rat model of depression: facts, artifacts, and future perspectives. *Psychopharmacology*, 239(3), 663–693. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05982-w>
- Takahashi, A., Durand-de Cuttoli, R., Flanigan, M. E., Hasegawa, E., Tsunematsu, T., Aleyasin, H., Cherasse, Y., Miya, K., Okada, T., Keino-Masu, K., Mitsui, K., Li, L., Patel, V., Blitzer, R. D., Lazarus, M., Tanaka, K. F., Yamanaka, A., Sakurai, T., Ogawa, S., & Russo, S. J. (2022). Lateral habenula glutamatergic neurons projecting to the dorsal raphe nucleus promote aggressive arousal in mice. *Nature Communications*, 13(1), 4039. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31728-z>
- Tao, R., & Ma, Z. (2012). Neural Circuit in the Dorsal Raphe Nucleus Responsible for Cannabinoid-Mediated Increases in 5-HT Efflux in the Nucleus Accumbens of the Rat Brain. *ISRN Pharmacology*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/276902>
- Vahid-Ansari, F., Zhang, M., Zahrai, A., & Albert, P. R. (2019). Overcoming Resistance to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Targeting Serotonin, Serotonin-1A Receptors and Adult Neuroplasticity. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00404>
- Van Bockstaele, E. J., Biswas, A., & Pickel, V. M. (1993). Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Research*, 624(1–2), 188–198. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90077-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90077-Z)
- Walker, E. P., & Tadi, P. (2024). *Neuroanatomy, Nucleus Raphe*.
- Wang, H.-L., Zhang, S., Qi, J., Wang, H., Cachepe, R., Mejias-Aponte, C. A., Gomez, J. A., Mateo-Semidey, G. E., Beaudoin, G. M. J., Paladini, C. A., Cheer, J. F., & Morales, M. (2019). Dorsal Raphe Dual Serotonin-Glutamate Neurons Drive Reward by

- Establishing Excitatory Synapses on VTA Mesoaccumbens Dopamine Neurons. *Cell Reports*, 26(5), 1128-1142.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.014>
- Waselus, M., Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. J. (2011). Collateralized dorsal raphe nucleus projections: A mechanism for the integration of diverse functions during stress. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41(4), 266–280. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.011>
- Willner, P. (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, 6, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.002>
- Won, E., & Ham, B.-J. (2016). Imaging genetics studies on monoaminergic genes in major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.03.014>
- Wu, M., Puddifoot, C. A., Taylor, P., & Joiner, W. J. (2015). Mechanisms of Inhibition and Potentiation of  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors by Members of the Ly6 Protein Family. *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24509–24518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.647248>
- Yang, J., Pei, Y., Pan, Y.-L., Jia, J., Shi, C., Yu, Y., Deng, J.-H., Li, B., Gong, X.-L., Wang, X., Wang, X.-M., & Ma, X. (2013). Enhanced Antidepressant-Like Effects of Electroacupuncture Combined with Citalopram in a Rat Model of Depression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/107380>
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *Journal of Visualized Experiments*, 97. <https://doi.org/10.3791/52587>
- Yohn, C. N., Gergues, M. M., & Samuels, B. A. (2017). The role of 5-HT receptors in depression. *Molecular Brain*, 10(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0306-y>
- Zhao, H., Zhang, B.-L., Yang, S.-J., & Rusak, B. (2015). The role of lateral habenula–dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. *Behavioural Brain Research*, 277, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.016>