



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis temporal de la conducta motora y astrocitos de la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala basolateral en ratas macho de la cepa Wistar con bulbectomía olfatoria

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Mario Alberto Bautista Carro

Director

Dr. Julio César Morales Medina

Tlaxcala, Tlaxcala

Enero 2023



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis temporal de la conducta motora y astrocitos de la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala basolateral en ratas macho de la cepa Wistar con bulbectomía olfatoria

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Mario Alberto Bautista Carro

Comité Tutorial

Dr. Francisco Castelán

Dr. Alfonso Díaz Fonseca

Dr. Julio César Morales Medina

Tlaxcala, Tlaxcala

Enero 2023

Financiamiento

La presente tesis se realizó en el Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA-CINVESTAV) Dr. Carlos Beyer Flores de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Julio César Morales Medina.

Se contó con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número 775675. Ya que, la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrada en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad.

Oficio de autorización



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC)
Maestría en Ciencias Biológicas
Proceso: Posgrado CTBC
Registro: Carta Autorización de Impresión de Tesis

Código: 503-RGE-26

Revisión: 03

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Mario Alberto Bautista Carro** realiza para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “**Análisis temporal de la conducta motora y astrocitos de la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala basolateral en ratas macho Wistar con bulbectomía olfatoria** ”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 14 DE NOVIEMBRE DEL 2022

DR. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA

DR. FRANCISCO CASTELAN

DR. ALFONSO DÍAZ FONSECA

Gonzalo
Flores A

Firmado digitalmente por Gonzalo Flores A
Nombre de reconocimiento (DN): cn=Gonzalo
Flores A, ou=IBAS, ou=Instituto de Biología,
email=gonzalo.flores@correos.unp.mx, c=MX
Fecha: 2022.11.30 11:41:44 -0600'

DR. GONZALO FLORES ALVAREZ

DR. KURT LEROY HOFFMAN

Oficio de autorización del comité de bioética



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.

*Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. San Pedro Zacatenco
México, D.F., C.P. 07300*

LABORATORIO TLAXCALA

COMITÉ ACADÉMICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por el estudiante **Mario Alberto Bautista Carro** titulada “**Análisis temporal de la conducta motora y astrocitos de la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala basolateral en ratas macho de la cepa Wistar con bulbectomía olfatoria**” para optar por su grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Mario Alberto Bautista Carro** fue revisado por mí como director de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de noviembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando 11% de similitud general. Las similitudes se observaron en la sección de hoja de presentación, agradecimientos, índice y metodología, correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que **el estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlax., a 22 de Noviembre de 2022

Dr. Julio César Morales Medina
Director de tesis

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por mi formación académica.

Al CONACyT por otorgarme la beca nacional de posgrado (775675) durante el periodo 01/agosto/2020 - 31/julio/2022.

Al Centro de Investigación en Reproducción Animal Dr. Carlos Beyer Flores, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, en especial a la coordinadora Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel.

Al Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, en especial a la Dra. Arely Anaya Hernández, por el apoyo brindado.

A mi director de tesis y mentor en la ciencia el Dr. Julio César Morales Medina, por toda su generosidad, conocimientos y experiencia científica. Además, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por la confianza en la realización de este trabajo de investigación. Gracias por su tiempo, orientación y confianza en la revisión cuidadosa de esta tesis.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Alfonso Díaz Fonseca y el Dr. Francisco Castelán, por sus acertados comentarios, consejos y por el tiempo dedicado durante las sesiones tutoriales y la revisión de esta tesis.

Al Dr. Gonzalo Flores Alvarez y al Dr. Kurt Leroy Hoffman por sus comentarios y guía en la revisión de esta tesis.

Por último, agradezco a mis compañeros de laboratorio Gumaro y Paty por todo el trabajo en equipo que desarrollamos como estudiantes de posgrado.

Agradecimientos a título personal

A mis padres Noemi Carro y Luis Alberto Bautista, por los mejores ejemplos de fortaleza, perseverancia y constancia. Además, por sus motivaciones y apoyo durante este periodo como estudiante de posgrado. Pero, sobre todo, gracias por su amor.

A mis pequeños sobrinos Ricardo, Alberto y Regina, por recordarnos sin tapujos la felicidad de la vida y porque llenan nuestros días de alegría. Espero se desarrollen profesionalmente.

Dedicatoria

A mi querida y amada novia Yoselin Castillo.
Por más días brillando y caminando juntos.

Resumen

Análisis *post mortem* de pacientes diagnosticados con depresión han demostrado alteraciones de astrocitos en diferentes áreas neuronales fronto-límbicas. La bulbectomía olfatoria (OBX) es un modelo animal de depresión que genera cambios en el número y morfología de astrocitos en áreas neuronales de roedores, así como una adaptación deficiente a entornos nuevos y comportamiento similar a la ansiedad en la prueba de campo abierto. Nuestra hipótesis es que la OBX induce alteraciones en el número y morfología de los astrocitos en la corteza prefrontal, amígdala basolateral y las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo que se manifiestan de manera diferencial a lo largo del periodo postcirugía afectando la conducta. Por lo que, investigamos los cambios temporales de astrocitos y conductuales ocasionados por la OBX utilizando 3 grupos de ratas Wistar macho con periodos de 7, 28 y 105 días de recuperación. Nuestros resultados conductuales indican que la OBX ocasiona una adaptación deficiente a un entorno nuevo desde el día 7 y persiste hasta el día 28 postcirugía acompañado de un comportamiento similar a la ansiedad, por último, estas alteraciones son extinguidas en el día 105 postcirugía. En conjunto, en ratas con OBX 7 y 28 días postcirugía señalamos un aumento del número de astrocitos en la corteza prefrontal y en el día 105 postcirugía presentan astrocitos hipertróficos en la amígdala basolateral y la subregión CA1 del hipocampo. En conclusión, la OBX ocasiona conductas alteradas asociadas con gliosis reactiva en la corteza prefrontal en periodos específicos postcirugía.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.I	Depresión	1
I.II	Regiones cerebrales afectadas en el TDM	3
I.II.I	<i>PFC</i>	3
I.II.II	<i>Hipocampo</i>	3
I.II.III	<i>Amígdala</i>	4
I.III	Sistema olfativo	4
I.IV	Modelo de la bulbectomía olfatoria	5
I.V	Actividad locomotora en la prueba de campo abierto	7
I.VI	Neuroglia y TDM.....	8
I.VII	GFAP	10
I.VIII	Sinapsis de los astrocitos	11
II.	ANTECEDENTES.....	12
III.	JUSTIFICACIÓN	15
IV.	HIPÓTESIS.....	16
V.	OBJETIVOS	16
VI.	METODOLOGÍA	17
VI.I	Material biológico.....	17
VI.II	Cirugía de la OBX	18
VI.III	PCA.....	18
VI.IV	Perfusión intracardiaca.....	19
VI.IV.I	<i>Cirugía</i>	19
VI.IV.II	<i>Perfusión</i>	19
VI.IV.III	<i>Disección de cerebro</i>	19
VI.V	Corte del cerebro.....	20
VI.VI	Inmunohistoquímica	20
VI.VII	Criterios de inclusión	21
VI.VIII	Análisis morfológico de astrocitos.....	21
VI.VIII.I	<i>Análisis de Sholl</i>	21
VI.VIII.II	<i>Cuantificación de astrocitos</i>	21
VI.IX	Plan de análisis estadístico.....	22
VII.	RESULTADOS.....	23

VII.I	Análisis conductual y morfológico del grupo con 7 días de recuperación	23
VII.I.I	<i>Actividad motora</i>	23
VII.I.II	<i>Análisis morfológico de la CPF</i>	24
VII.I.III	<i>Análisis morfológico de BLA</i>	25
VII.I.IV	<i>Análisis morfológico de la subregión CA1 del hipocampo</i>	26
VII.I.V	<i>Análisis morfológico de la subregión CA3 del hipocampo</i>	27
VII.I.VI	<i>Análisis morfológico de la subregión del GD del hipocampo</i>	28
VII.I.VII	<i>Microfotografías representativas 7 días postcirugía</i>	29
VII.II	Análisis conductual y morfológico del grupo con 28 días de recuperación	30
VII.II.I	<i>Actividad motora</i>	30
VII.II.II	<i>Análisis morfológico de CPF</i>	31
VII.II.III	<i>Análisis morfológico de la BLA</i>	32
VII.II.IV	<i>Análisis morfológico de la subregión CA1 del hipocampo</i>	33
VII.II.V	<i>Análisis morfológico de la subregión CA3 del hipocampo</i>	34
VII.II.VI	<i>Análisis morfológico de la subregión GD del hipocampo</i>	35
VII.II.VII	<i>Microfotografías representativas 28 días postcirugía</i>	36
VII.III	Análisis conductual y morfológico del grupo con 105 días de recuperación	37
VII.III.I	<i>Actividad motora</i>	37
VII.III.II	<i>Análisis morfológico de la CPF</i>	38
VII.III.III	<i>Análisis morfológico de la BLA</i>	39
VII.III.IV	<i>Análisis morfológico de la subregión CA1 del hipocampo</i>	40
VII.III.V	<i>Análisis morfológico de la subregión CA3 del hipocampo</i>	41
VII.III.VI	<i>Análisis morfológico de la subregión GD del hipocampo</i>	42
VII.III.VII	<i>Microfotografías representativas 105 días postcirugía</i>	43
VII.IV	Análisis temporal conductual de las ratas SHAM y OBX	44
VII.V	Análisis temporal de astrocitos de la CPF	45
VII.VI	Microfotografía de astrocitos de la CPF	46
VII.VII	Análisis de correlación.....	47
VII.VII.I	<i>Grupo con 7 días de recuperación</i>	47
VII.VII.II	<i>Grupo con 28 días de recuperación</i>	47
VII.VIII	Recapitulación de cambios	48
VIII.	DISCUSIÓN	48
VIII.I	Alteraciones conductuales de la rata con OBX.....	49

VIII.II	Alteraciones morfológicas y del número de astrocitos en la rata con OBX	51
IX.	CONCLUSIÓN	54
X.	PERSPECTIVAS	55
XI.	REFERENCIAS	56
XII.	ABREVIATURAS	67
XIII.	ANEXOS	68
XIII.I	Protocolo de inmunohistoquímica de GFAP	68
XIII.II	Peso corporal después de la cirugía	70
XIII.III	Variables	71
XIII.IV	Resumen de resultados	71
XIV.	PUBLICACIÓN	73
XIV.I	Resúmenes y carteles	82
XIV.I.I	<i>Congresos internacionales y nacionales 2020</i>	82
XIV.I.II	<i>Congresos internacionales y nacionales 2021</i>	87
XIV.I.III	<i>Congresos internacionales y nacionales 2022</i>	96

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Depresión

La depresión es un trastorno mental emocional, que afecta a las personas independientemente de su edad, raza, etnia, sexo y clase social, por lo cual, mundialmente es el principal motivo de discapacidad laboral y social (WHO, 2018). Además, existe un vínculo establecido entre el suicidio y la depresión, cada año, completan el suicidio cerca de 800,000 personas en el mundo, siendo la segunda causa de muerte de personas entre 15 a 29 años de edad (WHO, 2018). En efecto, Castaneda et al., (2008), refiere que la incidencia de trastornos mentales aumenta desde la infancia y presenta picos en la adolescencia tardía, siendo este el grupo etario que completa el suicidio.

Según la American Psychiatric Association (APA), el término depresión se usa para describir condiciones transitorias leves de bajo estado de ánimo hasta trastornos psiquiátricos graves. En este sentido, la depresión menor y los episodios depresivos mayores son consideradas como respuestas a eventos importantes de la vida. Sin embargo, el trastorno depresivo mayor (TDM), está influenciado por factores genéticos y biológicos (APA, 2013). El TDM, se caracteriza por 1 o más episodios depresivos mayores, en los que hay presencia de estado de ánimo deprimido y/o pérdida de interés durante al menos 2 semanas, con 4 síntomas acompañantes de la depresión (APA, 2013). El TDM es la forma más prevalente de la depresión, convirtiéndose en una afección psiquiátrica recurrente y duradera, donde los pacientes presentan: anhedonia, desesperanza, inutilidad, culpa, fatiga, tristeza, pérdida de interés, baja autoestima, sensación de cansancio y falta de concentración (Kaufmann & Menard, 2018; WHO, 2018). Además, los pacientes señalan diversos grados sintomatológicos y consecuente a esto, pueden presentar síntomas adicionales, como: planes e intentos suicidas o pensamientos de muerte, inapetencia, insomnio y baja actividad psicomotora (Jesulola et al., 2018).

A pesar de que la investigación clínica y preclínica ha aumentado la comprensión de la fisiopatología del TDM, el fracaso de los tratamientos antidepresivos actuales es evidente. Ya que, los tratamientos farmacológicos disponibles son efectivos solo para el 30% al 50% de los pacientes con TDM (Hodes et al., 2015; Krishnan & Nestler, 2011). Este fracaso terapéutico aboga por una comprensión más integral del proceso fisiopatológico de la enfermedad, no

obstante, el principal reto para entender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la depresión es que no existe una hipótesis única que explique todos los aspectos de los signos y síntomas. De hecho, Jesulola et al., (2018) reconoce 6 hipótesis: 1) deficiencia de aminas biogénicas 2) factores genéticos, 3) ambientales, 4) inmunológicos, 5) endocrinos y 6) alteraciones de la neurogénesis adulta, incluso, se describe que puede existir una interacción y vinculación de estos factores, que contribuyen al desarrollo del TDM.

El diagnóstico del TDM se realiza mediante entrevistas clínicas estándar y usualmente suelen utilizar el electroencefalograma (EEG), sin embargo, el EEG es incapaz de proporcionar la información espacial y tiene una especificidad relativamente baja, por lo que el valor diagnóstico por este método es limitado (Dai et al., 2019). Hasta ahora, los estudios de neuroimagen han proporcionado información espacial, localizando áreas cerebrales anormales en pacientes con TDM, generando evidencia de que los síntomas psicológicos y los déficits conductuales están relacionados con anomalías estructurales y funcionales en áreas específicas del cerebro (Dai et al., 2019). Por ejemplo, en pacientes con TDM se describe que hay una reducción del volumen del hipocampo especialmente en la subregión del giro dentado (GD) (Roddy et al., 2019). Atrofia de la amígdala, corteza prefrontal (CPF) (PFC por sus siglas en inglés) CPF medial (mCPF) y dorsolateral (dlCPF) (Bludau et al., 2016; Zhang et al., 2016), lo cual se correlaciona con la intensidad de los síntomas (Dai et al., 2019). Además, al estudiar el TDM se utilizan muestras de cerebro *post-mortem*, sin embargo, existen variables incontrolables que pueden influir profundamente en el resultado, como: el historial de medicación, edad, tiempo de recolección del tejido y las condiciones de vida del individuo (Wang et al., 2017). En este sentido, los modelos animales para estudiar al TDM pueden proporcionar un entorno controlado de estas variables.

Vale la pena mencionar que los trastornos olfativos son comunes en la población, Croy et al., (2014) menciona que la pérdida olfativa impacta alrededor del 20% de la población general y pueden provocar diversas afecciones que afectan su calidad de vida. Entre las afecciones ocasionadas por los trastornos olfativos destaca el TDM (Glezer & Malnic, 2019). Asimismo, en pacientes deprimidos, se ha demostrado un volumen reducido del bulbo olfatorio (BO) y una sensibilidad olfativa disminuida (Croy et al., 2013; Negoias et al., 2010).

I.II Regiones cerebrales afectadas en el TDM

Como he mencionado, la depresión es un trastorno heterogéneo donde las características de las múltiples regiones cerebrales que subyacen a la depresión aún no se conocen por completo. Otro factor importante es, que gran parte de los estudios previos han analizado una sola región cerebral y su relación con la depresión. El circuito fronto-límbico que incluye a la PFC, la corteza cingulada, el hipocampo, la amígdala, las estructuras inferiores del tronco encefálico y los ganglios basales están involucrados en la mediación del procesamiento de las emociones, y estas regiones se alteran estructural y funcionalmente en pacientes con depresión (Ongur, 2000). Por lo tanto, el TDM puede ser impulsado por una función anormal simultánea de múltiples regiones cerebrales. En la presente tesis, analizamos la PFC, hipocampo y amígdala en un modelo de depresión.

I.II.I PFC

La PFC se ha descrito como una de las regiones más afectadas en el TDM (Pizzagalli & Roberts, 2022). En el humano, la neuroanatomía más ampliamente aceptada de la PFC basada en la conectividad anatómica del cerebro y la especialización funcional, es entre los sectores dlPFC y ventromedial (vmPFC) (Zald, 2007). Donde, la dlPFC, tiene interconexiones densas con áreas premotoras, los campos oculares frontales y la corteza parietal lateral, por lo que, se asocia con funciones cognitivas y ejecutivas (Koenigs & Grafman, 2009). Por otro lado, las proyecciones de la vmPFC incluyen al hipotálamo y el gris periacueductal, que median la actividad autonómica visceral asociada con la emoción, y el estriado ventral, que indica recompensa y valor motivacional, por lo que, se le atribuye funciones emocionales y afectivas (Koenigs & Grafman, 2009). Además, la PFC tiene amplias conexiones con todas las estructuras y áreas límbicas (Ongur, 2000; Koenigs & Grafman, 2009).

I.II.II Hipocampo

El hipocampo presenta una conectividad interrelacionada denominada “bucle trisináptico”, ya que, la primera y principal entrada sináptica hacia el hipocampo la proporciona la corteza entorrinal, con sus proyecciones a través de la ruta perforante a la región del GD (Knierim, 2015). La segunda conexión sináptica se proyecta desde el GD a la región CA3 a través de la vía de la fibra musgosa; y la tercera conexión sináptica conecta la región CA3 que se proyecta

a la región CA1 por la vía Schaffer Colateral (Knierim, 2015). Finalmente, CA1 proyecta conexiones sinápticas hacia la corteza entorrinal, completando el bucle sináptico (Knierim, 2015). Además de las principales entradas de la corteza entorrinal, el hipocampo recibe entradas directas de la amígdala, y la región CA1 del hipocampo se proyecta hacia la amígdala y la PFC (Knierim, 2015). Así pues, el hipocampo juega un papel en la codificación de contextos espaciales y o temporales (Kaplan et al., 2014).

I.II.III Amígdala

La amígdala consiste en una división denominada, “región cortico-medial” que está asociada con el sistema olfativo, esta región incluye los núcleos cortical, medial y central; y una división denominada, “la región basolateral” que está asociada con la neocorteza y consiste en los núcleos basal, lateral y accesorio (LeDoux, 2007). La amígdala, participa en la detección de amenazas y el condicionamiento del miedo y el estrés (Ongur, 2000). En específico, la amígdala basolateral (BLA) es el sitio principal que recibe entradas de los sistemas sensoriales: el sistema visual, auditivo, somatosensorial, olfativo y gustativo (LeDoux, 2007). Asimismo, estudios en roedores confirman la participación de BLA en comportamientos similar a la ansiedad, puesto que, se ha demostrado que la inactivación de BLA interrumpe la conducta ansiogénica, además, en estudios de neuroimagen se ha demostrado su participación en los trastornos de ansiedad (Sah, 2017).

I.III Sistema olfativo

El sistema olfativo es una modalidad sensorial crucial para los comportamientos de supervivencia y adaptación del comportamiento (Su et al., 2009). Dentro de la cavidad nasal, en el epitelio olfativo (OE) se encuentran las neuronas sensoriales olfatorias (OSNs) y se proyectan a la capa glomerular del BO; donde el olor es percibido y las OSNs establecen sinapsis con las células mitrales y en penacho del BO (Hasegawa et al., 2022). Las células mitrales y en penacho posteriormente envían información sensorial olfativa a las regiones corticales olfatorias primarias: el núcleo olfatorio anterior (AON) y la corteza piriforme (PirC) (Hasegawa et al., 2022). Se han descubierto conexiones de circuitos neuronales entre el sistema olfativo y la mPFC y la corteza orbitofrontal (OFC), que están asociadas con la cognición, la memoria, la motivación y la emoción, es decir, las vías BO-AON-mPFC y BO-PirC-OFC (figura 1).

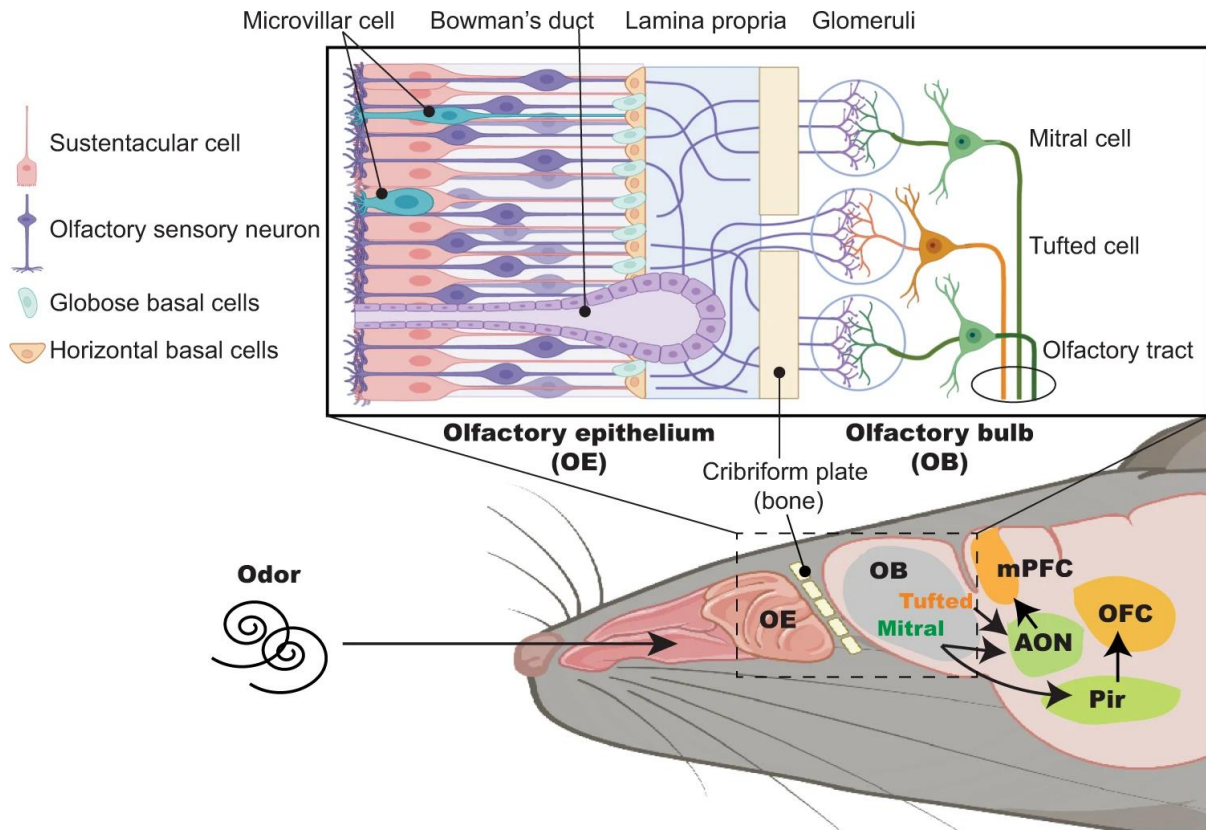


Figura 1. Representación esquemática del OE, bulbo olfatorio (OB por sus siglas en inglés) y la conexión neural entre el sistema olfativo y las regiones prefrontales. Tomado de Hasegawa et al., 2022.

L.IV Modelo de la bulbectomía olfatoria

Los modelos animales de depresión son clave para elucidar los mecanismos subyacentes a la condición humana, ya que, son utilizados para investigar diversos aspectos de la neurobiología de la enfermedad y para el diseño de nuevos tratamientos (Willner & Mitchell, 2002). Además, un modelo animal confiable debe representar a una enfermedad en tres niveles: 1) validez de constructo: reproducir factores inductores que subyacen a la enfermedad, 2) validez aparente: imitar la fenomenología, como síntomas característicos y 3) validez predictiva: predecir la respuesta a tratamientos farmacológicos disponibles (Lipska, 2000).

La bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) es un modelo animal de depresión con validez predictiva, aparente y de constructo (tabla 1) (Willner & Mitchell, 2002). Ya que, conduce a una variedad de cambios, los cuales son: neuroquímicos, por ejemplo, reducción de noradrenalina, serotonina, acetilcolina y alteraciones de glutamato; endocrinos, por ejemplo, hipersecreción del

glucocorticoide corticosterona; inmunológicos, por ejemplo, reducción de leucocitos y linfocitos; semejantes a los cambios observados en pacientes deprimidos (Kelly et al., 1997). Lo cual se relaciona con 3 de las hipótesis contempladas en la etiología del TDM según Jesulola et al., (2018). Además, la OBX induce cambios de comportamientos característicos de conductas tipo depresivas, como una disminución del tiempo de nado y un aumento del tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, interpretado como un estado de desesperanza al escape (Morales-Medina et al., 2013). Por lo que, este modelo permite la investigación de variables importantes consideradas en el TDM.

	Validity			Sum	Evaluation	
	Predictive	Face	Construct		Depression	Dysthymia
Genetic models						
Congenital learned helplessness	+	+	+	3	+	0
Muscarinic hypersensitivity (FLS)	+	++	0	3	+	+
Roman high-avoidance	0	0	0	0	0	0
Fawn hooded	+	+	0	2	+	+
Genomic models						
HPA transgenic	+	0	+	2	+	+
5-HT transporter knockout	0	0	0	0	0	0
CRH receptor subtypes knockouts	0	0	0	0	0	0
Tachykinin receptor knockout	0	+	0	1	+	+
Developmental models						
Neonatal antidepressant treatment	0	++	+	3	+	+
Prenatal/neonatal stress	0	+	0	1	0	0
Lesion model						
Olfactory bulbectomy	++	+	+	4	++	+

Tabla 1. Evaluación de modelos animales de depresión. 0 sin evidencia positiva, o sin exceso de evidencia positiva sobre la negativa; + pequeña cantidad de evidencia positiva, o pequeño exceso de evidencia positiva sobre la negativa; ++ cantidad moderada de evidencia positiva, o gran exceso de evidencia positiva sobre la negativa; +++ gran cantidad de pruebas positivas, con poca o ninguna evidencia negativa. Modificado de Willner & Mitchell, (2002).

La OBX consiste en eliminar por succión los OB que son estructuras alargadas bilaterales que derivan del telencéfalo rostral, por lo que, la OBX destruye aproximadamente el 4% de la masa encefálica total en la rata adulta, privando completamente a la rata de señales olfativas (Cain, 1974). El sistema olfativo, se considera una modalidad sensorial que transmite información al sistema nervioso central (SNC), específicamente, al sistema límbico (Lombion-Pouthier et al., 2006). Donde, los BO son la primera estación de procesamiento de información olfativa. Ya que, las fibras centrípetas de los BO conectan a diversas estructuras, como el área paraolfatoria, el uncus, la amígdala, los núcleos habenules, el hipotálamo, el hipocampo, la formación reticular y entorrinal, parahipocampo y PirC, asimismo, mediante fibras centrifugas retornan a los BO (van Riezen & Leonard, 1990). Por lo que, la OBX genera un deterioro de las neuronas que se proyectan hacia y desde los BO (van Riezen & Leonard, 1990).

I.V Actividad locomotora en la prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto (PCA) se desarrolló en 1934 inicialmente llamado aparato de Hall, convirtiéndose en uno de los experimentos más famosos en la psicología animal (Hall, 1934). En esta prueba, el roedor se coloca en el centro del campo y se registra la locomoción, siendo el número de los cuadrantes recorridos en los que está dividido el campo (Kelly et al., 1997). Además, otros parámetros evaluados dentro de la PCA bien definidos son, la frecuencia de erguidos y acicalamientos del roedor (Prut & Belzung, 2003).

En este caso, un aumento de la locomoción en la rata con OBX es interpretada como una falta de adaptación a la novedad ambiental (Kelly et al., 1997; Song and Leonard, 2005; Morales-Medina et al, 2013). El aumento de la locomoción en la PCA es una de las conductas alteradas más tempranas y ampliamente aceptadas relacionados con la OBX (van Riezen & Leonard, 1990). Los acicalamientos y erguidos representan formas diferentes de actividad motora en las ratas (Sousa et al., 2006). Por ejemplo, los erguidos (siendo cuando un mamífero de 4 patas se para en sus extremidades traseras levantando las delanteras) representan funcionalmente comportamientos exploratorios, ya que, recopila información visual, auditiva, olfativa y somatosensorial cuando se apoya en las paredes (Kozler et al., 2017; Lever et al., 2006). Sin embargo, los erguidos están modulados con el comportamiento emocional, ya que, en condiciones de ansiedad las ratas aumentan la frecuencia de erguidos en la PCA (C. Lever et al.,

2006; Sturman et al., 2018). En cambio, los acicalamientos son considerados comportamientos de confort, ya que está dirigida al mantenimiento de la higiene del roedor (Kozler et al., 2017). El acicalamiento es una transición progresiva en orden de 7 estadios: lamido de la extremidad delantera, lavado de la nariz, de la cara, de la cabeza, del cuerpo y lamido del pelo, de la extremidad inferior, lamido y lavado de la cola y los genitales (Kalueff & Tuohimaa, 2004). Sin embargo, en condiciones estresantes los roedores demuestran un aumento de la frecuencia de acicalamientos, incompletos o invertidos (Kalueff & Tuohimaa, 2004). Las alteraciones de las conductas en la PCA pueden ser indicativos de procesos neurológicos alterados y, por lo tanto, pueden reflejar una función cerebral anormal (Kraeuter et al., 2019).

En la rata, la vía corticoespinal apoyada por los sistemas motores extrapiramidales es esencial para la locomoción, además, los erguidos se generan desde la mPFC, la amígdala y el hipocampo y los acicalamientos son generados en el estriado junto con el tronco encefálico (Kozler et al., 2017). El hipocampo humano es una región involucrada en la codificación de la novedad, ya que, mediante el uso de resonancia magnética funcional, se muestra un aumento de su actividad (Kaplan et al., 2014). En particular, el hipocampo anterior se activa principalmente después de la presentación de estímulos nuevos, mientras que el hipocampo posterior se activa después de la presentación de estímulos familiares (Kaplan et al., 2014). Puesto que, el modelo de la OBX induce atrofia dendrítica y disminución de la proliferación celular en neuronas del hipocampo (Morales-Medina et al., 2013), es de esperarse alteraciones en la PCA. Además, se ha reportado que la habituación a la PCA no se desarrolla en ratas con lesiones en la PFC (Sousa et al., 2006).

I.VI Neuroglia y TDM

La neuroglia del SNC puede clasificarse en cuatro tipos: astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales; y en el sistema nervioso periférico (SNP) se clasifican en: las células de Schwann y las células satélite (Tortora & DeFricks, 2013). Los astrocitos son las células gliales más numerosas y se reconocen dos subtipos: astrocitos protoplasmáticos y fibrosos que residen en la materia gris y blanca, respectivamente (Zubieta et al., 2002). Los astrocitos son células multitarea y se denota por el hecho de que pueden envolver de 100 mil a 2 millones de sinapsis en roedores y humanos (Jurga et al., 2021). Los astrocitos están involucrados en numerosas funciones, como la respuesta a una lesión, la participación en la defensa inmune, la

transferencia de nutrientes a neuronas, homeostasis iónica del neuropilo y apoyo al metabolismo cerebral de la glucosa (Coyle & Schwarcz, 2000). Los astrocitos son los encargados de mantener la homeostasis sináptica eliminando el exceso de glutamato, mediante el transportador 2 de aminoácidos excitadores (EAAT2), conocido como transportador de glutamato 1 (GLT1) en roedores, que se encuentra exclusivamente en los astrocitos (Blackburn et al., 2009). En resumen, la captación de glutamato por astrocitos sucede tras la entrada de 3 iones de sodio y 1 protón, con la salida de 1 ion de potasio, finalmente, el glutamato se recicla en glutamina y se libera para ser reutilizada por las neuronas como glutamato (Blackburn et al., 2009). Además, participan en la regulación del líquido extracelular del SNC gracias a la formación de la barrera hematoencefálica, junto con las células endoteliales y los pericitos (Jurga et al., 2021). Asimismo, los astrocitos apoyan la neurogénesis mediante la liberación de neurotrofinas y ayudan en la diferenciación e integración de neuronas nuevas en el hipocampo de los mamíferos adultos, en conjunto, pueden servir como células progenitoras después de una lesión traumática del SNC (Cope & Gould, 2019; Jurga et al., 2021). En este sentido, los astrocitos son responsables de la remodelación estructural y de la integridad de los circuitos neuronales.

La disfunción de los astrocitos se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Cope & Gould, 2019). Ya que, los astrocitos pueden responder con cambios funcionales y morfológicos a las alteraciones en los sistemas de neurotransmisores implicados tanto en los trastornos del estado de ánimo como en la respuesta terapéutica a los medicamentos psicotrópicos (Miguel-Hidalgo et al., 2000). En condiciones patológicas, los astrocitos muestran hipertrofia del cuerpo y de sus prolongaciones, con una sobreexpresión de la proteína acida fibrilar glial (GFAP) (Escartin et al., 2019). También, la inmunoreactividad de GFAP se regula mediante la activación de los receptores adrenérgicos y serotoninérgicos, que desempeñan un papel crucial en los trastornos del estado de ánimo (Potter, 1996). En efecto, investigaciones neuroanatómicas de los circuitos corticales fronto-límbicos han sugerido densidades y patrones de distribución de astrocitos alterados en el TDM (Coyle & Schwarcz, 2000; Hercher et al., 2009).

De este modo, los astrocitos pueden actuar de forma citotóxica o citoprotectora, dependiendo de su fenotipo de activación actual (Jurga et al., 2021). Por lo que, es importante reconocer sus

estados fenotípicos a través de marcadores específicos como la GFAP. Por tanto, los astrocitos representan un objetivo para estudiar la etiología del TDM, sin embargo, los mecanismos y el posible papel de los astrocitos en la patogénesis del TDM siguen siendo en gran parte desconocido. Por lo que, evaluaremos la evolución del comportamiento motor y su asociación con la morfología y presencia de astrocitos en la rata con OBX a tres tiempos críticos postcirugía en grupos independientes.

I.VII GFAP

La GFAP es una proteína del filamento III intermedio que se encuentra en los astrocitos del SNC, las células de Schwann no mielinizantes del SNP y las células gliales entéricas (Yang & Wang, 2015). En el SNC, la GFAP se expresa predominantemente en astrocitos, sin embargo, su progenitor primario es la glía radial, la cual también genera neuronas, a pesar de esto, a medida que se diferencian los astrocitos aumenta la expresión de GFAP completando su maduración (Messing & Brenner, 2020). Por lo que es importante mencionar que, las neuronas y las células madre neurogénicas de la zona subgranular en el hipocampo no pueden expresar ningún GFAP detectable (Bradley et al., 2019). Es así, que desde su descubrimiento la GFAP fue utilizada como biomarcador proteico de astrocitos en el SNC (Messing & Brenner, 2020). Una de las ventajas de la GFAP como biomarcador es que muestra una fuerte especificidad y altos niveles de expresión en el cerebro (Yang & Wang, 2015). Además, la GFAP marca astrocitos de ramificación extensa y ligeramente su cuerpo celular, por lo que, es el mejor marcador para estudiar la morfología de los astrocitos complejos (Jurga et al., 2021). La similitud a nivel de proteínas entre humanos, ratones y ratas es de un 90%, por lo que, se investiga en los niveles clínicos y preclínicos (Brenner et al., 1994; Messing & Brenner, 2020).

La GFAP es la responsable de la estructura del citoesqueleto citoplasmático y brinda soporte estructural, detección mecánica del entorno extracelular y el andamiaje de enzimas y orgánulos (Lowery et al., 2015), así como de apoyar a neuronas cercanas y la barrera hematoencefálica (Yang & Wang, 2015). En condiciones normales, la GFAP muestra variación en sus niveles de expresión unicelular *in vivo* e *in vitro*, sin embargo, durante lesiones o enfermedades los astrocitos entran en un estado de "gliosis reactiva" generando hiper expresión de GFAP (Potter, 1996). Además, los astrocitos experimentan hipertrofia celular y proliferación, es decir,

aumentan su tamaño (procesos engrosados y alargados) y el número de células (Yang & Wang, 2015) a través de la participación de GFAP en la red de filamentos intermedios. Por lo tanto, la expresión de GFAP es un indicador de gliosis asociada con una lesión o enfermedad cerebral (Messing & Brenner, 2020). La gliosis reactiva posterior a la lesión cerebral puede ser beneficiosa para el proceso de recuperación, mientras que la gliosis excesiva tendrá un impacto negativo en la recuperación estructural y funcional del cerebro (Yang & Wang, 2015).

I.VIII Sinapsis de los astrocitos

Además del clásico flujo de información “sinapsis bipartita” solo entre neuronas presinápticas y postsinápticas, los astrocitos, se comunican por sinapsis con otras células y vasos sanguíneos (Jurga et al., 2021). Por lo que el término “sinapsis tripartita” se refiere a la comunicación bidireccional entre un proceso de astrocito y membranas neuronales presinápticas y postsinápticas (Perea et al., 2009). Las prolongaciones de los astrocitos envuelven las sinapsis aferentes y eferentes de las neuronas, por lo que, se sugiere que los astrocitos regulan la señalización sináptica (Cope & Gould, 2019). Es importante aclarar que no todas las sinapsis son funcionalmente tripartitas, sin embargo, en el hipocampo hasta el 40% de las sinapsis excitadoras están cubiertas por prolongaciones de astrocitos (Perea et al., 2009). Además, Jurga et al., (2021) menciona dos sinapsis más específicas: la “cuatripartita” para terminales neuronales presinápticas, postsinápticas, procesos de astrocitos y microglía y la “tetrapartita” incluyendo a lo anterior una matriz extracelular. Por lo que, las neuronas, la glía y su entorno son socios en la sinapsis.

Perea et al., (2009) menciona que los astrocitos en el comportamiento animal representan el último desafío para el concepto de sinapsis tripartita. En este aspecto, el papel de los astrocitos en áreas cognitivas como el hipocampo, la amígdala y la PFC asociado a conductas codificantes de esta región pueden mejorar nuestra comprensión y en un futuro sirva a nuevas oportunidades terapéuticas contribuyendo a la literatura sobre la etiología de la depresión.

II. ANTECEDENTES

En una investigación *post mortem* realizado en muestras de corteza cingulada anterior (CAA) de pacientes humanos deprimidos que completaron el suicidio, los astrocitos fibrosos tenían cuerpos celulares significativamente más grandes y más ramificados que los controles (Torres-Platas et al., 2011). Igualmente, Torres-Platas et al., (2011) reportó que el número de espinas a lo largo de las prolongaciones fueron casi dos veces más altos que los controles. En efecto, la presencia de astrocitos hipertróficos en la CAA es consistente con los informes que sugieren alteraciones de la materia blanca en el TDM (Maes et al., 2009), por lo que, proporciona un apoyo adicional a la teoría neuro inflamatoria de la depresión. Asimismo, en otro estudio *post mortem* en secciones de la dlPFC de adultos jóvenes y mayores diagnosticados con TDM, se encontró que los pacientes más jóvenes tienden a exhibir hipertrofia de astrocitos en comparación con adultos mayores, evaluados por el marcador GFAP (Miguel-Hidalgo et al., 2000). Lo que sugiere que la patología de astrocitos podría ser un contribuyente temprano a la patogénesis subyacente del TDM. En conjunto, las observaciones histológicas y de imágenes en cerebros humanos indican que los trastornos depresivos clínicos están asociados con cambios de actividad, volumen y número de células gliales en la CPF orbital y medial, que incluyen a la CAA (Ongur, 2000).

Dos estudios que utilizaron un metaanálisis en pacientes con múltiples episodios de TDM o con una duración de al menos 2 años, demostraron que existe una reducción en el volumen y el número de astrocitos en el hipocampo (Kempton et al., 2011; McKinnon et al., 2009). Por lo que, en conjunto, el volumen y el número de astrocitos del hipocampo se correlaciona con la enfermedad (Cobb et al., 2016; Roddy et al., 2019). Por otro lado, en muestras de amígdala de pacientes *post mortem* diagnosticados con TDM marcadas con GFAP, Altshuler et al., (2010) observó reducción del número de astrocitos comparando pacientes con el trastorno bipolar, esquizofrenia y muestras *post mortem* de control normal (humanos sin enfermedades diagnosticadas).

Especie	Tiempo	Estudio	Región	Morfología	Número	Referencia
Humano	-	Post mortem	CAA	↑	-	(Torres-Platas et al., 2011).
Humano	-	Post mortem	dIPFC	↑	-	(Miguel-Hidalgo et al., 2000).
Humano	≥ 2 años	Metaanálisis	Hipocampo	-	↓	(Cobb et al., 2013; Kempton et al., 2011; McKinnon et al., 2009).
Humano	-	Resonancia magnética	GD	-	↓	(Roddy et al., 2019).
Humano	-	Resonancia magnética	CA1	-	↓	(Roddy et al., 2019).
Humano	-	Post mortem	Amígdala	-	↓	(Altshuler et al., 2010).

Tabla 2. Antecedentes de cambios diferenciales en la morfología y el número de astrocitos en humanos.

De forma semejante, en ratón macho utilizando el modelo de estrés crónico leve e impredecible (CUMS) que induce un estado depresivo, se reportó, que el número de astrocitos se redujo significativamente en la subregión del GD, el hilio y CA3 (Virmani et al., 2021). Además, la ramificación de las prolongaciones, el radio y el área total de los astrocitos marcados con GFAP se encontraba disminuida en la subregión del GD y en mucho menor medida en el hilio, CA3 y CA1 (Virmani et al., 2021). Por otro lado, en un modelo de depresión por estrés inmóvil crónico (CIS) en ratas macho Sprague Dawley, observaron en la BLA una reducción del número de astrocitos, volumen del neuropilo y en contraste el número de prolongaciones aumentó (Naskar & Chattarji, 2019). Por el contrario, en la subregión CA3 del hipocampo no hubo modificaciones (Naskar & Chattarji, 2019). (Tabla 3).

Utilizando el modelo OBX en rata macho, Burke et al., (2013) reportó una mayor expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GFAP en la amígdala exclusivamente 41 días después de la cirugía. Del mismo modo, han demostrado que las ratas Wistar con OBX exhiben aumentos del número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP así como una característica hipertrófica en la PFC 2 meses después de la cirugía (Cízková D et al., 1997). De forma semejante, 42 días después de la OBX en ratón macho de la cepa ddY, Takahashi et al., (2018) reportó que el número de astrocitos y los niveles de GFAP aumentaron en el hipocampo, asimismo, los astrocitos mostraban cuerpos celulares y prolongaciones más grandes en

comparación con sus controles. Por lo que puede haber efectos morfológicos divergentes en astrocitos dependiendo del área neuronal o subregión del hipocampo, así como del tiempo.

Además, el modelo de la OBX incrementa la actividad locomotora en la PCA 14 días (Burke et al., 2013), 27 días (Morales-Medina et al., 2013) y 29 días (Mar et al., 2002) después de la cirugía en ratas macho. Además, Morales-Medina et al., (2013) reportó un aumento en la frecuencia de los acicalamientos y postura erguida, en la PCA 27 días después de la cirugía en ratas macho con OBX.

Especie	Tiempo	Modelo	Región	Morfología	GFAP - Astrocito	Referencia
Ratas ♂ Sprague Dawley	11 días	CIS	Amígdala	↓	↓	(Naskar & Chattarji, 2019).
Ratas ♂ Sprague Dawley	11 días	CIS	CA3	-	-	(Naskar & Chattarji, 2019).
Ratón ♂ C57BL / 6J	23 días	CUMS	GD/hilio	↓	↓	(Virmani et al., 2021).
Ratón ♂ C57BL / 6J	23 días	CUMS	CA3	↓	↓	(Virmani et al., 2021).
Ratas ♂ Sprague Dawley	41 días	OBX	Amígdala	-	↑	(Burke et al., 2013).
Ratón ♂ ddY	42 días	OBX	GD	↑	↑	(Takahashi et al., 2018).
Ratas ♂ Wistar	56 días	OBX	PFC	↑	↑	(Cízková D et al., 1997).

Tabla 3. Antecedentes de cambios en el número y morfología de astrocitos en diferentes periodos.

Especie	Tiempo	Modelo	Conducta	Referencia
Ratas ♂ Sprague Dawley	14 días	OBX	↑ Locomoción	(Burke et al., 2013).
Ratas ♂ Sprague Dawley	27 días	OBX	↑ Locomoción, erguidos y acicalamientos	(Morales-Medina et al., 2013).
Ratas ♂ Sprague Dawley	29 días	OBX	↑ Locomoción	(Mar, 2002).

Tabla 4. Antecedentes de cambios de la conducta motora en la prueba de campo abierto (PCA) en el modelo OBX en diferentes periodos.

III. JUSTIFICACIÓN

La literatura señala a los astrocitos como posibles actores principales en la fisiopatología del TDM (Virmani et al., 2021). Ya que, los pacientes humanos con TDM presentan astrocitos hipertróficos en varias regiones del sistema límbico (Torres-Platas et al., 2011; Miguel-Hidalgo et al., 2000). Por lo que, estos hallazgos indican alteraciones morfológicas de astrocitos en el TDM.

Del mismo modo que en los humanos deprimidos, en el modelo OBX, han reportado astrocitos hipertróficos en el hipocampo (Takahashi et al., 2018) y la PFC (Cízková D et al., 1997) y un aumento de ARNm de GFAP en la amígdala (Burke et al., 2013). Además, han reportado un aumento de la conducta motora en la PCA a diversas etapas de recuperación (Burke et al., 2013; Mar, 2002; Morales-Medina et al., 2013). Esta alteración conductual es asociada con cambios en áreas neuronales involucradas en la codificación de la novedad y efectos ansiogénicos (Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kaplan et al., 2014; Kozler et al., 2017; Lever et al., 2006). Sin embargo, utilizando el modelo OBX, los cambios neuroconductuales se han reportado en diferentes periodos postcirugía y especies, por lo que, la morfología de astrocitos y la conducta puede depender de estas variables.

Los efectos contrastantes en modelos de depresión por estrés en comparación con el modelo OBX podrían estar dependiendo del tiempo y del grado de desarrollo de la enfermedad. Por lo que, se propone utilizar el modelo OBX para estudiar la relación entre el número y morfología de astrocitos en las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo, CPF y BLA en presencia de un análisis conductual, utilizando la PCA en tres grupos independientes postcirugía. Ya que, las investigaciones sobre los cambios ocasionados por la OBX en un periodo corto son escasos o nulos y los posibles cambios pueden indicar una reorganización astrogliar casi inmediata. Además, una perspectiva con respecto a dos periodos diferentes después de la cirugía, nos pueden aclarar cómo la evolución de un estado depresivo afecta a los astrocitos de las subregiones del hipocampo, CPF y BLA de manera diferente y su asociación con la conducta codificante de estas regiones. Por lo tanto, la presente investigación surge de tratar de colaborar a la dilucidación del TDM y así ofrecer una mayor comprensión de los sustratos neurobiológicos que puedan contribuir al diagnóstico y tratamiento oportuno de este trastorno anímico.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación (Hi)

La OBX en la rata Wistar macho adulta influye diferencialmente en las conductas motoras, el número y la morfología de astrocitos en la CPF, BLA y las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo con el curso del tiempo.

Hipótesis nula (H0)

La OBX en la rata Wistar macho adulta no influye diferencialmente en las conductas motoras, el número y la morfología de astrocitos en la CPF, BLA y las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo con el curso del tiempo.

V. OBJETIVOS

A) Objetivo general

Evaluar el efecto de la OBX en la conducta motora y su asociación con la morfología y presencia de astrocitos positivos a GFAP en la CPF, BLA y el hipocampo con respecto al curso del tiempo.

B) Objetivos particulares

Después de 7, 28 y 105 días de realizar la OBX o cirugía Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Evaluar la conducta locomotora.
- Analizar la frecuencia de erguidos y acicalamientos.
- Cuantificar los astrocitos positivos a GFAP de las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo.
- Examinar la morfología de los astrocitos en el hipocampo subregiones CA1, CA3 y GD.
- Cuantificar los astrocitos positivos a GFAP en la CPF.
- Examinar la morfología de los astrocitos en la CPF.
- Cuantificar los astrocitos positivos a GFAP en la BLA.
- Examinar la morfología de los astrocitos en la BLA.
- Identificar el efecto temporal conductual
- Distinguir el efecto temporal de los astrocitos positivos a GFAP
- Determinar la correlación conductual - astrocitos

VI. METODOLOGÍA

VI.I Material biológico

Se utilizaron 52 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de dos meses de edad, proporcionadas por el bioterio del CIRA CINVESTAV-UATx, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 22°C +/- 2°C, con ciclos de luz oscuridad de 12 horas (12am – 12pm) y libre acceso a alimento y agua. Se formaron tres grupos: el primer grupo contó con 7 días, el segundo grupo 28 días y el tercer grupo 105 días de recuperación postcirugía OBX o Sham; a continuación, se llevó a cabo la PCA para inmediatamente después perfundir de forma intracardiaca. El cuidado y el manejo de las ratas fue aprobado por un comité de cuidado animal del CIRA CINVESTAV-UATx de acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM) (NOM-062-ZOO-1999). Se hicieron todos los esfuerzos para reducir el número de animales utilizando el principio de las “3R” (Lee et al., 2020).

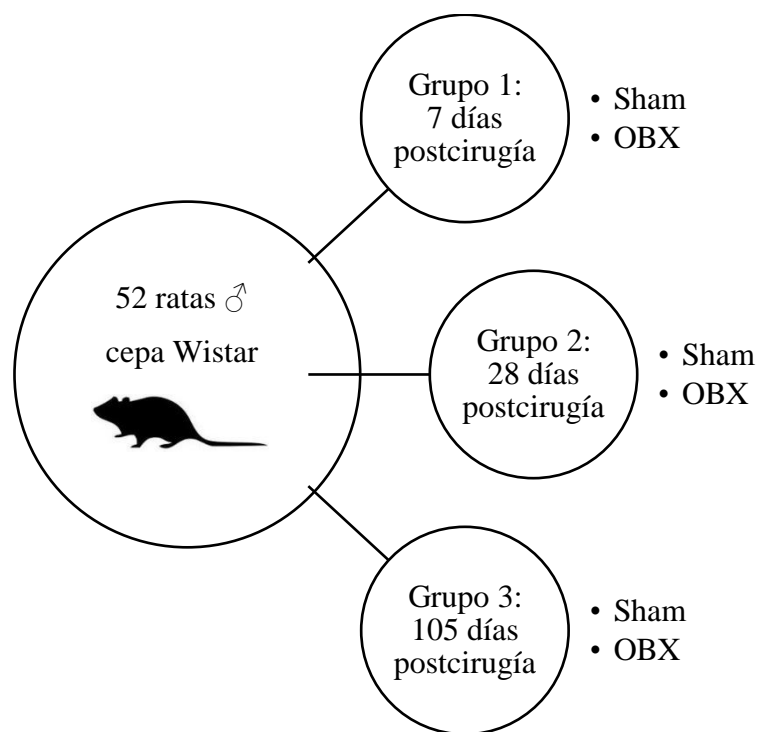


Figura 2: Representación esquemática de los grupos independientes sham y OBX.

VI.II Cirugía de la OBX

Se anestesió a las ratas con una mezcla ketamina/xilazina (ketamina 0.75 ml + xilazina 0.25 ml + 5 ml de solución Hartmann) y se administró por vía intraperitoneal (IP) en dosis de 0.125 ml/20 g de peso corporal; una vez anestesiadas se afeitó la cabeza y se realizó asepsia mediante cloruro de benzalconio y yodopovidona, luego se hizo una incisión sobre la línea media del cráneo desde la frente hasta el dorso de la nariz (1 cm), posteriormente, se descubrió aponeurosis y periostio para llegar al hueso; después, se perforaron dos orificios de 2 mm de diámetro utilizando un micro motor, ubicándose a 8 mm anterior a bregma y 2 mm de la línea media del hueso frontal; los BO se pueden visualizar a través de estos orificios; aspirar los BO por medio de una cánula unida a una bomba de agua destilada, teniendo cuidado de no causar daño a la CPF; las ratas Sham fueron operadas de manera similar, excepto que no se extraen los BO; luego, llenar los orificios con esponja hemostática, suturar de forma continua y cubrir con yodopovidona; por último se administró por vía subcutánea 4 ml de solución Hartmann (Kelly et al., 1997; van Riezen & Leonard, 1990).

VI.III PCA

Esta prueba se realizó en una arena cuadrada negra brillante (90x90x90 cm) sin tapa superior, en un campo dividido en 25 cuadrados de igual tamaño, con 300-400 LUX de iluminación. Después de 1 hora de habituación en el laboratorio, se colocó a la rata en el centro del campo y se le permitió explorar durante 5 minutos. A continuación, se retiró del campo y se colocó en una caja nueva separada de su grupo. Se limpió la caja por la base y paredes con alcohol al 70% para eliminar señales olfativas (Morales-Medina et al., 2012). Durante la exploración de la rata en la PCA el experimentador salió del laboratorio, además, para controlar los posibles efectos debidos a los ciclos circadianos, todas las pruebas se video grabaron y realizaron a la misma hora del día entre las 7:00 am y las 12:00 pm. Se cuantificó el número de cuadros visitados dentro de la PCA (locomoción), la frecuencia de acicalamientos (lavado de la nariz, cara, y cabeza) y la frecuencia de erguidos (cuando la rata se apoya en sus extremidades traseras levantando las delanteras) (Morales-Medina et al., 2012).

VI.IV Perfusión intracardiaca

VI.IV.I Cirugía

Al término de la PCA, se anestesió a las ratas con el coctel anestésico ketamina/xilazina antes mencionado, vía IP. Una vez anestesiadas las ratas, se hizo una incisión de 5-6 cm lateral a través del tegumento y la pared abdominal justo debajo de la caja torácica y se realizó un corte a través de la caja torácica hasta la clavícula, de manera similar en el lado contralateral, posteriormente; se recortó cuidadosamente cualquier tejido que conecta el corazón y se sujetó la punta del esternón con una pinza hemostática y se colocó la pinza sobre la cabeza, entonces, el timo se levantó desde el corazón junto con el esternón, que proporciona una visión clara de los ventrículos; se insertó una aguja de calibre 15 a través del ventrículo izquierdo y se cortó la aorta ascendente; se utilizó una pinza hemostática para asegurar la aguja y evitar movimientos y fuga, modificado de Gage et al., (2012).

VI.IV.II Perfusión

Con ayuda de una bomba de perfusión, se administró 300 ml de solución buffer de fosfatos 1x (PBS 1x) de manera uniforme; una vez terminada la administración de PBS 1x, se administró 350 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% (Monfil et al., 2018). Una vez concluida la administración de PFA, se cerró la válvula de salida y se recogió el PFA para su correcta eliminación.

VI.IV.III Disección de cerebro

Se retiró la cabeza con tijeras, posteriormente, se hizo una incisión a lo largo del tegumento desde el cuello hasta la nariz para exponer el cráneo, se removió el músculo del cuello que queda para que la base del cráneo quede expuesta. A continuación, se utilizaron gubias quirúrgicas para despejar el cráneo por el cerebelo y la superficie dorsal; se cortaron las conexiones nerviosas a lo largo de la superficie ventral del cerebro y suavemente se separó el cerebro del cráneo; se obtuvo el cerebro y fue colocado en un tubo Falcon de 50 ml con PFA al 4%, modificado de Gage et al., (2012).

- Cualquier rata con la extracción incompleta de los BO o daño en CPF, se excluyó del estudio.

VI.V Corte del cerebro

Con ayuda de un vibratomo manual Leica VT1000S (Leica microsystem, USA), se llevaron a cabo cortes coronales de 40 μ m de grosor utilizando las coordenadas de Paxinos, G. and Watson, (1997) del hipocampo subregiones CA1, CA3 y GD (figuras 27-30), CPF (figuras 7-10) y BLA (figuras 27-30). Los cortes se recogieron de forma secuencial en pocillos de cuatro filas, cubiertos de crioprotector, para almacenar a 4°C (Monfil et al., 2018).

VI.VI Inmunohistoquímica

En el día 1, las secciones fueron lavadas en solución PBS 1x, 2 veces durante 5 minutos si el tejido es fresco. Sin embargo, si las secciones se encuentran en agente crioprotector se lavaron 2 veces más. Posteriormente, las secciones fueron incubadas en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1.5% disuelto en PBS 1x, durante 5 minutos. Después, las secciones se enjuagaron en PBS 1x frío 2 veces durante 5 minutos. A continuación, las secciones fueron incubadas con el antisuero diluyente (PBS 1x + 0.3 % tritón x – 100 + 3% de suero normal de conejo) durante 2 horas. Finalmente, se agregó a las secciones el anticuerpo (Ac) primario (anti-GFAP de cabra (ab53554) [1:500]) en antisuero diluyente (PBS 1x + 0.3 tritón x – 100 + 1% de suero normal de conejo) por un tiempo de 24 horas a temperatura ambiente (Chávez et al., 2019).

En el día 2, se lavaron las secciones en PBS 1x frío 3 veces durante 5 minutos. Posteriormente las secciones se incubaron en el Ac secundario (anti cabra hecho en burro [1:250]) disuelto en el antisuero diluyente (PBS 1x + 0.3 tritón x – 100 + 1 % de suero normal de conejo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación las secciones se lavaron 3 veces en PBS 1x durante 5 minutos. Posteriormente, las secciones se incubaron en complejo avidina-biotina (ABC) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron con 3-3'-diaminobenzidina (DAB) con intensificación de níquel por un tiempo de 2:30 min. Por ultimo las secciones fueron lavadas en PBS 1x 2 veces durante 5 minutos y una vez en agua destilada, para después ser montadas en las laminillas gelatinizadas para su posterior conteo y análisis morfológico de astrocitos marcados con la GFAP en las zonas cerebrales tomando como referencia el atlas.

- El protocolo detallado de la inmunohistoquímica con GFAP se encuentra en el anexo XIII.I.

VI.VII Criterios de inclusión

Se seleccionaron los astrocitos que cumplan los siguientes criterios: 1) ubicación del cuerpo celular del astrocito en la región de la CPF, BLA e hipocampo subregiones CA1, CA3 y GD; 2) impregnación completa del cuerpo celular y sus prolongaciones; 3) procesos del astrocito no oscurecidos por tinción de fondo o por otras células; y 4) morfología característica para astrocitos.

VI.VIII Análisis morfológico de astrocitos

Después de trazar los astrocitos con ayuda de un microscopio manual Leica (modelo DM200, microsystems, Deerfield, IL, USA) con cámara lucida, para cada astrocito se midió, la longitud, la arborización y el orden de las prolongaciones mediante el análisis de Sholl (Torres-Platas et al., 2011). Por cada cerebro, fueron analizados 5 astrocitos por hemisferio, de las regiones CPF (figuras 7-10), subregiones del hipocampo CA1, CA3 y GD (figuras 27-30) y BLA (figuras 27-30) utilizando las coordenadas de Paxinos, G. and Watson, (1997).

VI.VIII.I Análisis de Sholl

Utilizando una plantilla transparente con anillos concéntricos equidistantes equivalentes a 5 μm , la cual se centra sobre los trazados del astrocito, manteniendo en el centro el cuerpo celular. Se contó el número de intersecciones por cada orden de las prolongaciones en los círculos concéntricos para estimar la longitud de ramificación, el orden y el diámetro total de cada astrocito (Torres-Platas et al., 2011).

VI.VIII.II Cuantificación de astrocitos

Para medir el número de astrocitos, se cuantificaron 4 secciones por cada hemisferio y región CPF (figuras 7-10), subregiones del hipocampo CA1, CA3, GD (figuras 27-30) y BLA (figuras 27-30) (Paxinos, G. and Watson, 1997) con un aumento de 40x, equivalente a un área de 1,958.5 μ^2 . Calculamos el número de astrocitos marcados con GFAP y lo dividimos por el área de la región de interés, usando “Image J” (Virmani et al., 2021).

VI.IX Plan de análisis estadístico

Para evaluar la conducta exploratoria, acicalamientos y erguidos en la PCA, así como la longitud total de las prolongaciones y el número total de astrocitos se utilizó una prueba “t student” para datos no apareados. Para comparar la conducta exploratoria, acicalamientos y erguidos de la PCA, así como el número total de astrocitos, la longitud total, la arborización y el orden de las prolongaciones, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguida de una prueba *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al curso del tiempo y distancia al cuerpo celular. Para el análisis de correlación, después de una prueba de normalidad se utilizó un análisis de Pearson o Spearman. Para cada grupo de datos, los resultados se expresan como media \pm error estándar (SEM). Se usó el software GraphPad Prism (versión 8) y se fijó un valor de $*p < 0.05$ para ser considerado significativo.

VII. RESULTADOS

VII.I Análisis conductual y morfológico del grupo con 7 días de recuperación

VII.I.I Actividad motora

En nuestro primer grupo postcirugía (figura 2A), demostramos un aumento de la actividad locomotora en ratas con OBX (gráfica 2B). Por otro lado, la OBX no altero el número de erguidos (gráfica 2C) y acicalamientos (gráfica 2D), utilizando la PCA.

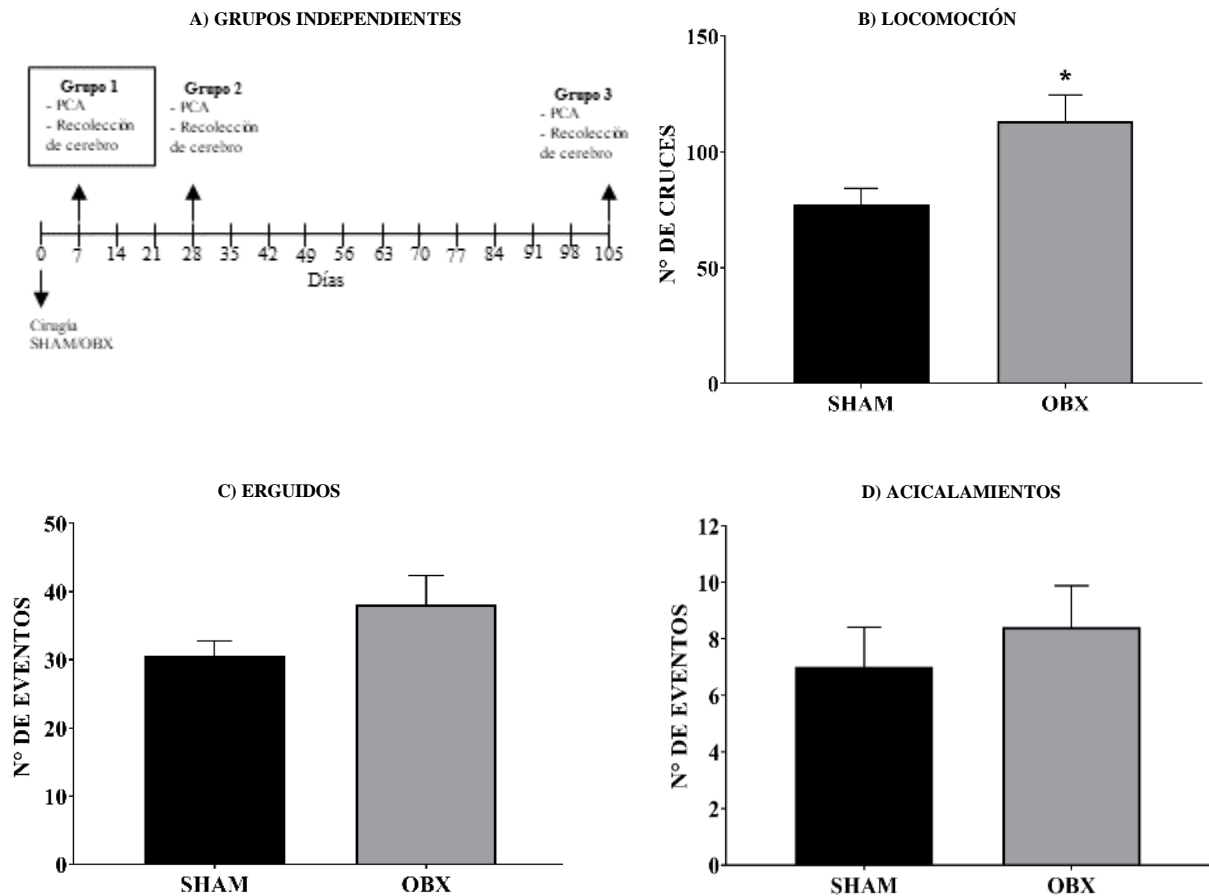


Figura 2. Gráfica B) Se observó una diferencia estadística significativa $p= 0.0154$. Gráficas C y D) No se observó una diferencia estadística significativa. Según el análisis “t student” con diferencias entre las ratas Sham y OBX $n=10$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.1.II Análisis morfológico de la CPF

La OBX aumentó el número de astrocitos totales (gráfica 3A). La OBX no alteró la arborización (gráfica 3B), la longitud (gráfica 3C) y el orden (gráfica 3D) de las prolongaciones de los astrocitos.

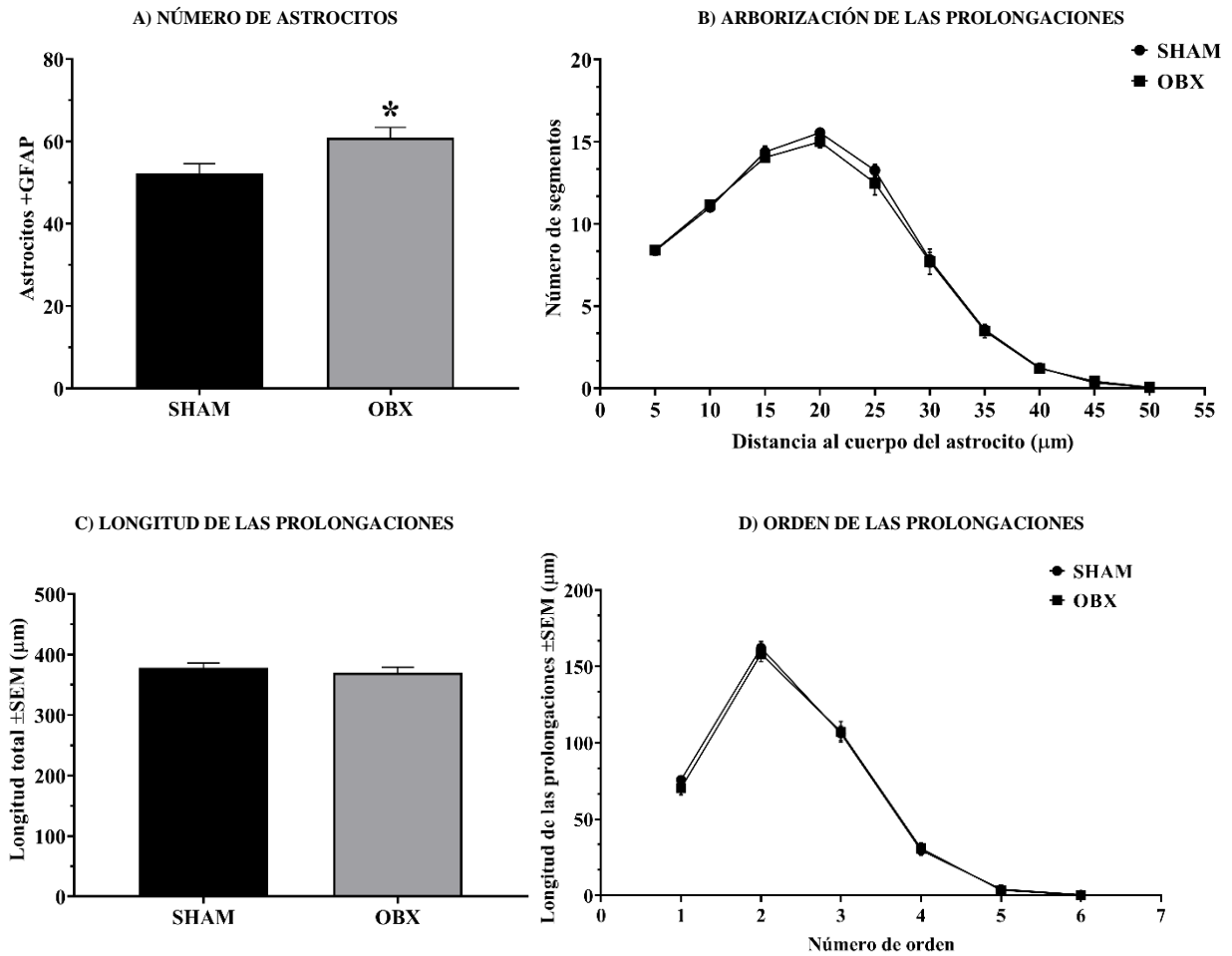


Figura 3. Gráfica A) Se observó una diferencia estadística significativa en el número de astrocitos totales según el análisis “t student” $p= 0.0197$. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas significativas según el ANOVA de dos vías. Gráfica C) No se observó diferencias estadísticas según el análisis “t student”. $n=10$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.I.III Análisis morfológico de BLA

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 4A), ni en la arborización (gráfica 4B), longitud (gráfica 4C) y orden (gráfica 4D) de sus prolongaciones.

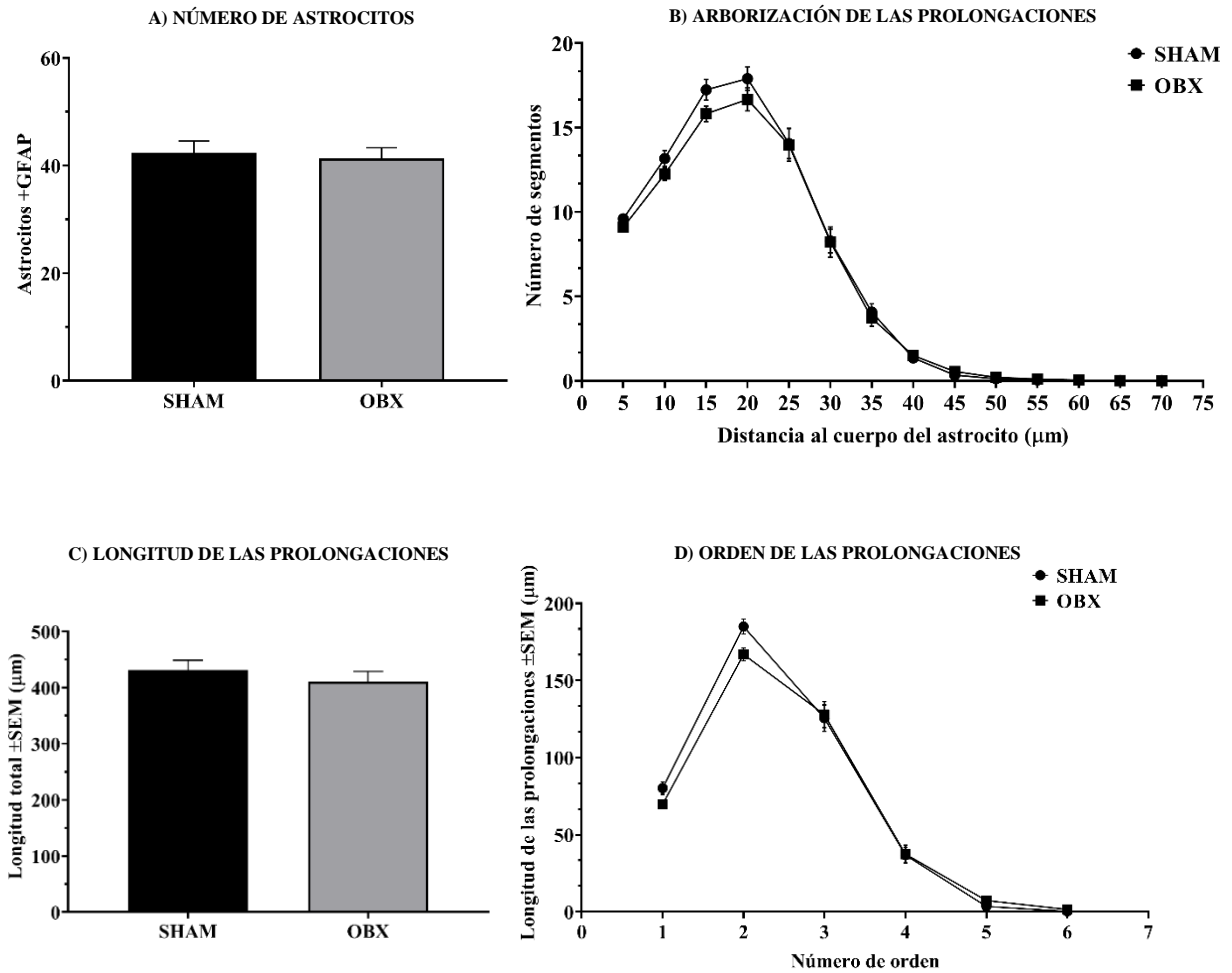


Figura 4. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas significativas según el ANOVA de dos vías. n=9-10 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.IV Análisis morfológico de la subregión CA1 del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 5A) ni en la arborización (gráfica 5B), longitud (gráfica 5C) y orden (gráfica 5D) de sus prolongaciones.

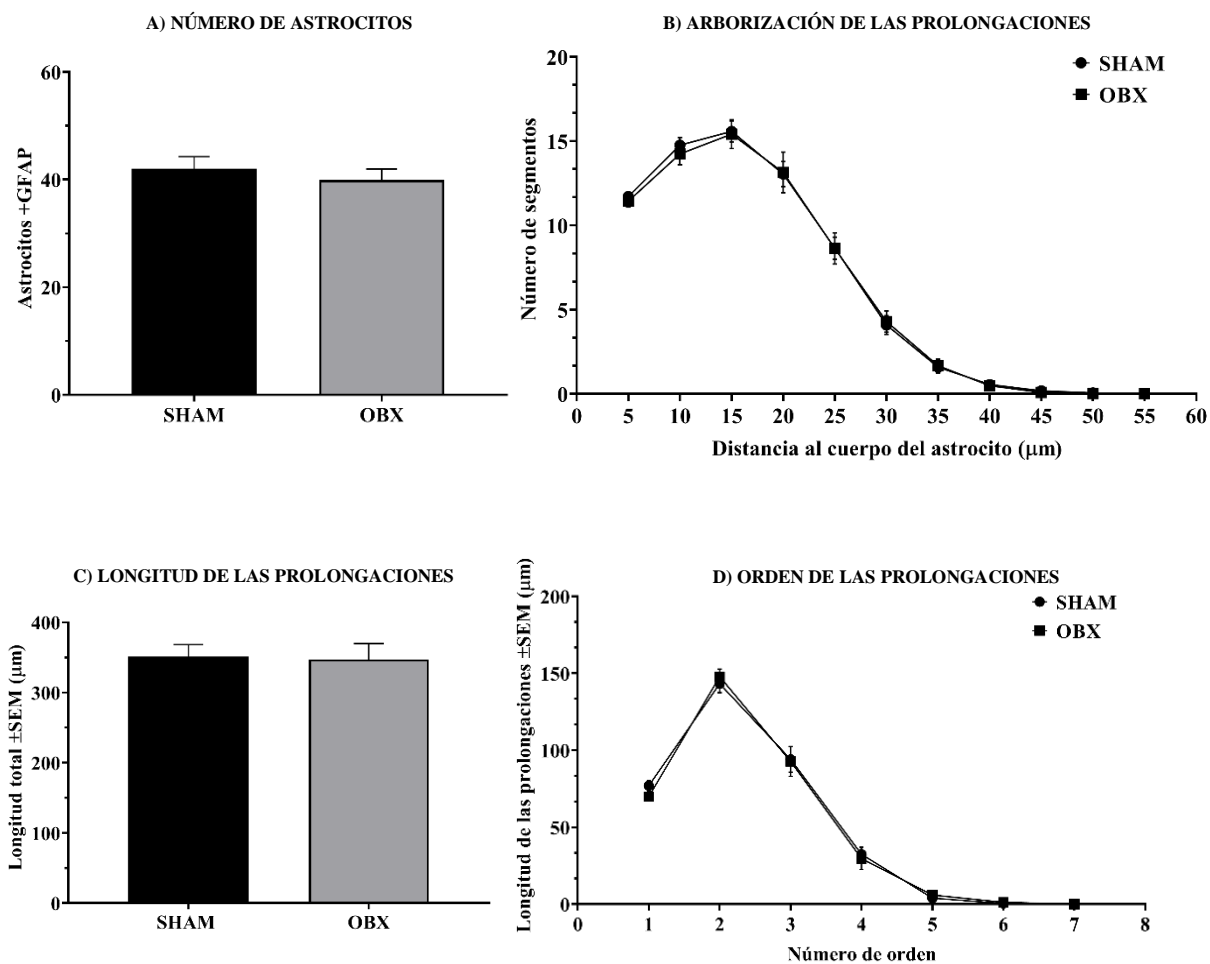


Figura 5. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas significativas según el ANOVA de dos vías. n=10 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.I.V Análisis morfológico de la subregión CA3 del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 6A), ni en la arborización (gráfica 6B), longitud (gráfica 6C) y orden (gráfica 6D) de sus prolongaciones.

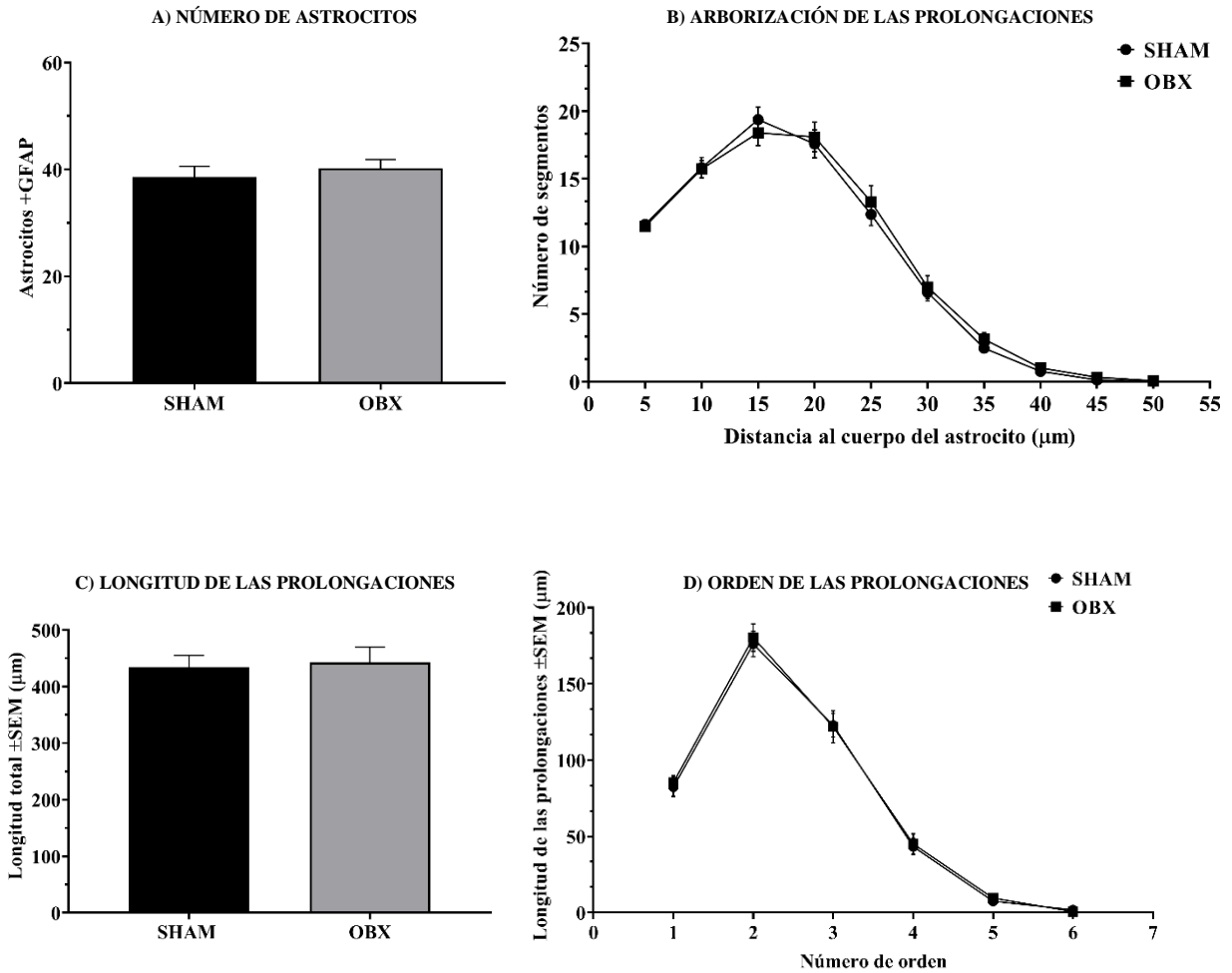


Figura 6. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas significativas según el ANOVA de dos vías. n=10 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.I.VI Análisis morfológico de la subregión del GD del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 7A), ni en la arborización (gráfica 7B), longitud (gráfica 7C) y orden (gráfica 7D) de sus prolongaciones.

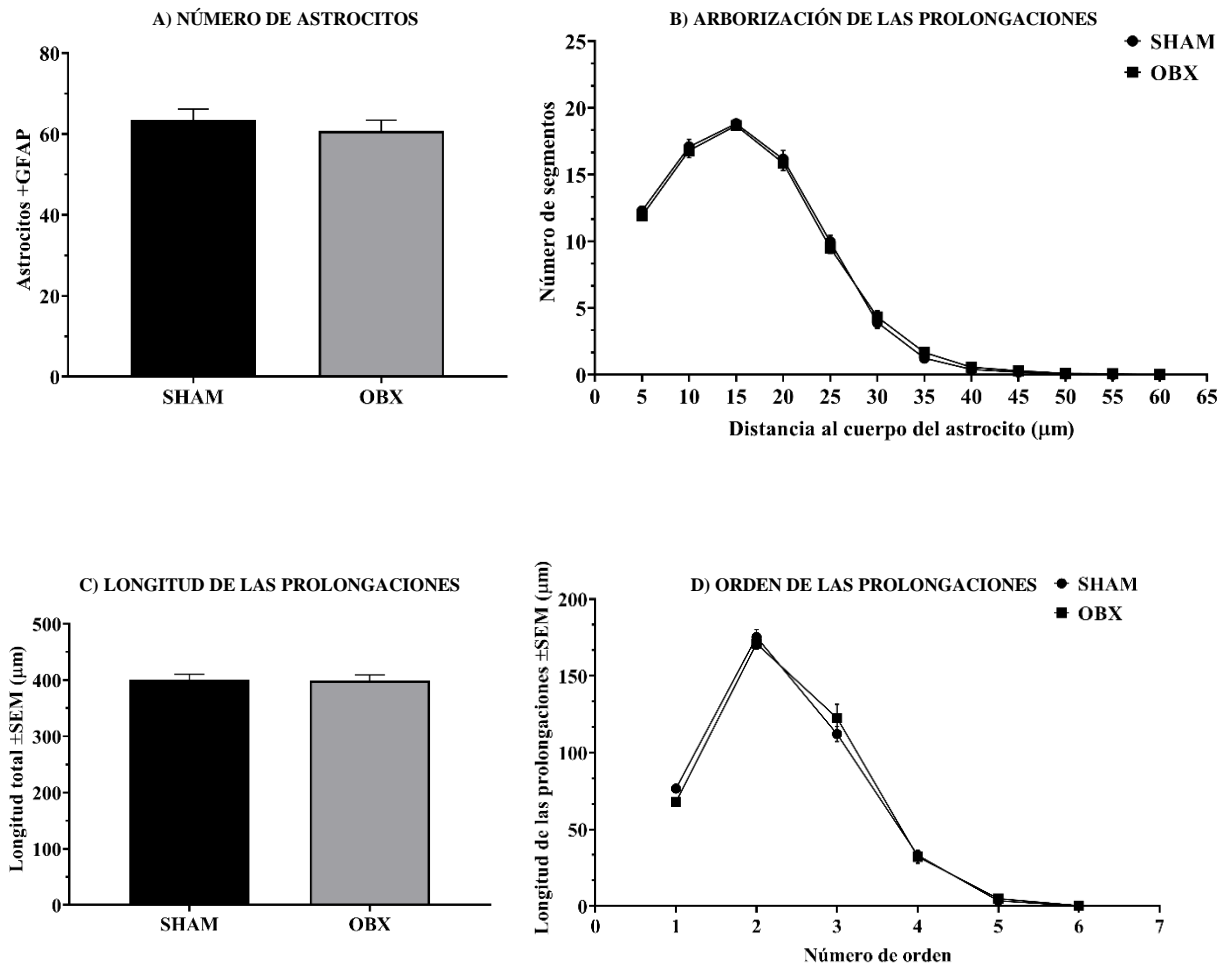


Figura 7. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas significativas según el ANOVA de dos vías. n=10 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VIII.VII Microfotografías representativas 7 días postcirugía

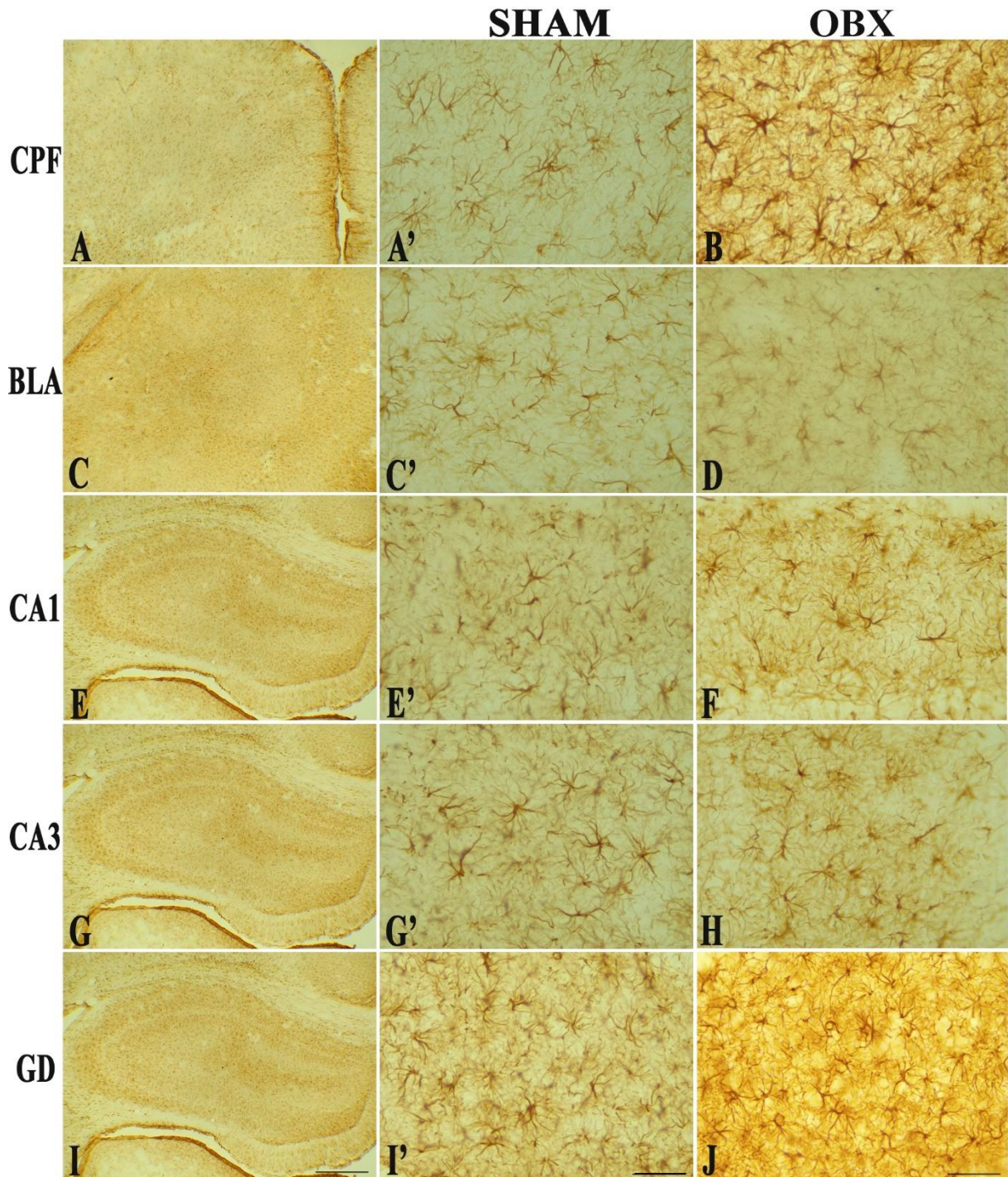


Figura 8. Subregiones de la CPF, BLA e hipocampo, marcados con anti-GFAP. Los paneles A, C, E, G e I tienen un aumento de 4X y se amplían en los paneles A', C', E', G' e I' con un aumento de 40X. B, D, F, H y J tienen un aumento de 40X. La barra de escala para I equivale a 500 μ m e I' y J equivale a 50 μ m.

VII.II Análisis conductual y morfológico del grupo con 28 días de recuperación

VII.II.I Actividad motora

En nuestro segundo grupo postcirugía (figura 9A), demostramos un aumento de la actividad locomotora (gráfica 9B) semejante al primer grupo, además, del número de erguidos (gráfica 9C) en ratas con OBX. Los acicalamientos no se alteraron (gráfica 9D), utilizando la PCA.

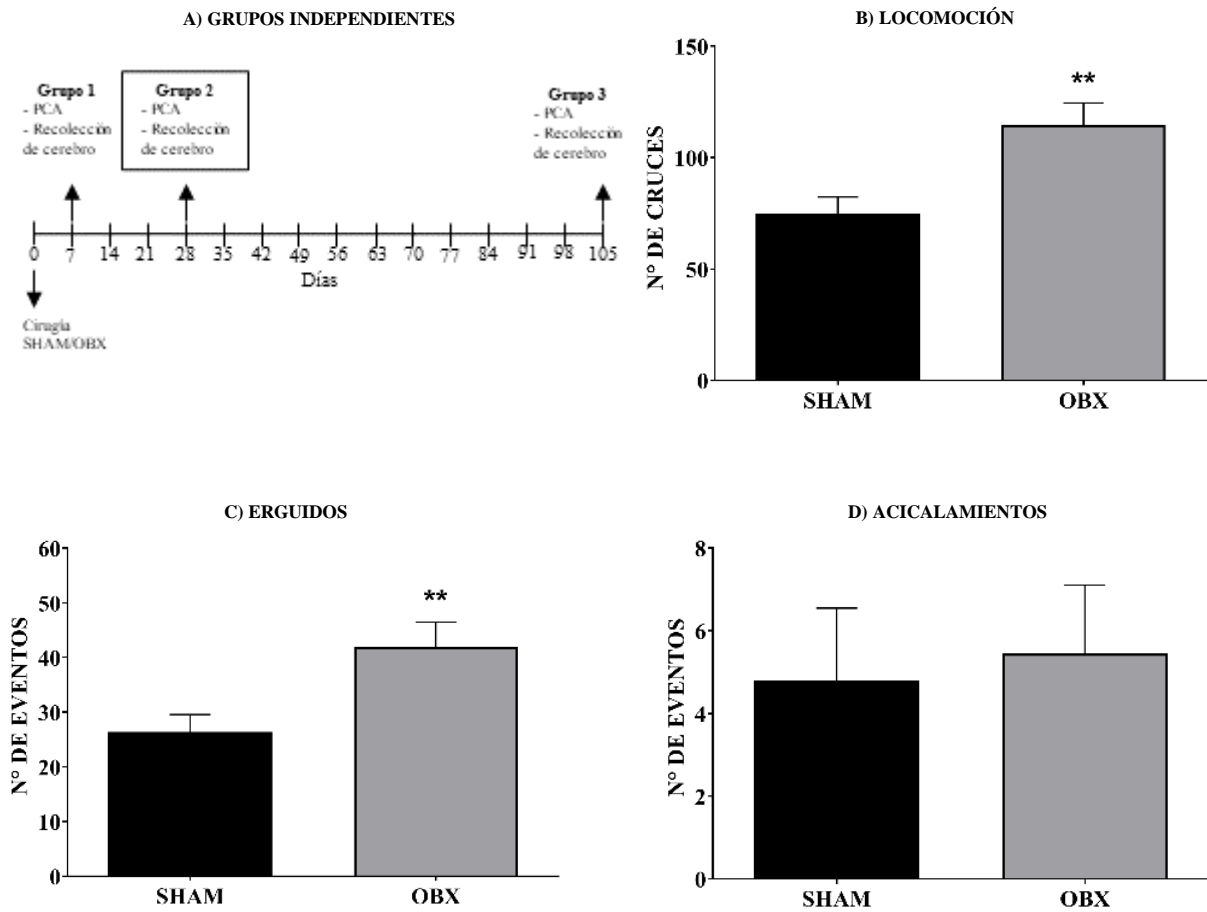


Figura 9. Gráficas B y C) Se observó una diferencia estadística significativa $p= 0.0051$ y $p= 0.0100$ respectivamente. Gráfica D) No se observó una diferencia estadística significativa. Según el análisis “t student” con diferencias entre las ratas Sham y OBX, $n=9-10$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM. $**p\leq 0.01$

VII.II.II Análisis morfológico de CPF

La OBX aumentó el número de astrocitos (gráfica 10A) de igual forma que en nuestro primer grupo postcirugía. Sin alteraciones de los astrocitos en la arborización (gráfica 10B), longitud (gráfica 10C) y orden (gráfica 10D) de sus prolongaciones.

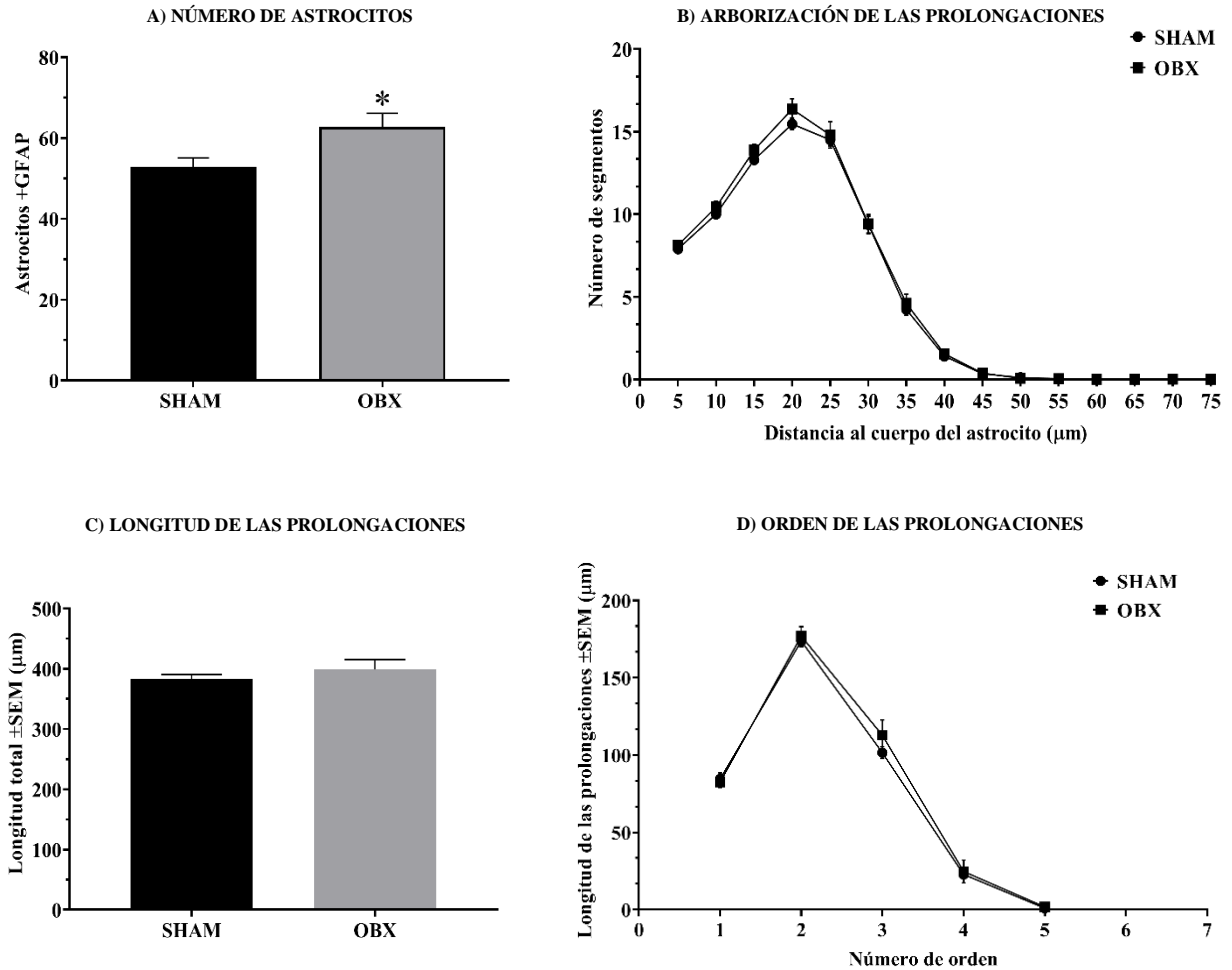


Figura 10. Gráfica A) Se observó una diferencia estadística significativa en el número de astrocitos totales según el análisis “t student” $p=0.0238$. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. Gráfica C) No se observaron diferencias estadísticas según el análisis “t student”. $n=10-9$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.II.III Análisis morfológico de la BLA

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 11A), arborización (gráfica 11B) y longitud (gráfica 11C) de las prolongaciones de astrocitos. Se observó una disminución de la longitud del tercer orden de los astrocitos en ratas con OBX (gráfica 11D).

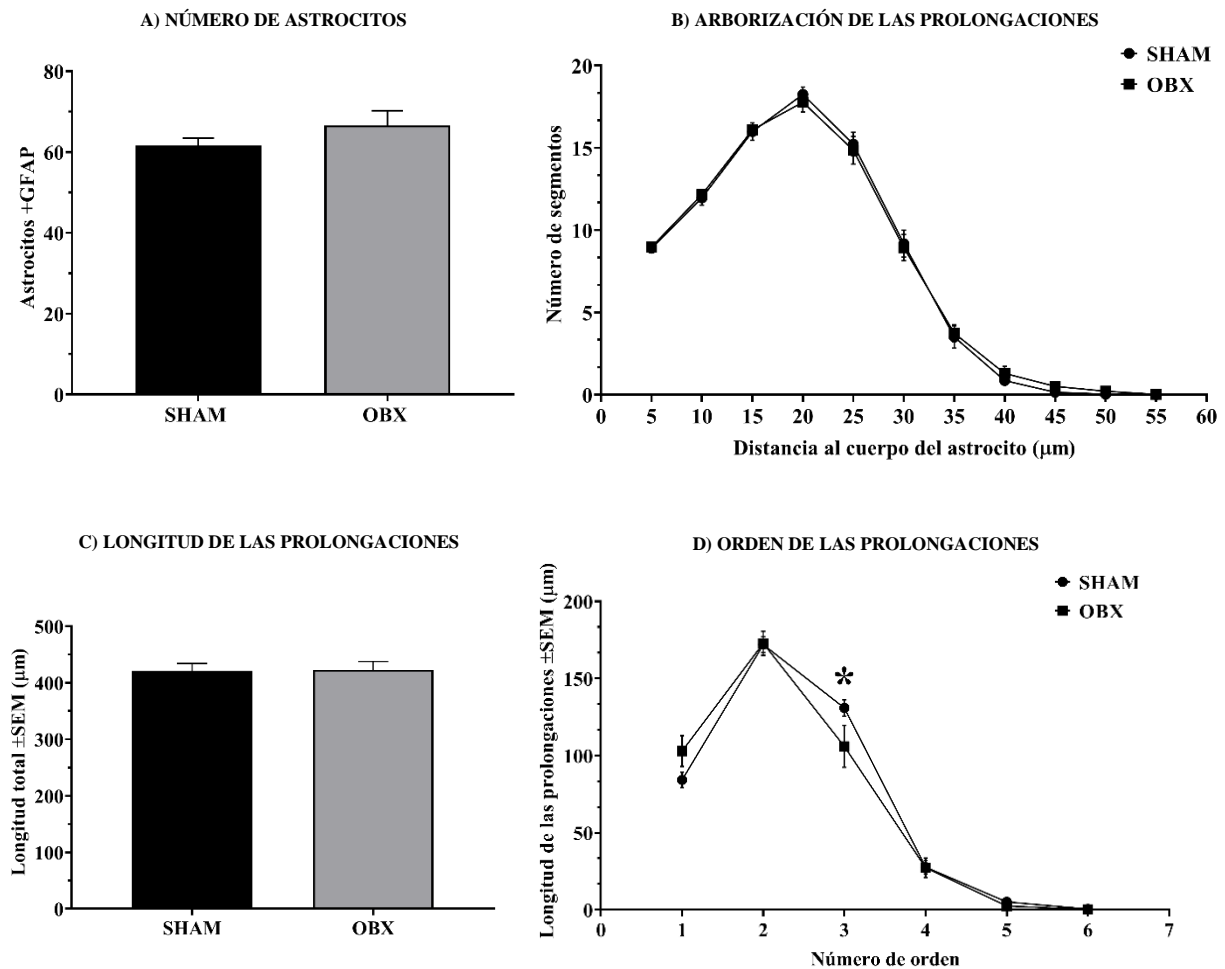


Figura 11. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas significativas según el ANOVA de dos vías. El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con los subgrupos SHAM – OBX, reveló una diferencia estadística significativa en el número de orden 3 de $p=0.0415$ (gráfica D). $n= 8$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.II.IV Análisis morfológico de la subregión CA1 del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 12A), ni en la arborización (gráfica 12B), longitud (gráfica 12C) y orden (gráfica 12D) de sus prolongaciones, semejante al primer grupo postcirugía.

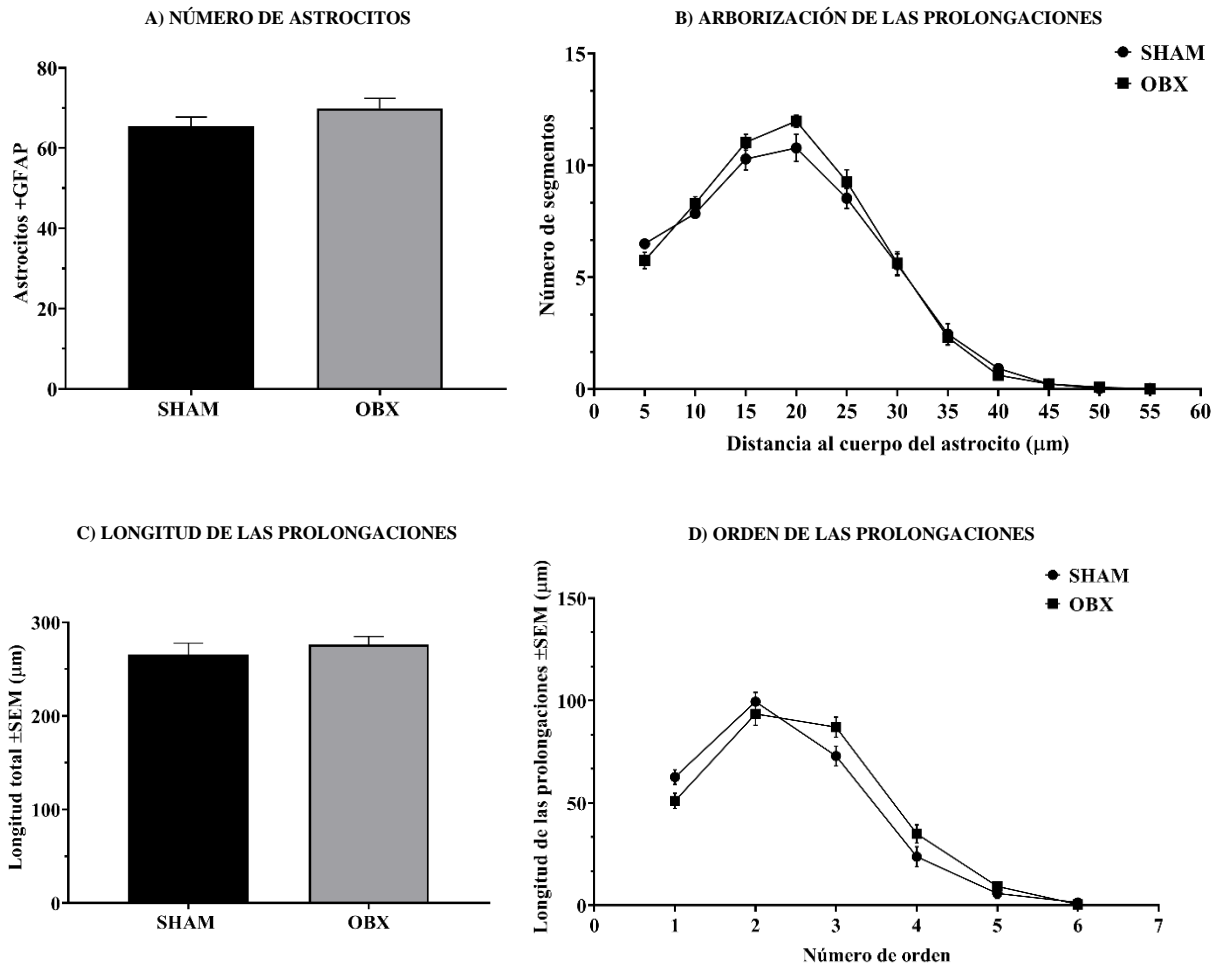


Figura 12. Gráficas A y C) No se observó diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. n= 8 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.II.V Análisis morfológico de la subregión CA3 del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 13A), ni en la arborización (gráfica 13B), longitud (gráfica 13C) y orden (gráfica 13D) de sus prolongaciones, semejante al primer grupo postcirugía.

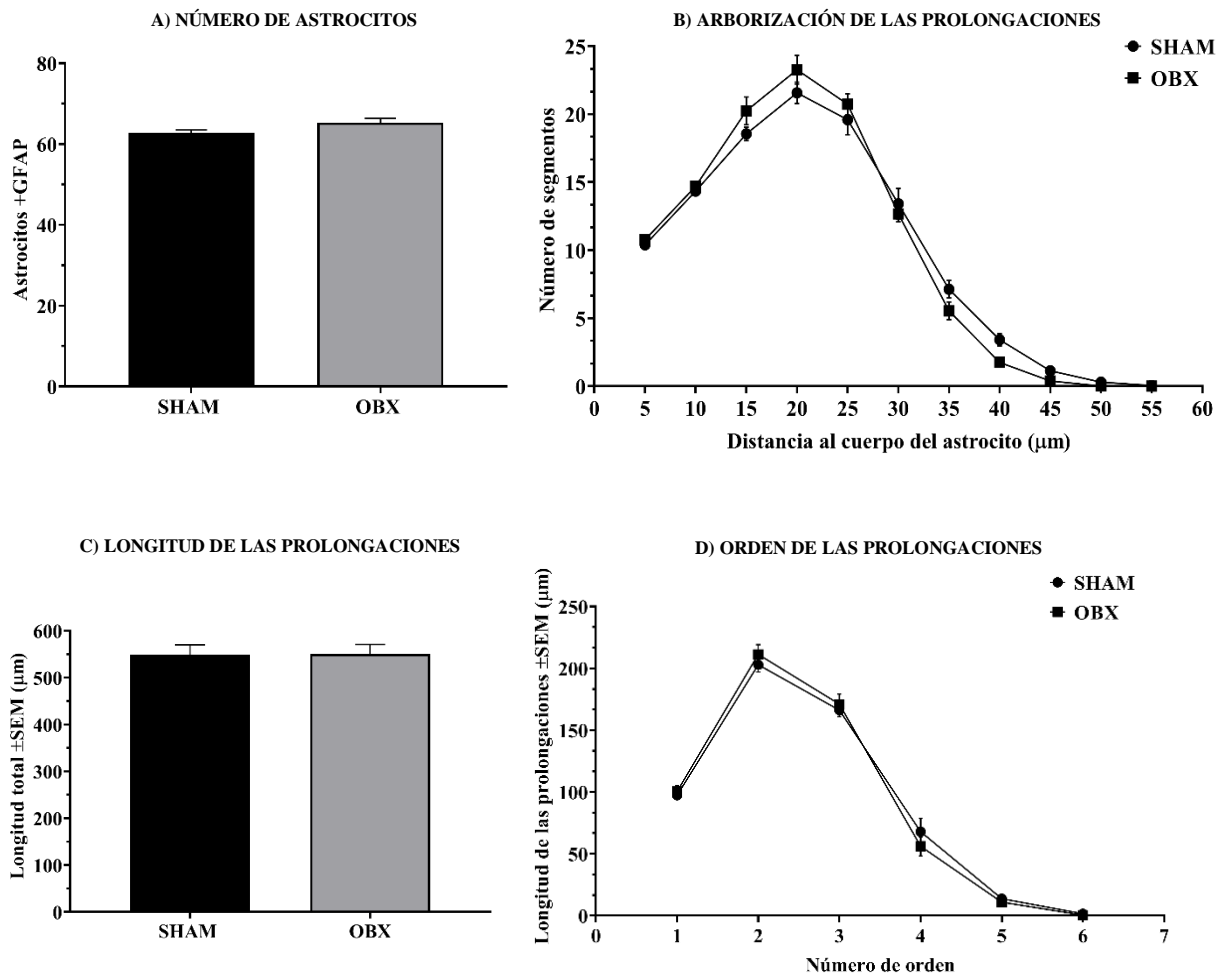


Figura 13. Gráficas Ay C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. n= 8 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.II.VI Análisis morfológico de la subregión GD del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 14A), ni en la arborización (gráfica 14B), longitud (gráfica 14C) y orden (gráfica 14D) de sus prolongaciones, semejante al primer grupo postcirugía.

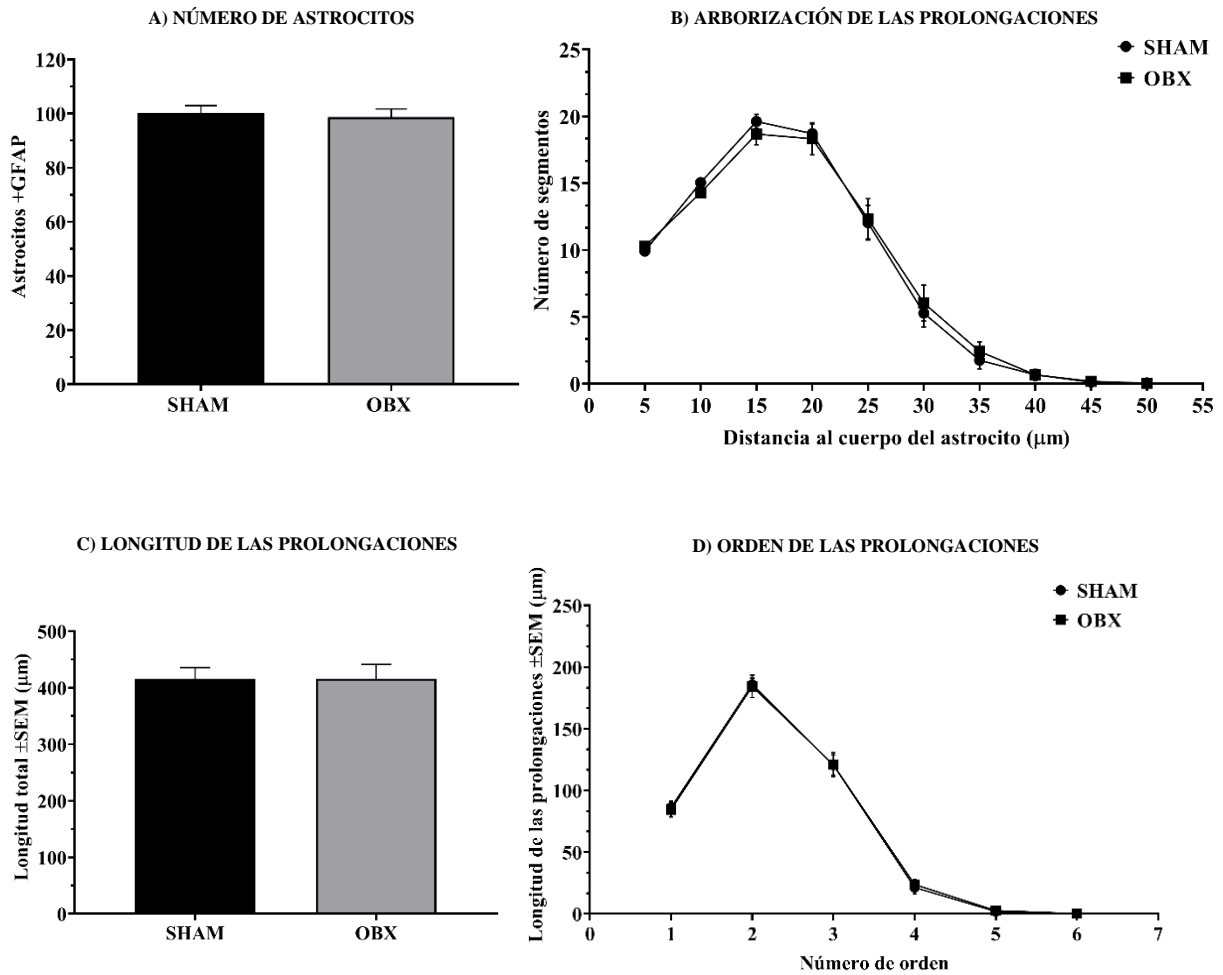


Figura 14. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. n= 6-8 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.II.VII *Microfotografías representativas 28 días postcirugía*

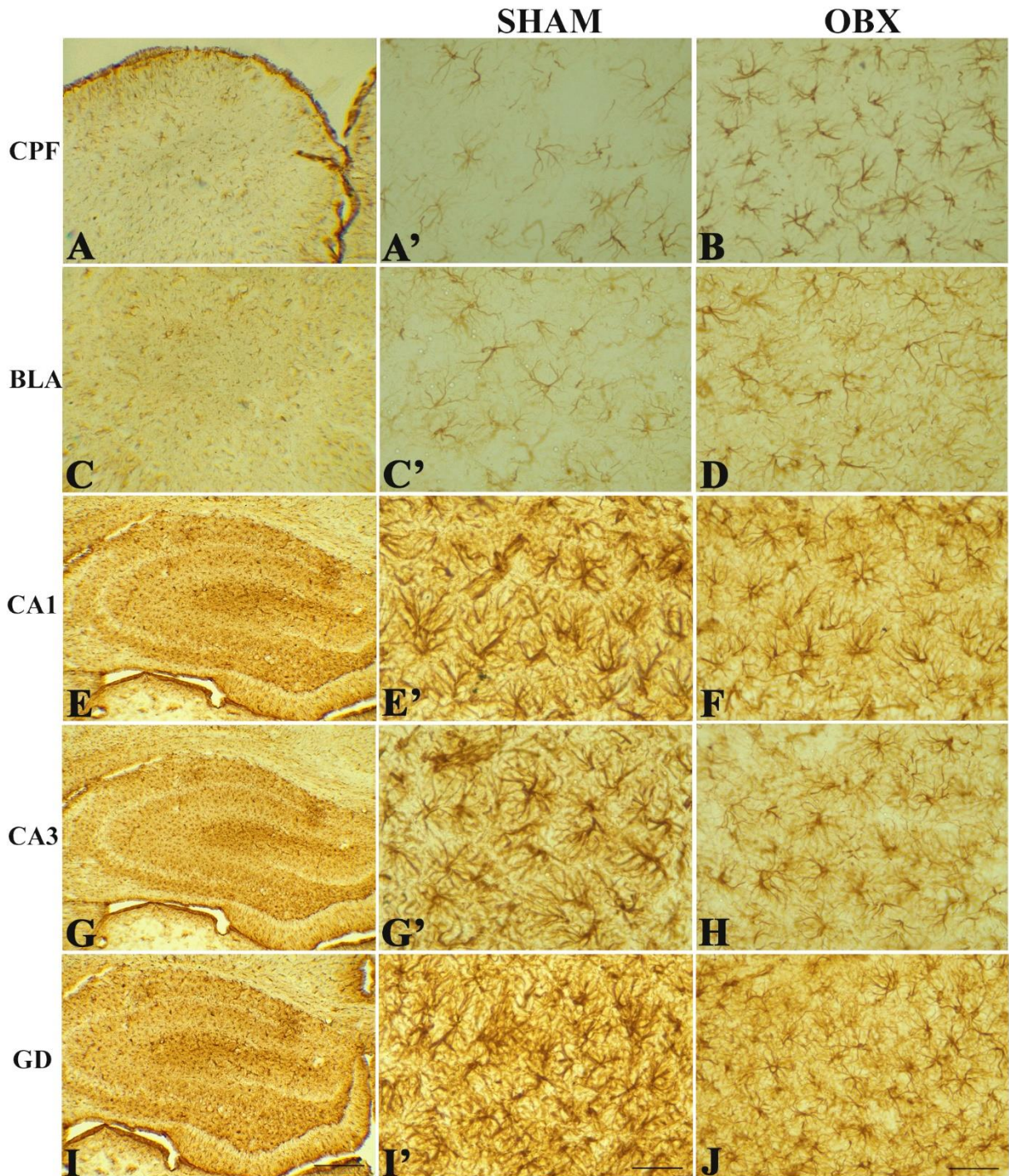


Figura 15. Subregiones de la CPF, BLA e hipocampo, marcados con anti-GFAP. Los paneles A, C, E, G e I tienen un aumento de 4X y se amplían en los paneles A', C', E', G' e I' con un aumento de 40X. B, D, F, H y J tienen un aumento de 40X. La barra de escala para I equivale a 500 μm e I' y J equivale a 50 μm .

VII.III Análisis conductual y morfológico del grupo con 105 días de recuperación

VII.III.I Actividad motora

En nuestro tercer grupo postcirugía (figura 16A), las ratas con OBX demostraron una regulación de la actividad locomotora (gráfica 16B) y del número de erguidos (gráfica 16C) en comparación con el primer y segundo grupo. Los acicalamientos no se alteraron (gráfica 16D).

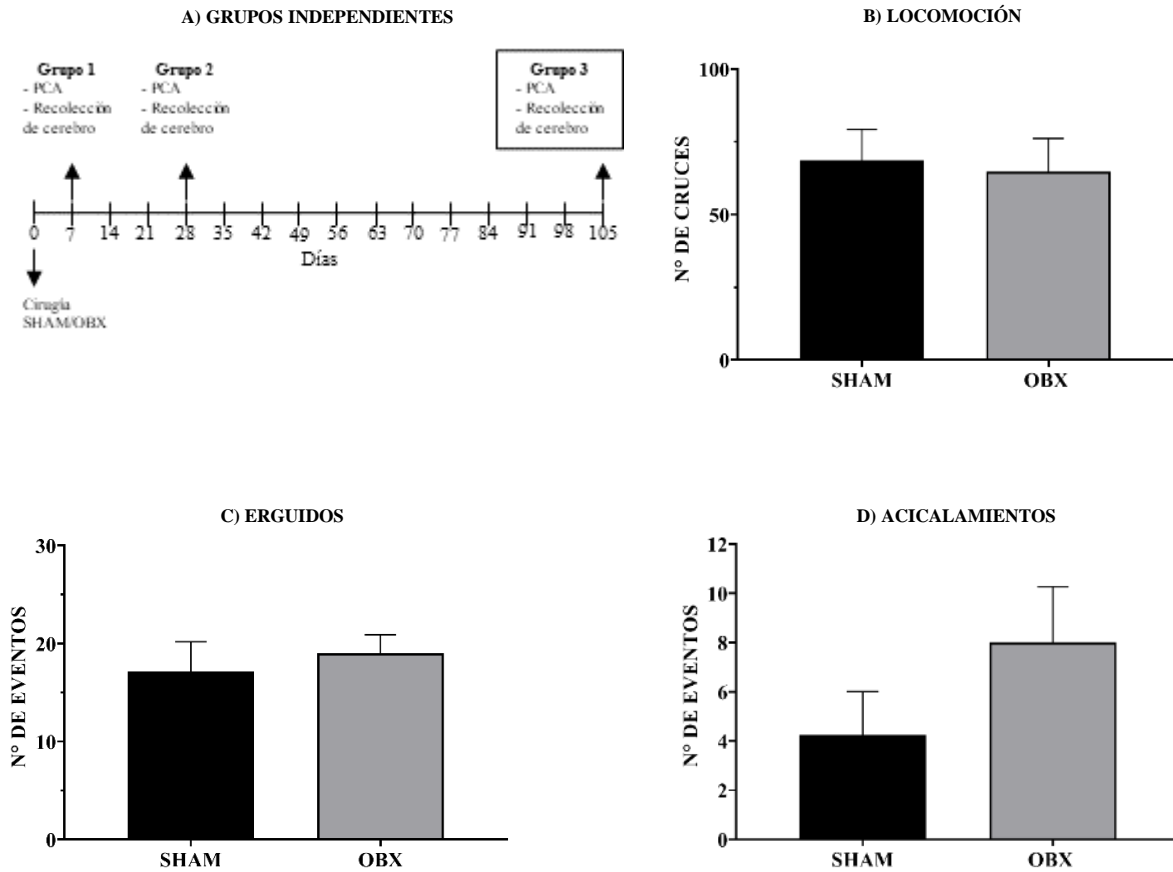


Figura 16. Gráficas B, C y D) No se observó una diferencia estadística significativa. Según el análisis “t student” con diferencias entre las ratas OBX y Sham, n=8 ratas por grupo. Utilizando la prueba de campo abierto (PCA). Se consideró una probabilidad de ($*p < 0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.III.II Análisis morfológico de la CPF

Observamos una regulación del número de astrocitos de las ratas con OBX (gráfica 17A) en contraste con el primer y segundo grupo postcirugía. De igual forma que en el primer y segundo grupo postcirugía, los astrocitos no presentan alteraciones de la arborización (gráfica 17B), longitud (gráfica 17C) y orden (gráfica 17D) de sus prolongaciones.

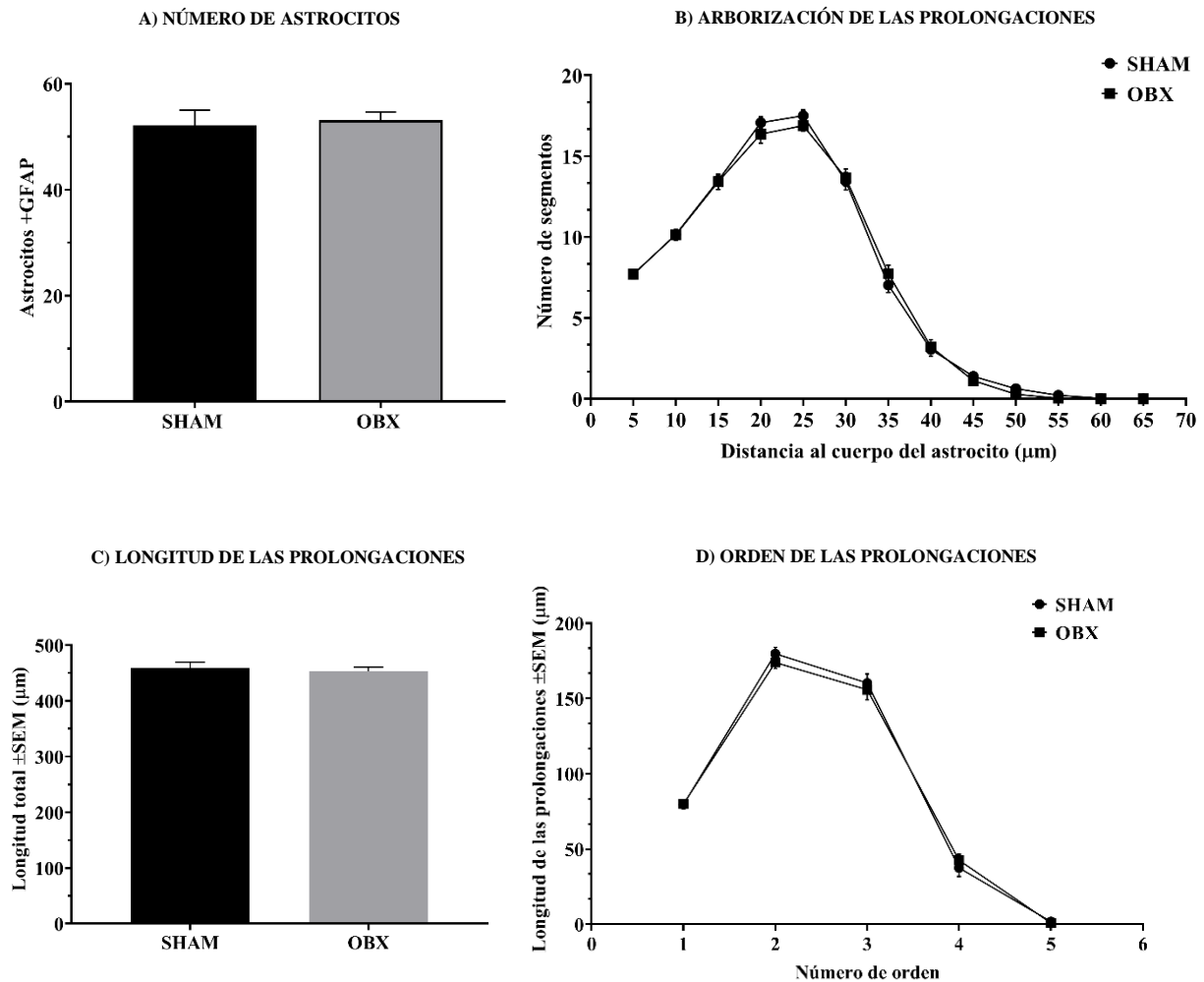


Figura 17. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. n=8 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.III.III Análisis morfológico de la BLA

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 18A). A diferencia del primer y segundo grupo, la OBX aumento en los astrocitos la arborización (gráfica 18B), longitud (gráfica 18C) y orden (gráfica 18D) de sus prolongaciones.

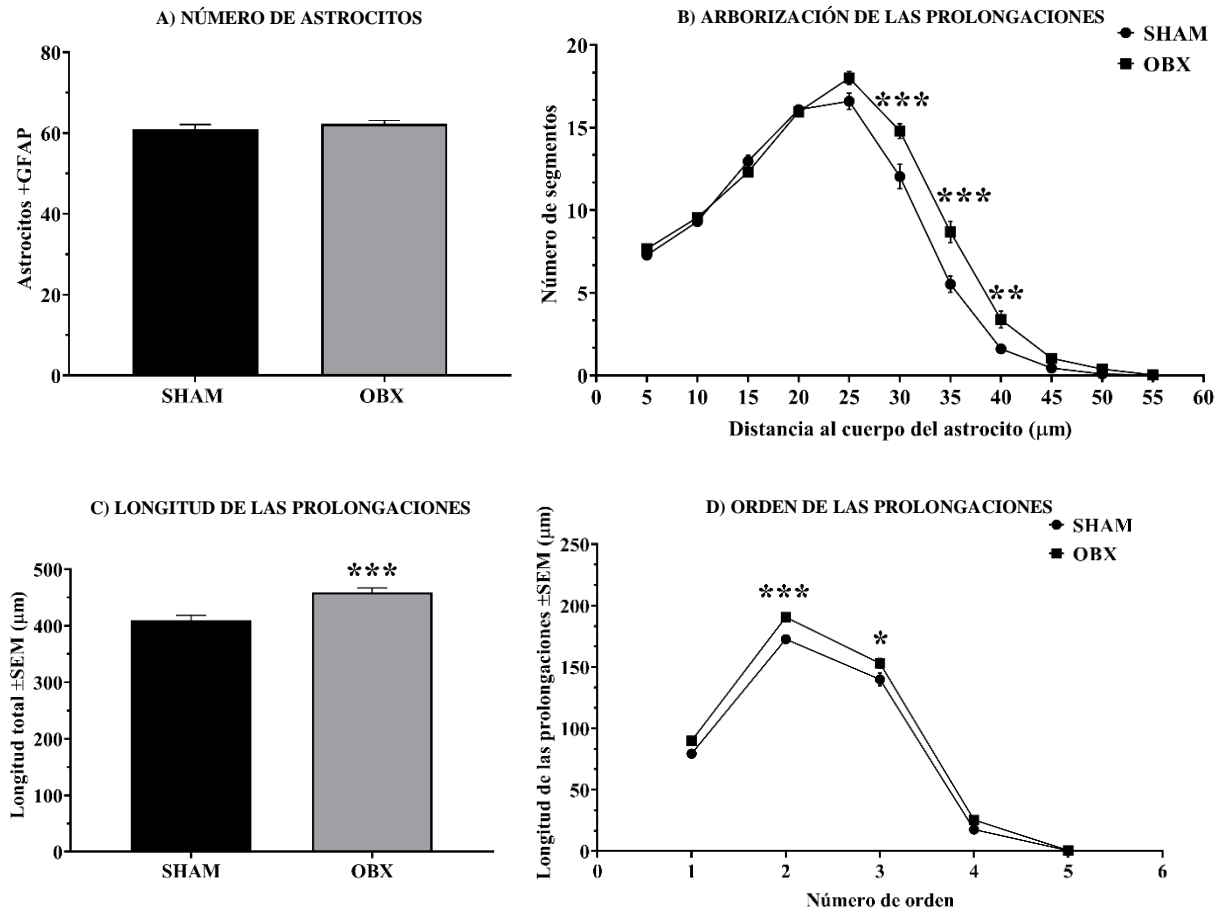


Figura 18. Gráfica A) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráfica B) Se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Distancia al cuerpo del astrocito $F(1, 154) = 36.78, P < 0.0001$; Cirugía $F(10, 154) = 686.5, P < 0.0001$; Interacción $F(10, 154) = 6.236, P < 0.0001$]; el análisis *post hoc* de Sidak comparando los subgrupos SHAM – OBX, reveló diferencias a una distancia al cuerpo astrocito de 30, 35 y 40 µm con una $p = < 0.0001$; < 0.0001 y 0.0047 respectivamente. Gráfica C) Se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student” $p = 0.0006$. Gráfica D) Se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Distancia al cuerpo del astrocito $F(1, 70) = 24.84, P < 0.0001$; Cirugía $F(4, 70) = 1242, P < 0.0001$; Interacción $F(4, 70) = 2.245, P = 0.0729$]; el análisis *post hoc* de Sidak comparando los subgrupos SHAM – OBX, reveló diferencias en el número de orden 2 y 3 con una $p = 0.0007$ y 0.0210 respectivamente. $n = 8$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p < 0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.III.IV Análisis morfológico de la subregión CA1 del hipocampo

La OBX no alteró el número de astrocitos (gráfica 19A). A diferencia del primer y segundo grupo postcirugía, la OBX aumento en los astrocitos la arborización (gráfica 19B), longitud (gráfica 19C) y orden (gráfica 19D) de sus prolongaciones.

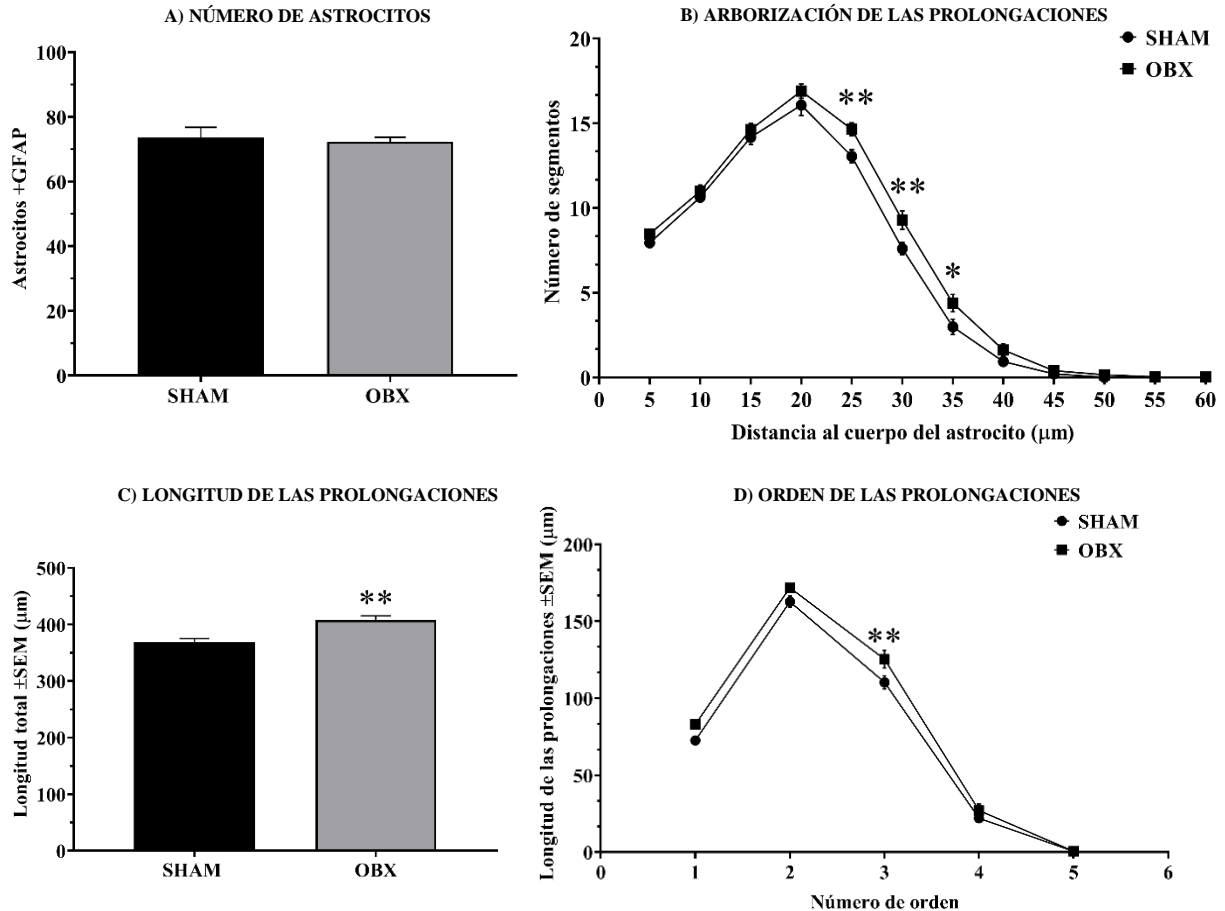


Figura 19. Gráfica A) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráfica B) Se presentaron diferencias estadísticas, según el ANOVA de dos vías [Distancia al cuerpo del astrocito $F(1, 168) = 23.86, P < 0.0001$; Cirugía $F(11, 168) = 727.7, P < 0.0001$; Interacción $F(11, 168) = 1.629, P = 0.0946$]; el análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con los subgrupos SHAM – OBX, reveló diferencias a una distancia del cuerpo del astrocito de 30, 35 y 40 μm con una $p = 0.0097$; 0.0051 y 0.0385 respectivamente. Gráfica C) Se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student” $p = 0.0011$. Gráfica D) Se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Distancia al cuerpo del astrocito $F(1, 70) = 14.76, P = 0.0003$; Cirugía $F(4, 70) = 862.3, P < 0.0001$; Interacción $F(4, 70) = 1.519, P = 0.2061$]; el análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con los subgrupos SHAM – OBX, reveló diferencias en el número de orden 3 con una $p = 0.0086$. $n = 8$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p < 0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.III.V Análisis morfológico de la subregión CA3 del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 20A), ni en la arborización (gráfica 20B), longitud (gráfica 20C) y orden (gráfica 20D) de sus prolongaciones. Semejante al primer y segundo grupo postcirugía.

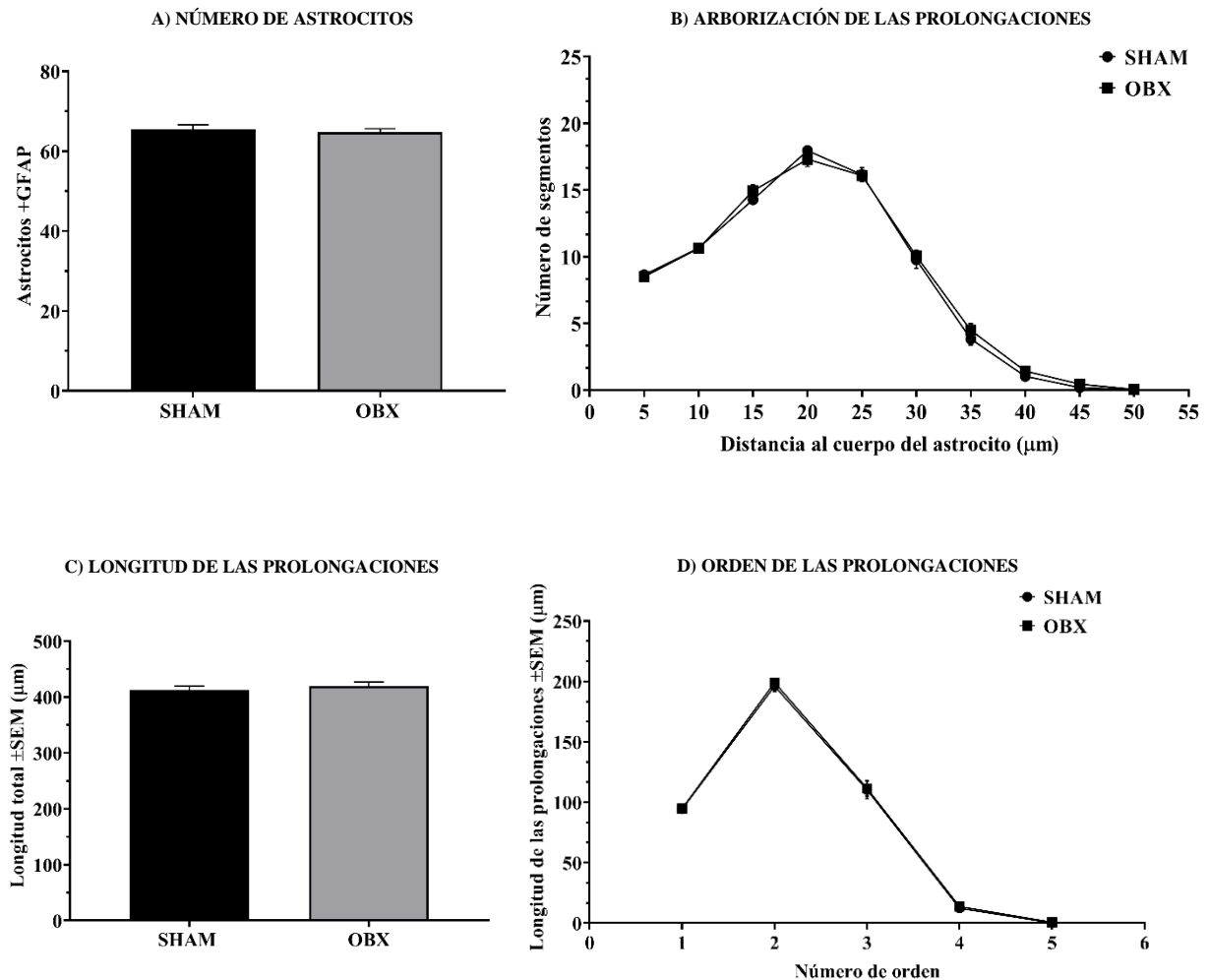


Figura 20. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. n= 8 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.III.VI Análisis morfológico de la subregión GD del hipocampo

La OBX no ocasionó cambios en el número de astrocitos (gráfica 21A), ni en la arborización (gráfica 21B), longitud (gráfica 21C) y orden (gráfica 21D) de sus prolongaciones. Semejante al primer y segundo grupo postcirugía.

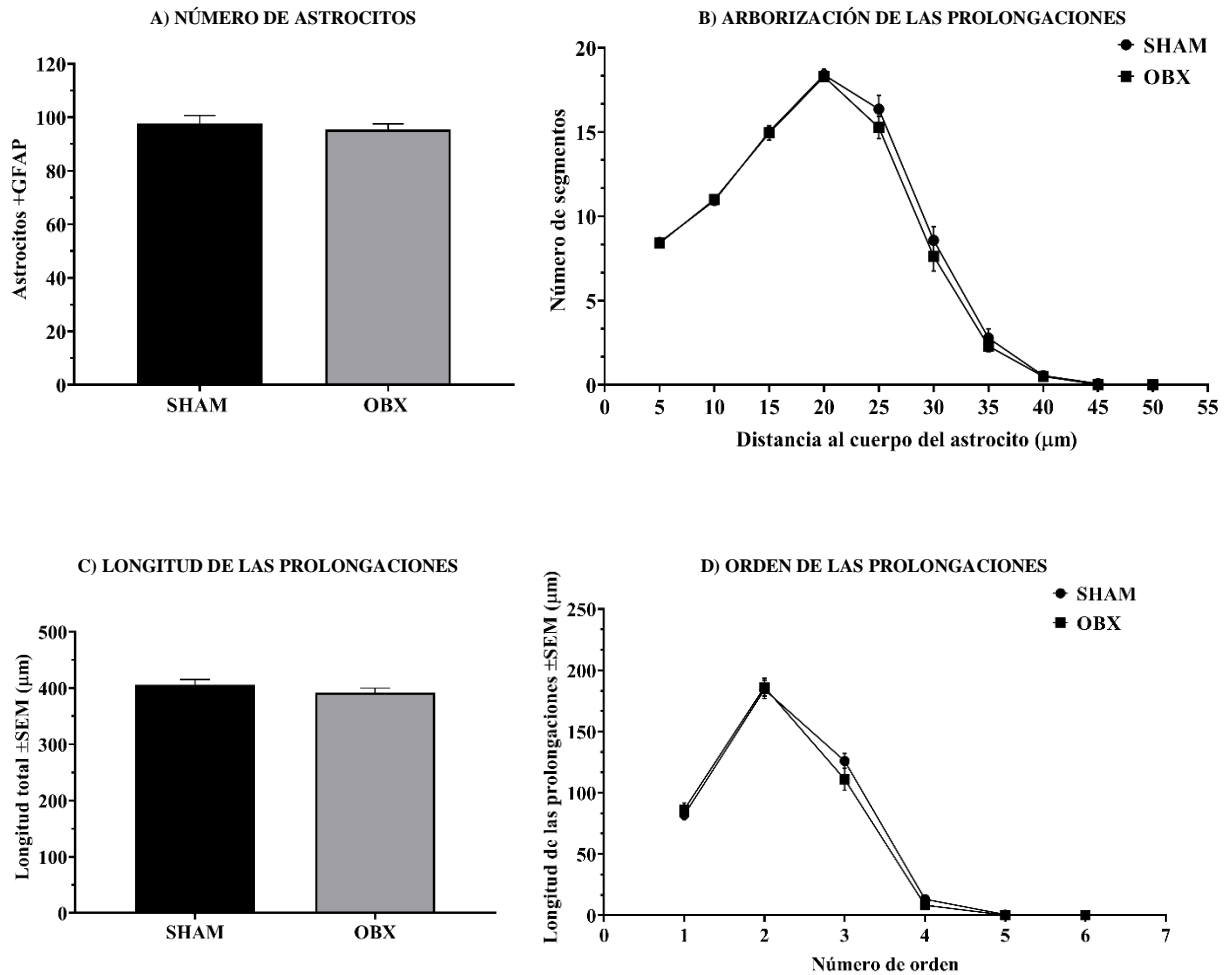


Figura 21. Gráficas A y C) No se observó una diferencia estadística significativa según el análisis “t student”. Gráficas B y D) No se presentaron diferencias estadísticas según el ANOVA de dos vías. n= 8 ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de (*p<0.05) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media ± SEM.

VII.III.VII *Microfotografías representativas 105 días postcirugía*

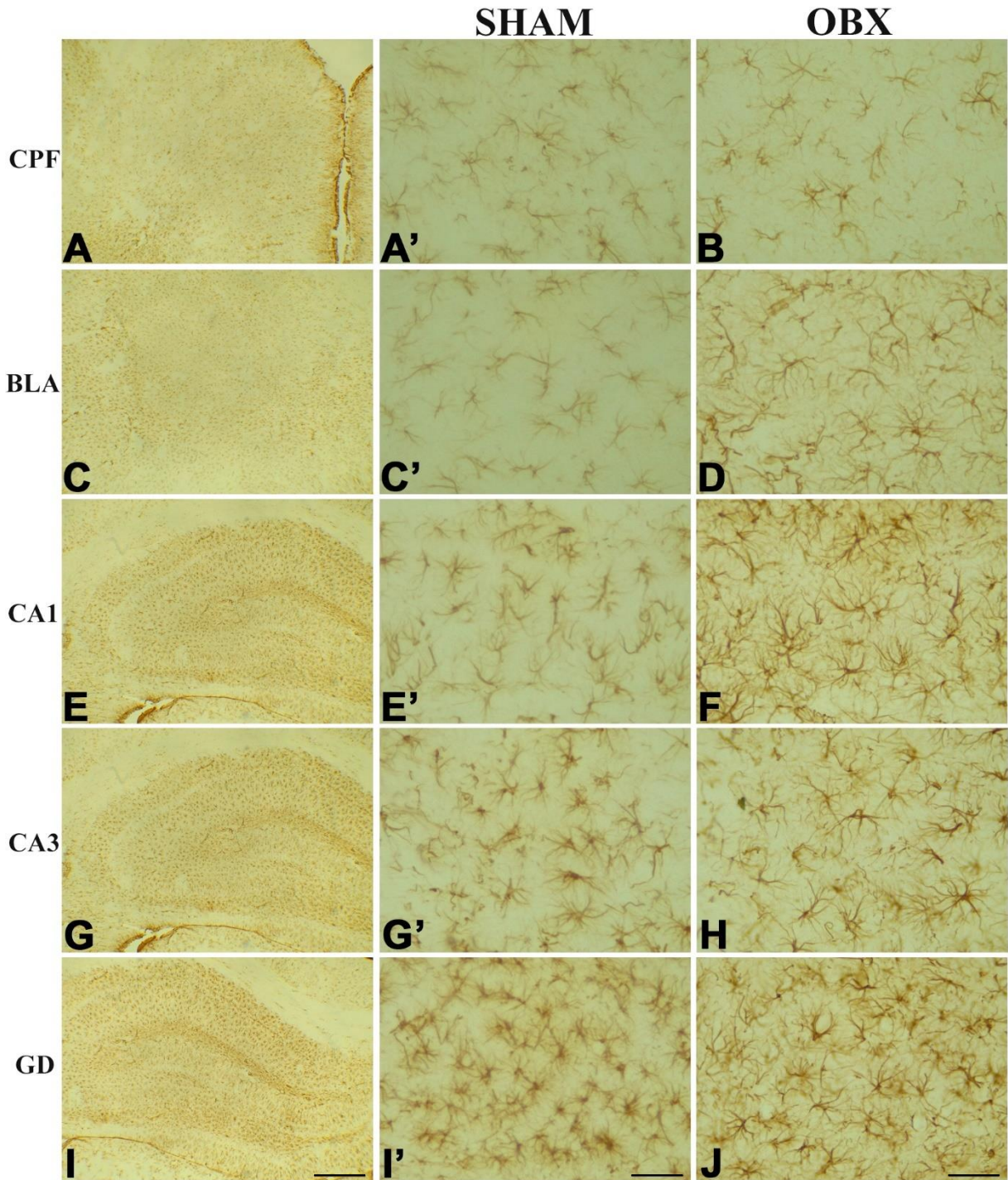


Figura 22. Subregiones de la CPF, BLA e hipocampo, marcados con anti-GFAP. Los paneles A, C, E, G e I tienen un aumento de 4X y se amplían en los paneles A', C', E', G' e I' con un aumento de 40X. B, D, F, H y J tienen un aumento de 40X. La barra de escala para I equivale a 500 µm, I' y J equivale a 50 µm.

VII.IV Análisis temporal conductual de las ratas SHAM y OBX

El análisis temporal demuestra una regulación del aumento de la locomoción (gráfica 23A) y de la frecuencia de erguidos (gráfica 23B) 105 días postcirugía de las ratas con OBX en la PCA.

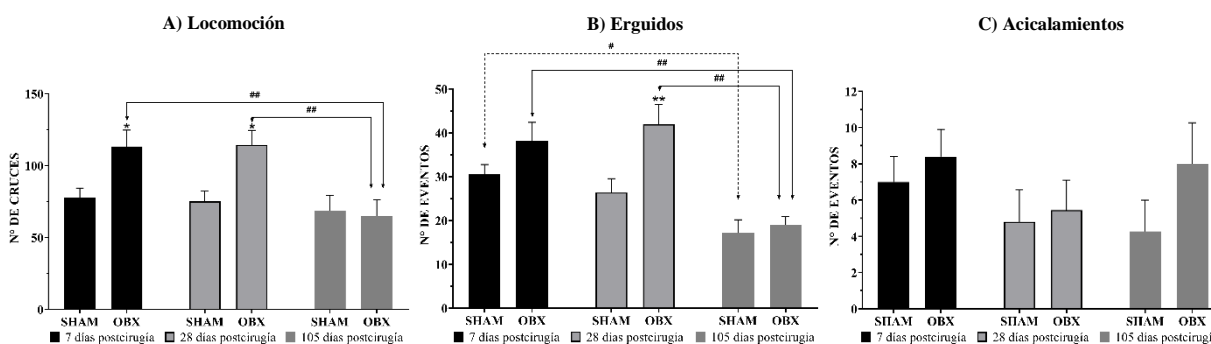


Figura 23 A) El aumento de la actividad locomotora en ratas con OBX es revertida a los 105 días. Se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Cirugía $F(2, 49) = 5.344$, $P=0.0080$; Tiempo $F(1, 49) = 9.000$, $P=0.0042$; Interacción $F(2, 49) = 2.866$, $P=0.0665$].

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo SHAM – SHAM, no reveló diferencias estadísticas significativas en los grupos de 7 vs. 28, 7 vs. 105 y 28 vs 105 días postcirugía.

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo OBX – OBX, reveló diferencias estadísticas significativas en los grupos de 7 vs. 105 ($p= 0.0029$) y 28 vs 105 ($p= 0.0028$) días postcirugía. ($\#p<0.05$).

Figura 23 B) El aumento del número de erguidos en ratas con OBX es revertido a los 105 días. Se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Cirugía $F(2, 49) = 14.24$, $P<0.0001$; Tiempo $F(1, 49) = 9.011$, $P=0.0042$; Interacción $F(2, 49) = 2.001$, $P=0.1461$].

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo SHAM – SHAM, reveló diferencia estadística significativa en el grupo de 7 vs. 105 días postcirugía ($p= 0.0208$). ($\#p<0.05$).

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo OBX – OBX, reveló diferencias estadísticas significativas en los grupos de 7 vs. 105 ($p= 0.0008$) y 28 vs 105 ($p= <0.0001$) días postcirugía. ($\#p<0.05$).

Figura 23 C). La OBX no altera el número de acicalamientos con respecto al tiempo. No se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Cirugía $F(2, 49) = 1.231$, $P=0.3008$; Tiempo $F(1, 49) = 1.900$, $P=0.1743$; Interacción $F(2, 49) = 0.4177$, $P=0.6609$].

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo SHAM – SHAM, no reveló diferencias estadísticas significativas.

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo OBX – OBX, no reveló diferencias estadísticas significativas.

$n=8-10$ ratas por grupo. ($*p<0.05$) para diferencias entre Sham y OBX en cada grupo postcirugía. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.V Análisis temporal de astrocitos de la CPF

El análisis temporal del número de astrocitos positivos a GFAP demuestra una regulación celular de las ratas con OBX 105 días postcirugía.

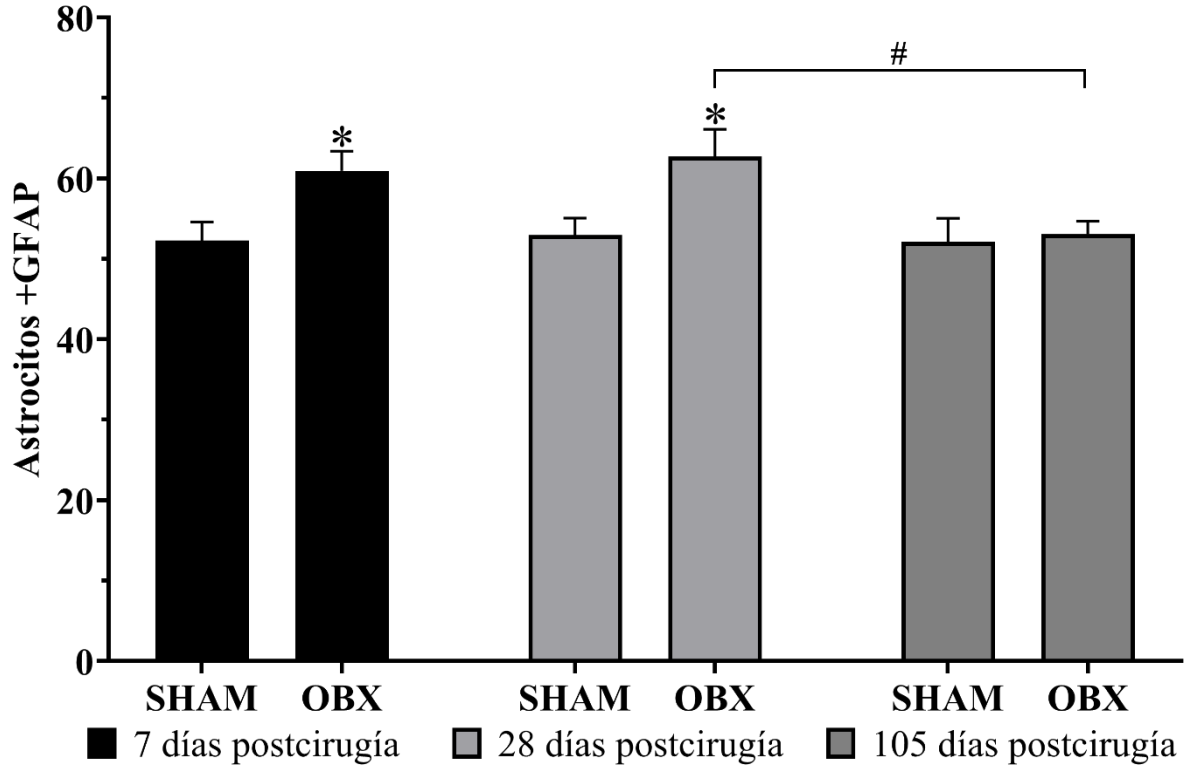


Figura 24) El aumento del número de astrocitos totales +GFAP a los 7 y 28 días es revertido a los 105 días postcirugía. Se presentaron diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA de dos vías [Cirugía $F(2, 49) = 2.157, P=0.1265$; Tiempo $F(1, 49) = 9.642, P=0.0032$; Interacción $F(2, 49) = 1.633, P=0.2058$].

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con los subgrupos SHAM – OBX, reveló diferencias estadísticas significativas en el grupo de 7 días ($p=0.0447$) y 28 días postcirugía ($p=0.0241$).

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo SHAM – SHAM no reveló diferencias estadísticas significativas.

El análisis *post hoc* de Sidak para comparaciones con respecto al tiempo OBX – OBX, reveló diferencias estadísticas significativas en el grupo de 28 vs 105 ($p=0.0391$) días postcirugía. ($\#p<0.05$).

$n=8-10$ ratas por grupo. ($*p<0.05$) para diferencias entre Sham y OBX en cada grupo postcirugía. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

VII.VI Microfotografía de astrocitos de la CPF

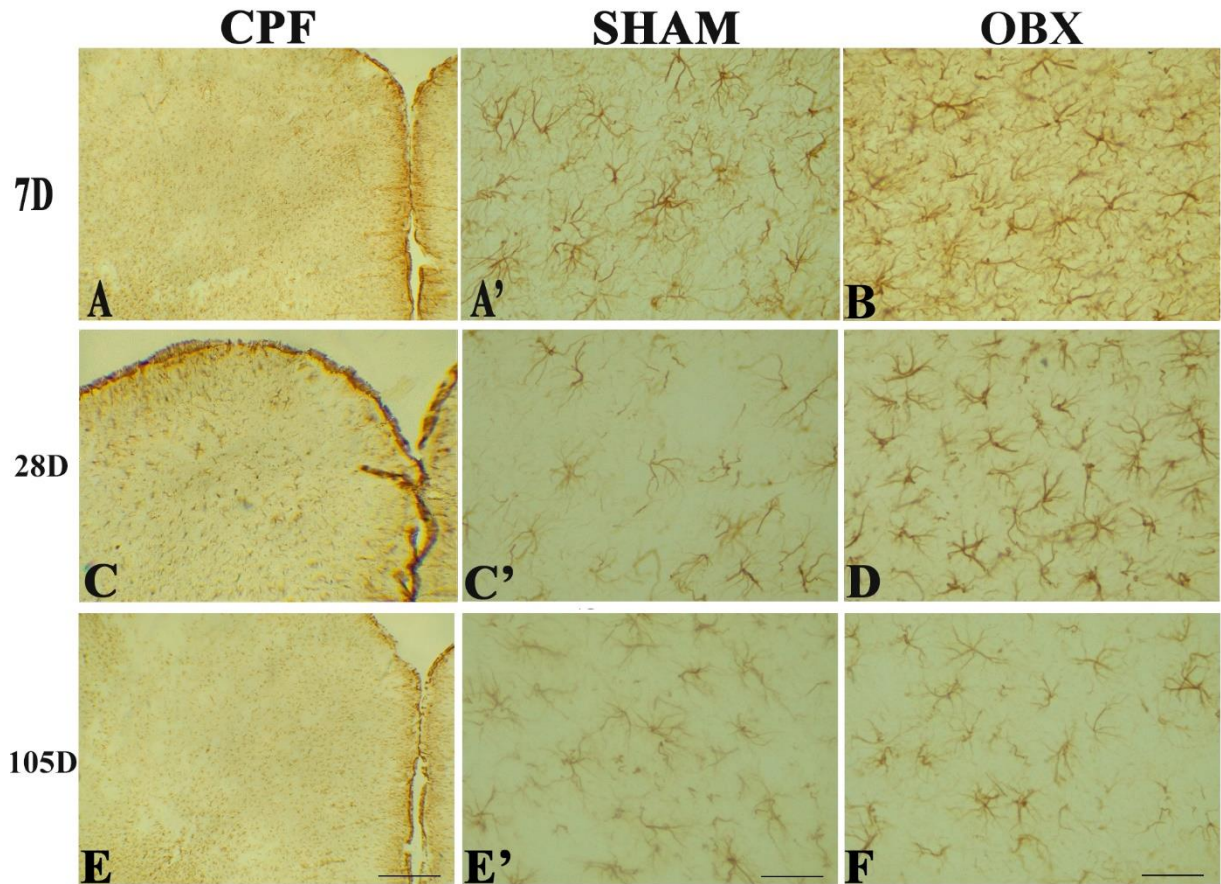


Figura 25. Astrocitos de la CPF marcados con anti-GFAP. Los paneles A, C y E tienen un aumento de 4X y se amplían en los paneles A', C' y E' con un aumento de 40X. B, D y F tienen un aumento de 40X. La barra de escala para E equivale a 500 μm , E' y F equivale a 50 μm . 7 días (7D), 28 días (28D) y 105 días (105D).

VII.VII Análisis de correlación

Evaluamos la asociación entre el número de astrocitos en la CPF y la locomoción en la PCA, 7 y 28 días postcirugía. En las figuras 26 y 27 indicamos la asociación y la variación que hay entre las variables.

VII.VII.I Grupo con 7 días de recuperación

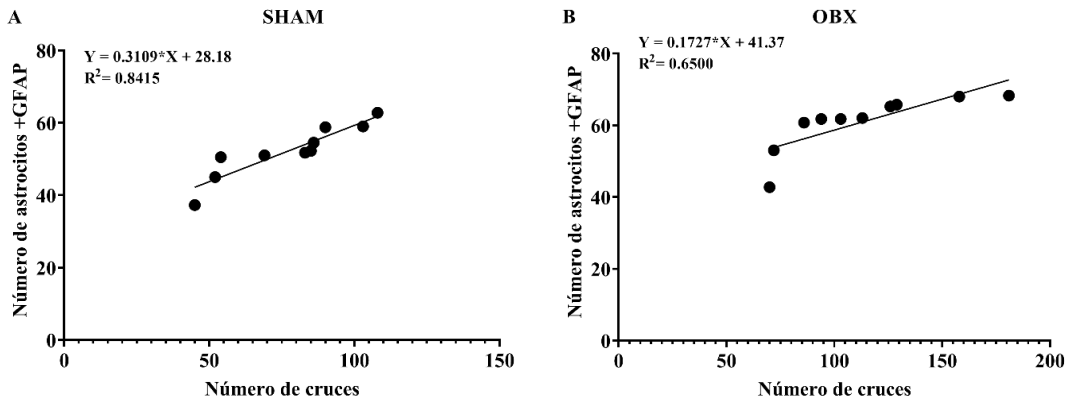


Figura 26. El análisis de correlación indica una asociación fuerte ($r=0.9173$ gráfica A) y ($r=0.9970$ gráfica B). La regresión lineal indica una variación entre la variable X de Y de ($r^2=0.8415$ gráfica A) y ($r^2=0.6500$ gráfica B); una pendiente de (0.3109 gráfica A) y de (0.1727 gráfica B); un Y-intercepto de (28.18 gráfica A) y (41.37 gráfica B); un X-intercepto de (-90.63 gráfica A) y (-239.5 gráfica B). La ecuación indica que la pendiente es significativamente distinta de cero ($p=0.0002$ gráfica A) y ($p=0.0048$ gráfica B). $n=10$ ratas por grupo.

VII.VII.II Grupo con 28 días de recuperación

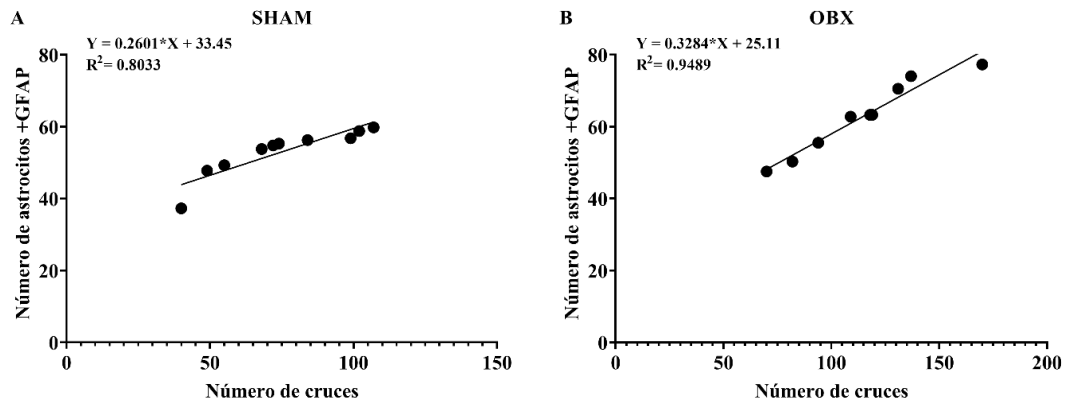


Figura 27. El análisis de correlación indica una asociación fuerte ($r=0.8963$ gráfica A) y ($r=0.9741$ gráfica B). La regresión lineal indica una variación entre la variable X de Y de ($r^2=0.8033$ gráfica A) y ($r^2=0.9489$ gráfica B); una pendiente de (0.2601 gráfica A) y de (0.3284 gráfica B); un Y-intercepto de (33.45 gráfica A) y (25.11 gráfica B); un X-intercepto de (-128.6 gráfica A) y (-76.45 gráfica B). La ecuación indica que la pendiente es significativamente distinta de cero ($p=0.0004$ gráfica A) y ($p<0.0001$ gráfica B). $n=9-10$ ratas por grupo.

VII.VIII Recapitulación de cambios

El modelo OBX genera un aumento de la locomoción en periodos de 7 y 28 días postcirugía, además, en el día 28 genera un aumento de la postura erguida en la PCA, coincidente con un aumento del número de astrocitos en la CPF. Además, en un periodo de 105 días postcirugía las alteraciones en la PCA y CPF se encuentran extinguidas; a pesar de la regulación conductual, los astrocitos de la BLA y la subregión CA1 del hipocampo demuestran procesos alargados.

	7 días post-OBX	28 días post-OBX	105 días post-OBX
Conducta	[↑] Locomoción	[↑] Locomoción y postura erguida	Sin cambios
CPF	[↑] Número de astrocitos	[↑] Número de astrocitos	Sin cambios
CA1	Sin cambios	Sin cambios	[↑] Procesos de astrocitos
BLA	Sin cambios	Sin cambios	[↑] Procesos de astrocitos

Tabla 5) Resumen de cambios conductuales en la PCA y de astrocitos ocasionados por el modelo OBX. [↑]: aumento.

VIII. DISCUSIÓN

Utilizamos ratas Wistar macho y formamos tres grupos independientes de 7, 28 y 105 días postcirugía respectivamente, esto, hizo posible evaluar el efecto temporal de la OBX en la conducta motora, la morfología y número de astrocitos en la CPF, BLA y el hipocampo dorsal (subregiones CA1, CA3 y GD). Los resultados conductuales demuestran que la rata con OBX presenta un aumento de la locomoción desde el día 7 y persiste hasta el día 28 postcirugía acompañado de un incremento de la frecuencia de erguidos, por último, las alteraciones conductuales son extinguidas en el día 105 postcirugía. En conjunto, en el día 7 y 28 postcirugía señalamos un aumento del número de astrocitos sin alteraciones morfológicas en la CPF, sin embargo, los astrocitos no presentan cambios en el número y en su morfología en la BLA y las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo. De forma contrastante, en el día 105 postcirugía, las ratas con OBX presentan astrocitos hipertróficos en la BLA y la subregión CA1 del hipocampo sin afectar el número de astrocitos, además, no hubo alteraciones morfológicas y en el número de astrocitos en la CPF, CA3 y GD del hipocampo.

VIII.I Alteraciones conductuales de la rata con OBX

En roedores, un aumento de la frecuencia de erguidos o acicalamientos en la PCA es interpretado como un comportamiento similar a la ansiedad (Kalueff & Tuohimaa, 2004; Prut & Belzung, 2003). Estos comportamientos alterados son repetitivos, invariables y aparentemente sin propósito o función. Además, un aumento de la locomoción de las ratas con OBX en la PCA es interpretada como una falta de adaptación a un entorno nuevo (Kelly et al., 1997; Morales-Medina et al., 2017; Song & Leonard, 2005). Sin embargo, hasta ahora no hay literatura publicada acerca del aumento de la locomoción de la rata con OBX en la PCA durante un periodo de 7 días. Por lo que, somos los primeros en describir que la rata Wistar macho con OBX tiene una adaptación deficiente a un entorno nuevo desde un periodo corto.

A su vez, en ratas con OBX 28 días postcirugía reportamos un aumento de la locomoción y postura erguida en la PCA. De forma semejante, en ratas con OBX 27 días postcirugía existe un aumento de la locomoción, postura erguida y acicalamientos en la PCA durante un periodo de 10 minutos (Morales-Medina et al., 2013). De igual forma, en ratas con OBX 29 días postcirugía han reportado un aumento de la locomoción en la PCA durante un periodo de 5 minutos (Mar et al., 2002). Sin embargo, el grupo anterior administró agua desionizada por vía IP antes de la PCA durante 21 días, además, no se analizó la frecuencia de erguidos y acicalamientos. En definitiva, la rata con OBX presenta mayores alteraciones conductuales dentro de la PCA en un periodo aproximado de 4 semanas, sin embargo, las conductas analizadas pueden ser sensibles a las condiciones de la prueba (Kelly et al., 1997; Mar et al., 2002) manipulación y la cepa utilizada. Ya que, Morales-Medina et al., (2013) y Mar et al., (2002) utilizaron la cepa Sprague-Dawley. Por lo que, nuestro estudio unifica las condiciones y las posibles variaciones de la PCA en la rata Wistar macho con OBX, en tres periodos postcirugía.

Nuestros resultados sugieren que las ratas con OBX expuestas a la PCA durante un periodo de 7 y 28 días postcirugía demuestran una adaptación deficiente a un entorno nuevo y un aumento del comportamiento similar a la ansiedad. Se ha reportado que la habituación a la PCA no se desarrolla en ratas con lesiones en la CPF (Sousa et al., 2006). Además, la OBX induce atrofia dendrítica en neuronas piramidales de la PirC y disminución de la proliferación celular en neuronas del GD del hipocampo (Morales-Medina et al., 2013), una región clave para la

codificación de la novedad (Kaplan et al., 2014). Actualmente, los mecanismos neuronales involucrados no están claros, sin embargo, nuestros resultados señalan que la alteración conductual puede estar relacionada con las alteraciones de los astrocitos en la CPF, pero no parece tener relación con los astrocitos de la BLA y la subregión CA1, CA3 y GD del hipocampo.

Dentro de otros factores involucrados en la falta de adaptación a la novedad se encuentra el sistema glutamatérgico. Existen proyecciones glutamatérgicas desde la CPF hacia el hipocampo y estas regiones están involucradas en las funciones motoras (Ho et al., 2000; Zhou et al., 2020). La transmisión glutamatérgica por el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) parece alterarse después de la OBX, lo que puede contribuir a la hiperactividad conductual (Harkin et al., 2003). De hecho, las ratas Wistar macho con OBX 15 días postcirugía aumentan transitoriamente los niveles de glutamato extracelular en el cuerpo estriado simultáneamente con un aumento de la locomoción dentro de un ambiente nuevo, después de 10 minutos, las respuestas glutamatérgica y locomotora son progresivamente atenuadas (Ho et al., 2000). En concreto, estos hallazgos señalan que la exposición a un entorno nuevo induce la activación rápida del sistema glutamatérgico con una duración relativamente corta. Es posible que el modelo OBX involucre alteraciones del glutamato 7 y 28 días postcirugía.

Por otro lado, una explicación que puede aclarar estas alteraciones del comportamiento similar a la ansiedad en la PCA son las respuestas fisiológicas, debido a la hipersecreción de corticosterona en condiciones normales de la rata con OBX (Kelly et al., 1997). Según Harkin et al., (2003) las ratas con OBX presentan una mayor concentración plasmática de corticosterona, pero no de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en condiciones basales, y mayores concentraciones de corticosterona y ACTH tras el estrés. En conjunto, existe un aumento de corticosterona plasmática desencadenada tras el estrés de la novedad (Weinstock et al., 1998).

La mayor liberación de glutamato de ratas con OBX durante la exposición a un entorno nuevo puede atribuirse parcialmente a la elevación de los niveles plasmáticos de corticosterona que induce el mismo modelo (Harkin et al., 2003; Kelly et al., 1997). Debido a que la corticosterona

afecta las concentraciones de glutamato extracelular en el cerebro y según Lowy et al., (1993) puede contribuir a los efectos deletéreos en neuronas del hipocampo. Además, los astrocitos son los encargados de mantener la homeostasis sináptica eliminando el exceso de glutamato, mediante el GLT1 (Blackburn et al., 2009). En conclusión, estas modificaciones fisiológicas en el modelo OBX señalan la hipótesis endocrina y de la amina biogénica sobre la etiología de la depresión en la condición humana (Jesulola et al., 2018).

Nuestros resultados demuestran que el aumento de la locomoción y la frecuencia de erguidos dentro de la PCA son extinguidos a los 105 días postcirugía. De igual forma, este es el primer trabajo que realiza un análisis conductual durante un periodo largo, por lo que, nuestros resultados servirán para contemplar a los periodos postcirugía en futuras investigaciones.

VIII.II Alteraciones morfológicas y del número de astrocitos en la rata con OBX

Actualmente no existe el marcador universal para revelar todos los astrocitos del sistema nervioso, ya que, la heterogeneidad morfológica de los astrocitos coincide con una diversidad de expresión de moléculas, sin embargo, la expresión de GFAP está regulada positivamente en los astrocitos reactivos (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Desde el descubrimiento de la GFAP se observó su uso como biomarcador exclusivo del citoesqueleto de los astrocitos (Messing & Brenner, 2020; Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Vale la pena mencionar que, la eliminación genética de GFAP en ratones produce atrofia de los astrocitos (es decir los astrocitos eran de menor tamaño) (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Por lo que, la inmunohistoquímica con GFAP es considerada la mejor técnica para evaluar el fenotipo de los astrocitos.

Nuestros resultados señalan un aumento del número de astrocitos sin alteraciones morfológicas en la CPF de ratas con OBX en un periodo de 7 y 28 días postcirugía. El astrocito es considerado la célula más importante en la formación de cicatrices después del daño en el SNC, aunque, el mecanismo de formación de la cicatriz glial aún no se conoce, se supone que está involucrada la activación y migración de los astrocitos (Lee et al., 2015). Posiblemente, los astrocitos activados se diferencien de las células progenitoras multipotenciales y migran al sitio de la lesión y alternativamente, los astrocitos existentes en el área que rodea el sitio de la lesión pueden activarse y proliferar (Lee et al., 2015).

La mPFC es una región que desempeña papeles esenciales en el proceso cognitivo, la regulación de la emoción, motivación y sociabilidad, por lo que, su disfunción en los sistemas: glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico y serotoninérgico (5-HT) se ha encontrado en la depresión y trastornos de ansiedad (Xu et al., 2019). Por ejemplo, en estudios *post mortem* de pacientes que completaron el suicidio y con trastorno bipolar revelan una reducción de 5-HT en la PFC (Takahashi et al., 2018). Después de la OBX aumentan la expresión de los receptores 5-HT₂ y se producen niveles bajos de 5-HT en la CPF junto con un aumento de la densidad de los transportadores de 5-HT y de las concentraciones de triptófano hidroxilasa (Harkin et al., 2003). Además, en ratones macho de la cepa ddY con OBX el tratamiento con aripiprazol, un agonista parcial de los receptores 5-HT₁, mejoró los comportamientos tipo depresivos en la prueba de nado forzado (Takahashi et al., 2018). Esto demuestra que la OBX induce una disminución de serotonina y un aumento en la distribución de los receptores a 5-HT en la CPF.

Después de 7 y 28 días de recuperación de la cirugía OBX o Sham, las ratas no mostraron alteraciones morfológicas y del número de los astrocitos en las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo y BLA. De forma semejante, utilizando el modelo de depresión CUMS Naskar & Chattarji, (2019) no señalan alteraciones morfológicas de los astrocitos en la subregión CA3 del hipocampo durante un periodo de 11 días. En contraste, Virmani et al., (2021) en el modelo de depresión por CIS, identificaron atrofia de los astrocitos en la subregión del GD y CA3 durante un periodo de 23 días. Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferentes factores estresantes.

En un periodo de 105 días postcirugía OBX reportamos que los astrocitos de la BLA y la subregión CA1 del hipocampo tienen un aumento de la arborización, la longitud y el orden de sus prolongaciones. Tanto el hipocampo como la amígdala son importantes para el control de las emociones y la regulación de la ansiedad, por lo que, son áreas altamente estudiadas en el TDM. Como mencionamos anteriormente, somos los primeros en evaluar la morfología de los astrocitos del hipocampo y la BLA en un periodo de 105 días postcirugía OBX. Sin embargo, en un periodo previo a 105 días postcirugía, Takahashi et al., (2018) reportaron que en ratón macho de la cepa ddY, 42 días post-OBX hay un aumento del número de astrocitos positivos a GFAP con procesos alargados en comparación con los controles en el GD del hipocampo. Por

lo que puede haber efectos morfológicos divergentes en astrocitos dependiendo del tiempo y de la especie.

Además, la eliminación de los receptores a glucocorticoides en los astrocitos de BLA reduce el comportamiento similar a la ansiedad en la PCA; y la activación de los receptores acoplados a proteína G en el hipocampo dorsal atenúan el aprendizaje del miedo potenciado por el estrés (Lyon & Allen, 2022). Por lo que, valdría la pena realizar otras pruebas conductuales 105 días postcirugía OBX, como el laberinto elevado, que se utiliza para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad en roedores.

Se ha informado que en ratas macho Wistar con OBX presentan un aumento de neuronas inmunorreactivas a c-Jun (marcador de activación neuronal) en la BLA desde el día 8 y persisten hasta el día 64 después de la lesión (Wrynn et al., 2000). Aunque ya no se siguió evaluando por más tiempo la presencia de c-Jun, el grupo de investigación de Wrynn et al., (2000) menciona que esta inmunoreactividad prolongada de c-Jun está relacionada con cierta capacidad de regeneración, remodelación o supervivencia neuronal en BLA y sirve como posible indicador de hiperactividad. Harkin et al., (2003) mencionan que, después de la OBX existe un aumento de la actividad eléctrica y de la captación de 2-desoxi-D-glucosa junto con alteraciones en la transmisión de serotonina y noradrenalina en la BLA. Por lo tanto, después de la OBX se producen alteraciones a corto y largo plazo en la BLA.

Nuestro estudio respalda la idea de que la neuro inflamación puede desempeñar un papel fundamental en la etiología del TDM. Ya que, estudios previos en pacientes deprimidos han informado niveles elevados de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6) (Rahimian et al., 2022). El TNF- α también ejerce funciones homeostáticas y es producido en el SNC por astrocitos, neuronas, microglía y células endoteliales, sin embargo, en condiciones patológicas, la microglía libera grandes cantidades de esta citoquina (Olmos & Lladó, 2014). De hecho, el TNF- α facilita la comunicación bidireccional entre la microglía y los astrocitos para promover la liberación de glutamato de los astrocitos, la formación de sinapsis excitatorias y la liberación de más TNF- α por la microglía (Olmos & Lladó, 2014). Igualmente, la IL-6 es producida por astrocitos, microglía, neuronas,

células endoteliales y epiteliales, sin embargo, dependiendo de la presencia del receptor de IL-6 o de la glicoproteína 130 (gp130) unida a la membrana, utilizada como transductor de señal, tiene propiedades proinflamatorias o antiinflamatorias (Rahimian et al., 2022). La IL-6 se encuentra elevada de manera constante en la sangre de pacientes con TDM y los niveles periféricos de IL-6 se correlacionan con la gravedad de los síntomas de los pacientes que no responden a los antidepresivos (Lanquillon et al., 2000). Por lo tanto, las vías mediadas por TNF- α en astrocitos-microglía puede potenciar la citotoxicidad mediada por glutamato y la hipersecreción de IL-6 puede conducir a una inflamación contribuyente al empeoramiento del TDM.

Como se ha mencionado el TDM es heterogéneo, es decir, varios factores, solos o en combinación, pueden predisponer al trastorno (Jesulola et al., 2018). En este caso el modelo de la OBX es una herramienta que nos permite investigar factores neuronales, endocrinos, inmunológicos y neurotransmisores contemplados en la fisiopatología de la depresión humana. Además, los cambios inducidos después de la OBX parecen relacionarse con un proceso neurodegenerativo progresivo que produce disfunción en las áreas límbicas que involucra una variedad de cambios neurobiológicos y conductuales, lo que propone un buen modelo animal de depresión. Como he mencionado, el sentimiento de la ansiedad es un factor de riesgo importante en individuos susceptibles para la depresión. Por lo que este trabajo, abona a la información sobre la regulación de los astrocitos qué determina el umbral entre las respuestas desadaptativas y adaptativas dentro de la PCA. Por lo que, en un futuro, estos hallazgos que señalan la modificación conductual y de astrocitos en la CPF, BLA y la subregión CA1 de hipocampo en la rata pueden aplicarse al humano con el objetivo de prevenir, diagnosticar y dirigir un tratamiento eficaz al TDM. Sin embargo, la falta de conocimiento pragmático del aumento del tamaño de orden de las prolongaciones de los astrocitos demuestra que nuestro conocimiento de su funcionalidad está muy por detrás de nuestra comprensión y se necesitan estudios adicionales.

IX. CONCLUSIÓN

La rata Wistar macho con OBX demuestra conducta alterada asociada con gliosis reactiva en la CPF en periodos específicos postcirugía.

X. PERSPECTIVAS

- Analizar agentes farmacológicos específicos inhibidores a GFAP 7 y 28 días postcirugía OBX.
- Estudiar el mecanismo funcional del orden y tamaño de las prolongaciones de los astrocitos.
- Realizar nuevos paradigmas relacionados con el comportamiento similar a la ansiedad 105 días postcirugía OBX.

XI. REFERENCIAS

- Altshuler, L. L., Abulseoud, O. A., Foland-Ross, L., Bartzokis, G., Chang, S., Mintz, J., Helleman, G., & Vinters, H. V. (2010). Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, *12*(5), 541–549. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2010.00838.x>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N., & Shaw, P. J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: A future therapeutic target? *Glia*, *57*(12), 1251–1264. <https://doi.org/10.1002/glia.20848>
- Bludau, S., Bzdok, D., Gruber, O., Kohn, N., Riedl, V., Sorg, C., Palomero-Gallagher, N., Müller, V. I., Hoffstaedter, F., Amunts, K., & Eickhoff, S. B. (2016). Medial Prefrontal Aberrations in Major Depressive Disorder Revealed by Cytoarchitectonically Informed Voxel-Based Morphometry. *American Journal of Psychiatry*, *173*(3), 291–298. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15030349>
- Bradley, R. A., Shireman, J., McFalls, C., Choi, J., Canfield, S. G., Dong, Y., Liu, K., Lisota, B., Jones, J. R., Petersen, A., Bhattacharyya, A., Palecek, S. P., Shusta, E. V., Kendzioriski, C., & Zhang, S.-C. (2019). Regionally specified human pluripotent stem cell-derived astrocytes exhibit different molecular signatures and functional properties. *Development (Cambridge, England)*, *146*(13). <https://doi.org/10.1242/dev.170910>
- Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F., & Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *14*(3 I), 1030–1037. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01030.1994>
- Burke, N. N., Geoghegan, E., Kerr, D. M., Moriarty, O., Finn, D. P., & Roche, M. (2013). Altered neuropathic pain behaviour in a rat model of depression is associated with changes in inflammatory gene expression in the amygdala. *Genes, Brain, and Behavior*, *12*(7), 705–713. <https://doi.org/10.1111/gbb.12080>
- Cain, D. P. (1974). The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychological Bulletin*, *81*(10), 654–671. <https://doi.org/10.1037/h0036954>

- Castaneda, A. E., Tuulio-Henriksson, A., Marttunen, M., Suvisaari, J., & Lönnqvist, J. (2008). A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. *Journal of Affective Disorders*, *106*(1–2), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2007.06.006>
- Chávez, C. E., Oyarzún, J. E., Avendaño, B. C., Mellado, L. A., Inostroza, C. A., Alvear, T. F., & Orellana, J. A. (2019). The Opening of Connexin 43 Hemichannels Alters Hippocampal Astrocyte Function and Neuronal Survival in Prenatally LPS-Exposed Adult Offspring. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(13:460). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00460>
- Cízková D, Raceková E, V. I. (1997). The expression of B-50/GAP-43 and GFAP after bilateral olfactory bulbectomy in rats. *Physiol Res.*, *46*(6), 487–495.
- Cobb, J. A., O'Neill, K., Milner, J., Mahajan, G. J., Lawrence, T. J., May, W. L., Miguel-Hidalgo, J., Rajkowska, G., & Stockmeier, C. A. (2016). Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. *Neuroscience*, *316*, 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.044>
- Cope, E. C., & Gould, E. (2019). Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, *24*(5), 690–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023>
- Cotter, D. R., Pariante, C. M., & Everall, I. P. (2001). Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Research Bulletin*, *55*(5), 585–595. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00527-5](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00527-5)
- Coyle, J. T., & Schwarcz, R. (2000). Mind Glue. *Archives of General Psychiatry*, *57*(1), 90. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.1.90>
- Croy, I., Negoias, S., Symmank, A., Schellong, J., Joraschky, P., & Hummel, T. (2013). Reduced Olfactory Bulb Volume in Adults with a History of Childhood Maltreatment. *Chemical Senses*, *38*(8), 679–684. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt037>
- Croy, I., Nordin, S., & Hummel, T. (2014). Olfactory Disorders and Quality of Life--An Updated Review. *Chemical Senses*, *39*(3), 185–194. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt072>
- Dai, L., Zhou, H., Xu, X., & Zuo, Z. (2019). Brain structural and functional changes in patients with major depressive disorder: a literature review. *PeerJ*, *7*, e8170. <https://doi.org/10.7717/peerj.8170>

- Escartin, C., Guillemaud, O., & Carrillo-de Sauvage, M. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67(12), 2221–2247. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 65. <https://doi.org/10.3791/3564>
- Glezer, I., & Malnic, B. (2019). Olfactory receptor function. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 164). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00005-8>
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0071444>
- Harkin, A., Kelly, J. P., & Leonard, B. E. (2003). A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clinical Neuroscience Research*, 3(4–5), 253–262. [https://doi.org/10.1016/S1566-2772\(03\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S1566-2772(03)00087-2)
- Hasegawa, Y., Ma, M., Sawa, A., Lane, A. P., & Kamiya, A. (2022). Olfactory impairment in psychiatric disorders: Does nasal inflammation impact disease psychophysiology? *Translational Psychiatry*, 12(1), 314. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02081-y>
- Hercher, C., Turecki, G., & Mechawar, N. (2009). Through the looking glass: Examining neuroanatomical evidence for cellular alterations in major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 43(11), 947–961. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.01.006>
- Ho, Y.-J., Chang, Y.-C., Liu, T.-M., Tai, M.-Y., Wong, C.-S., & Tsai, Y.-F. (2000). Striatal glutamate release during novelty exposure-induced hyperactivity in olfactory bulbectomized rats. *Neuroscience Letters*, 287(2), 117–120. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01152-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01152-6)
- Hodes, G. E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., & Russo, S. J. (2015). Neuroimmune mechanisms of depression. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1386–1393. <https://doi.org/10.1038/nn.4113>
- Jesulola, E., Micalos, P., & Baguley, I. J. (2018). Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? *Behavioural Brain Research*, 341, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.025>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*, 11(9), 1361.

<https://doi.org/10.3390/biom11091361>

- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.04.002>
- Kaplan, R., Horner, A. J., Bandettini, P. A., Doeller, C. F., & Burgess, N. (2014). Human hippocampal processing of environmental novelty during spatial navigation. *Hippocampus*, 24(7), 740–750. <https://doi.org/10.1002/hipo.22264>
- Kaufmann, F. N., & Menard, C. (2018). Inflamed Astrocytes: A Path to Depression Led by Menin. *Neuron*, 100(3), 511–513. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.039>
- Kelly, J. P., Wrynn, A. S., & Leonard, B. E. (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(3), 299–316. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00004-1)
- Kempton, M. J., Salvador, Z., Munafò, M. R., Geddes, J. R., Simmons, A., Frangou, S., & Williams, S. C. R. (2011). Structural Neuroimaging Studies in Major Depressive Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 68(7), 675. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.60>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Koenigs, M., & Grafman, J. (2009). The functional neuroanatomy of depression: Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 201(2), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.004>
- Kozler, P., Maresova, D., & Pokorny, J. (2017). Study of locomotion, rearing and grooming activity after single and/or concomitant lesions of central and peripheral nervous system in rats. *Neuro Endocrinology Letters*, 38(7), 495–501. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29369601>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 99–103). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2011). Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (pp. 121–147).

https://doi.org/10.1007/7854_2010_108

- Lanquillon, S., Krieg, J. C., Bening-Abu-Shach, U., & Vedder, H. (2000). Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 22(4), 370–379. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00134-7)
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Current Biology*, 17(20), R868–R874. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005>
- Lee, K. H., Lee, D. W., & Kang, B. C. (2020). The ‘R’ principles in laboratory animal experiments. *Laboratory Animal Research*, 36(1), 45–47. <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00078-6>
- Lee, Park, S.-C., Choe, I.-S., Kim, Y., & Ha, Y.-S. (2015). Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. *Korean Journal of Neurotrauma*, 11(2), 44. <https://doi.org/10.13004/kjnt.2015.11.2.44>
- Lever, C., Burton, S., & O’Keefe, J. (2006). Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17(1–2). <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111>
- Lever, Colin, Burton, S., & O’Keefe, J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17(1–2), 111–133. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111>
- Lipska, B. (2000). To Model a Psychiatric Disorder in Animals Schizophrenia As a Reality Test. *Neuropsychopharmacology*, 23(3), 223–239. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00137-8)
- Lombion-Pouthier, S., Vandell, P., Nezelof, S., Haffen, E., & Millot, J.-L. (2006). Odor perception in patients with mood disorders. *Journal of Affective Disorders*, 90(2–3), 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2005.11.012>
- Lowery, J., Kuczarski, E. R., Herrmann, H., & Goldma, R. D. (2015). Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17145–17153. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.640359>
- Lowy, M. T., Gault, L., & Yamamoto, B. K. (1993). Rapid Communication: Adrenalectomy Attenuates Stress-Induced Elevations in Extracellular Glutamate Concentrations in the

- Hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 61(5), 1957–1960.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb09839.x>
- Lyon, K. A., & Allen, N. J. (2022). From Synapses to Circuits, Astrocytes Regulate Behavior. *Frontiers in Neural Circuits*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.786293>
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., & Maj, M. (2009). The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 27–53. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9118-1>
- Mar, A., Spreekmeester, E., & Rochford, J. (2002). Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 73(3), 703–712. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00881-x](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00881-x)
- McKinnon, M. C., Yucel, K., Nazarov, A., & MacQueen, G. M. (2009). A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 34(1), 41–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125212>
- Messing, A., & Brenner, M. (2020). GFAP at 50. *ASN Neuro*, 12, 1759091420949680. <https://doi.org/10.1177/1759091420949680>
- Miguel-Hidalgo, J. J., Baucom, C., Dilley, G., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., Stockmeier, C. A., & Rajkowska, G. (2000). Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, 48(8), 861–873. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00999-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00999-9)
- Monfil, T., Vázquez Roque, R. A., Camacho-Abrego, I., Tendilla-Beltran, H., Iannitti, T., Meneses-Morales, I., Aguilar-Alonso, P., Flores, G., & Morales-Medina, J. C. (2018). Hyper-response to Novelty Increases c-Fos Expression in the Hippocampus and Prefrontal Cortex in a Rat Model of Schizophrenia. *Neurochemical Research*, 43(2), 441–448. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2439-x>
- Morales-Medina, J. C., Dumont, Y., Bonaventure, P., & Quirion, R. (2012). Chronic administration of the Y2 receptor antagonist, JNJ-31020028, induced anti-depressant like-

- behaviors in olfactory bulbectomized rat. *Neuropeptides*, 46(6), 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.009>
- Morales-Medina, J. C., Iannitti, T., Freeman, A., & Caldwell, H. K. (2017). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway. *Behavioural Brain Research*, 317, 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.029>
- Morales-Medina, J. C., Juárez, I., Venancio-García, E., Cabrera, S. N., Menard, C., Yu, W., Flores, G., Mechawar, N., & Quirion, R. (2013). Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience*, 236, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.037>
- Morales Medina, J. C., Paredes, G. G., Vázquez Hernández, A. J., Teoyotl, P. S., Vázquez Roque, R. A., & Flores, G. (2019). Olfactory bulbectomy induces learning and memory deficits associated with impaired structural plasticity in the rat. *IBRO Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.07.254>
- Naskar, S., & Chattarji, S. (2019). Stress Elicits Contrasting Effects on the Structure and Number of Astrocytes in the Amygdala versus Hippocampus. *Eneuro*, 6(1), ENEURO.0338-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0338-18.2019>
- Negoias, S., Croy, I., Gerber, J., Puschmann, S., Petrowski, K., Joraschky, P., & Hummel, T. (2010). Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience*, 169(1), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.012>
- NOM-062-ZOO-1999. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. In *Norma Oficial Mexicana*.
- Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/861231>
- Ongur, D. (2000). The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebral Cortex*, 10(3), 206–219. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
- Ongür, D., Drevets, W. C., & Price, J. L. (1998). Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 95(22), 13290–13295. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13290>
- Pause, B. M., Miranda, A., Göder, R., Aldenhoff, J. B., & Ferstl, R. (2001). Reduced olfactory performance in patients with major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 35(5), 271–277. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(01\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(01)00029-2)
- Paxinos, G. and Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Third edit). Academic Press.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
- Pizzagalli, D. A., & Roberts, A. C. (2022). Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), 225–246. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01101-7>
- Postolache, T. T., Doty, R. L., Wehr, T. A., Jimma, L. A., Han, L., Turner, E. H., Matthews, J. R., Neumeister, A., No, C., Kroger, H., Bruder, G. E., & Rosenthal, N. E. (1999). Monorhinal odor identification and depression scores in patients with seasonal affective disorder. *Journal of Affective Disorders*, 56(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(99)00027-0)
- Postolache, T. T., Wehr, T. A., Doty, R. L., Sher, L., Turner, E. H., Bartko, J. J., & Rosenthal, N. E. (2002). Patients With Seasonal Affective Disorder Have Lower Odor Detection Thresholds Than Control Subjects. *Archives of General Psychiatry*, 59(12), 1119. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.59.12.1119>
- Potter, W. Z. (1996). Adrenoceptors and serotonin receptor function: Relevance to antidepressant mechanisms of action. In *Journal of Clinical Psychiatry* (pp. 4–8).
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Rahimian, R., Belliveau, C., Chen, R., & Mechawar, N. (2022). Microglial Inflammatory-Metabolic Pathways and Their Potential Therapeutic Implication in Major Depressive Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.871997>
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S. D., Meltzer, H. Y., Overholser, J. C., Roth, B. L., & Stockmeier, C. A. (1999). Morphometric evidence for

- neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression**See accompanying Editorial, in this issue. *Biological Psychiatry*, 45(9), 1085–1098. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00041-4)
- Roddy, D. W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., O’Keane, V., & O’Hanlon, E. (2019). The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biological Psychiatry*, 85(6), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.021>
- Sah, P. (2017). Fear, Anxiety, and the Amygdala. *Neuron*, 96(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.013>
- Song, C., & Leonard, B. E. (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4–5), 627–647. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.010>
- Sousa, N., Almeida, O. F. X., & Wotjak, C. T. (2006). A hitchhiker’s guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes, Brain and Behavior*, 5, 5–24. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x>
- Strange, B. A., Hurlmann, R., Duggins, A., Heinze, H.-J., & Dolan, R. J. (2005). Dissociating intentional learning from relative novelty responses in the medial temporal lobe. *NeuroImage*, 25(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.12.014>
- Sturman, O., Germain, P.-L., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 21(5), 443–452. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
- Su, C.-Y., Menuz, K., & Carlson, J. R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell*, 139(1), 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.015>
- Takahashi, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Kadota, S., Isono, J., Odaira, T., Sakuma, W., Arai, Y., Tadano, T., & Tan-No, K. (2018). Memantine ameliorates depressive-like behaviors by regulating hippocampal cell proliferation and neuroprotection in olfactory bulbectomized mice. *Neuropharmacology*, 137, 141–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.04.013>
- Takahashi, K., Nakagawasai, O., Nemoto, W., Odaira, T., Sakuma, W., & Tan-No, K. (2018). Antidepressant-like effect of aripiprazole via 5-HT1A, D1, and D2 receptors in the

- prefrontal cortex of olfactory bulbectomized mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(3), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.06.006>
- Torres-Platas, S. G., Hercher, C., Davoli, M. A., Maussion, G., Labonté, B., Turecki, G., & Mechawar, N. (2011). Astrocytic Hypertrophy in Anterior Cingulate White Matter of Depressed Suicides. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2650–2658. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.154>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). Principles of Anatomy and Physiology 13th ed - G. Tortora, B. Derrickson (Wiley, 2012) BBS.pdf. In *Principles of anatomy and physiology*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- van Riezen, H., & Leonard, B. E. (1990). Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacology & Therapeutics*, 47(1), 21–34. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90043-2)
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vinkers, C. H., Breuer, M. E., Westphal, K. G. C., Korte, S. M., Oosting, R. S., Olivier, B., & Groenink, L. (2009). Olfactory bulbectomy induces rapid and stable changes in basal and stress-induced locomotor activity, heart rate and body temperature responses in the home cage. *Neuroscience*, 159(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.009>
- Virmani, G., D'almeida, P., Nandi, A., & Marathe, S. (2021). Subfield-specific effects of chronic mild unpredictable stress on hippocampal astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, ejn.15234. <https://doi.org/10.1111/ejn.15234>
- Wang, Q., Timberlake, M. A., Prall, K., & Dwivedi, Y. (2017). The recent progress in animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 77, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.008>
- Weinstock, M., Poltyrev, T., Schorer-Apelbaum, D., Men, D., & McCarty, R. (1998). Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiology & Behavior*, 64(4), 439–444. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00056-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00056-0)
- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology*, 13(3), 169–188.

<https://doi.org/10.1097/00008877-200205000-00001>

- World Health Organization (WHO). (2018). *OMS | Depresión*. WHO.
- Wrynn, A. S., Sebens, J. B., Koch, T., Leonard, B. E., & Korf, J. (2000). Prolonged c-Jun expression in the basolateral amygdala following bulbectomy: possible implications for antidepressant activity and time of onset. *Molecular Brain Research*, *76*(1), 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00326-5](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00326-5)
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological Genomics*, *51*(9), 432–442. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2019>
- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, *38*(6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Zald, D. H. (2007). Orbital Versus Dorsolateral Prefrontal Cortex: Anatomical Insights into Content Versus Process Differentiation Models of the Prefrontal Cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1121*(1), 395–406. <https://doi.org/10.1196/annals.1401.012>
- Zhang, H., Li, L., Wu, M., Chen, Z., Hu, X., Chen, Y., Zhu, H., Jia, Z., & Gong, Q. (2016). Brain gray matter alterations in first episodes of depression: A meta-analysis of whole-brain studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *60*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.011>
- Zhou, X.-T., Bao, W.-D., Liu, D., & Zhu, L.-Q. (2020). Targeting the Neuronal Activity of Prefrontal Cortex: New Directions for the Therapy of Depression. *Current Neuropharmacology*, *18*(4), 332–346. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666191101124017>
- Zubieta, J.-K., Smith, Y. R., Bueller, J. A., Xu, Y., Kilbourn, M. R., Jewett, D. M., Meyer, C. R., Koeppe, R. A., & Stohler, C. S. (2002). μ -opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(12), 5100–5107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.039>

XII. ABREVIATURAS

ABC - Complejo avidina-biotina	CIS - Estrés inmóvil crónico
Ac - Anticuerpo	PFA - Paraformaldehído
ANOVA - Análisis de varianza	PFC - Corteza prefrontal
APA - American Psychiatric Association	PirC - Corteza piriforme
ARNm - Ácido ribonucleico mensajero	SEM - Media \pm error estándar
BLA - Amígdala basolateral	SNC - Sistema nervioso central
CA1 - Subregión del hipocampo	SNP - Sistema nervioso periférico
CA3 - Subregión del hipocampo	TDM - Trastorno depresivo mayor
CAA - Corteza anterior cingulada	vmCPF - Corteza prefrontal ventromedial
CIRA - Centro de Investigación en Reproducción Animal	WHO - World Health Organization
CPF - Corteza prefrontal	
IP - Intraperitoneal	
LUX - Lumen	
mPFC - Corteza prefrontal medial	
GFAP - Proteína ácido fibrilar glial	
H ₂ O ₂ - Peróxido de hidrógeno	
NMDA - N-metil-D-aspartato	
NOM - Norma oficial mexicana	
OB - Bulbos olfatorios	
EEG - Electroencefalograma	
GD - Giro dentado	
OBX - Bulbectomía olfatoria bilateral	
PBS 1x - Solución buffer de fosfatos 1x	
PCA - Prueba de campo abierto	
CUMS - Estrés crónico leve e impredecible	
DAB - 3-3'-diaminobenzidina	
dIPFC - Corteza prefrontal dorsolateral	

XIII. ANEXOS

XIII.I Protocolo de inmunohistoquímica de GFAP

Cortes coronales de 40 μm de grosor en vibratomo, cada sección se colocará en series de 4 por cerebro.

Día 1

Las secciones serán lavadas en solución PBS 1x (2x5) min si el tejido es fresco. Sin embargo, si las secciones se encuentran en agente crioprotector se lavarán 2 veces más. Es importante que las secciones sean agitadas en todo momento durante la incubación.

PBS 4 x 5 min ___ ___ ___ ___

Las secciones serán incubadas en H_2O_2 fresco al 1.5% disuelto en PBS 1x recién preparado durante 5 minutos.

H_2O_2 x 5 min ___

Posteriormente las secciones se deberán enjuagar en PBS 1x frío 2x5 min.

PBS 1x frío 2 x 5 min ___ ___

Después de los enjuagues las secciones deberán ser incubadas con el agente bloqueador (PBS 1x + 0.3 % tritón x - 100 + 3 % de suero normal de conejo) **durante 2 horas.**

Incubación 2 h ___

- Regresar el agente bloqueador a su recipiente original y almacenar a 4° C.

Una vez transcurridas las 2 horas se agregará a las secciones el anticuerpo (Ac) primario (anti-GFAP ab53554 de cabra [1:500]) en antisuero diluyente (PBS 1x + 0.3 tritón x - 100 + 1% de suero normal de conejo) por un tiempo de 24 h a temperatura ambiente.

Ac primario (1:500) 24 h ___

- Recuperar el Ac primario al contenedor original y mantenerlo a 4°C.

Día 2

En el día 2 del procedimiento para la inmunohistoquímica de GFAP se lavarán las secciones en PBS 1x frío 3x5 minutos. Posteriormente las secciones se incubarán en el Ac secundario (anti cabra hecho en burro [1:250]) disuelto en antisuero diluyente (PBS + 0.3 tritón x - 100 + 1 % de suero normal de conejo) durante 1 hora a temperatura ambiente.

PBS frío 3 x 5 min ___ ___ ___

Ac secundario 1 h ___

- Regresar el Ac 2° a su recipiente original y almacenar a 4° C.

Después de la incubación las secciones se lavarán en PBS 1x durante 3x5 minutos. Las secciones se incubarán en complejo ABC de conejo durante 1 h a temperatura ambiente. Es importante hacer la solución ABC 15-30 minutos antes de tiempo. Guardar en complejo ABC y mantenerlo a 4°C.

PBS 1x frío 3 x 5 min _____

Complejo ABC 1 h _____

PBS 1x frío 3 x 5 min _____

Las secciones se incubarán con 3-3'-diaminobenzidine (DAB) con intensificación de níquel por un tiempo de 2:30 min.

- Es importante usar guantes dobles al utilizar el DAB y colocar todo lo que tenga contacto con DAB en una solución de cloro al 10-15% hasta que se aclare.

DAB 2:30 min _____

Por ultimo las secciones serán lavadas en PBS 2x5 minutos, después serán montadas en las laminillas para su posterior conteo de células con la presencia de GFAP en las zonas cerebrales tomando como referencia el atlas.

PBS 1x frío 2 x 5 min _____

Agua destilada 5 min _____

Preparación de ABC: 1 gota A + 1 gota B en 2.5 ml de PBS 1x.

Preparación de DAB: 1 gota de buffer + 2 gotas de DAB + 1 gota de H₂O₂ en 2.5 ml de H₂O.

XIII.II Peso corporal después de la cirugía

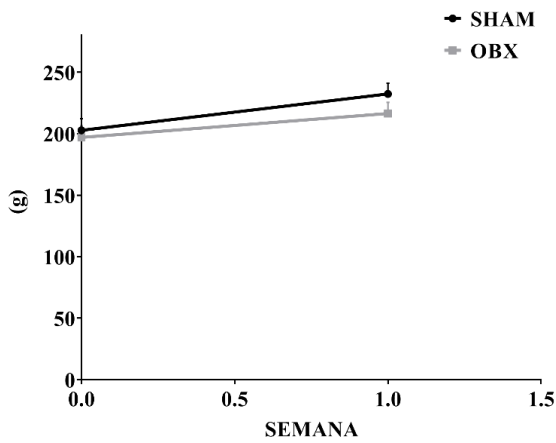


Figura 1. La OBX no causó trastornos del apetito 7 días después de realizar la cirugía. No se presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al peso corporal de la rata OBX en comparación con la rata Sham, según el ANOVA de dos vías [Tiempo $F(1, 36) = 7.194$, $p=0.0110$; Cirugía $F(1, 36) = 1.405$, $p=0.2436$; Interacción $F(1, 36) = 0.3044$, $p=0.5845$], $n=10$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

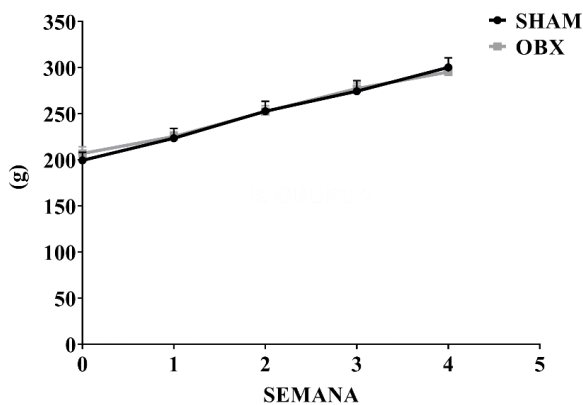


Figura 2. La OBX no causó trastornos del apetito en el transcurso del tiempo 28 días después de realizar la cirugía. No se presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al peso corporal de la rata OBX en comparación con la rata Sham, según el ANOVA de dos vías [Tiempo $F(1, 70) = 4.053$, $p=0.0479$; Cirugía $F(4, 70) = 47.48$, $p<0.0001$; Interacción $F(4, 70) = 0.1592$, $p=0.9582$], $n=9-10$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

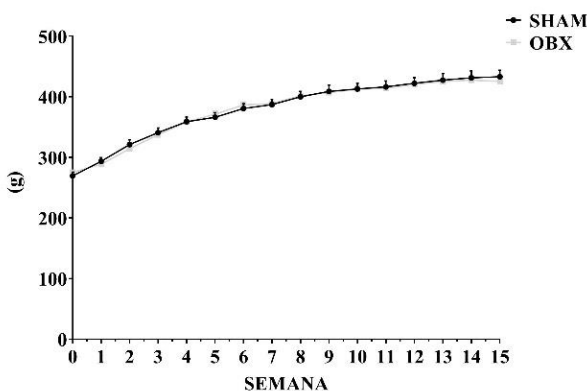


Figura 3. La OBX no causó trastornos del apetito en el transcurso del tiempo 105 días después de realizar la cirugía. No se presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al peso corporal de la rata OBX en comparación con la rata Sham, según el ANOVA de dos vías [Tiempo $F(1, 224) = 0.1643$, $P=0.6856$; Cirugía $F(15, 224) = 104.0$, $P<0.0001$; Interacción $F(15, 224) = 0.1805$, $P=0.9998$], $n=8$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

XIII.III Variables

Variable	Tipo de variable	Criterio de medida	Criterio metodológico	Criterio de control
Condición (OBX/Sham)	Cualitativa	Dicotómica	Independiente	Controlada
Edad	Cuantitativa	Discreta	Independiente	Controlada
Sexo	Cualitativa	Dicotómica	Independiente	Controlada
Peso	Cuantitativa	Continua	Independiente	Controlada
Alimentación	Cuantitativa	Continua	Independiente	Aleatoria
Cepa de la rata	Cualitativa	Politómica	Independiente	Controlada
Condiciones del bioterio	Cualitativa	Politómica	Independiente	Controlada
Número de astrocitos	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria
Longitud de las prolongaciones	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria
Arborización de las prolongaciones	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria
Orden de las prolongaciones	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria
Número de cuadros visitados en la PCA	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria
Número de acicalamientos en la PCA	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria
Número de erguidos en la PCA	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	Aleatoria

XIII.IV Resumen de resultados

A)		7 días post-OBX				
Análisis conductual		Análisis morfológico				
PCA	Conducta	Región	Longitud	Arborización	Orden	Número de astrocitos
Locomoción	[↑] p=0.0154	CA1	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Erguidos	Sin cambios	CA3	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Acicalamientos	Sin cambios	DG	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
		PFC	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	[↑] p=0.0197
		BLA	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Tabla 7 A) Resumen de cambios conductuales en la PCA y de astrocitos ocasionados por el modelo OBX. [↑]: aumento.

B)		28 días post-OBX				
Análisis conductual		Análisis morfológico				
PCA	Conducta	Región	Longitud	Arborización	Orden	Número de astrocitos
Locomoción	[↑] p=0.0051	CA1	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Erguidos	[↑] p= 0.0100	CA3	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Acicalamientos	Sin cambios	DG	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
		PFC	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	[↑] p=0.0197
		BLA	Sin cambios	Sin cambios	[*↓] p=0.0415	Sin cambios

Tabla 7 B) Resumen de cambios conductuales en la PCA y de astrocitos ocasionados por el modelo OBX. [↑]: aumento; [*↓] disminución en el tercer número de orden.

C)		105 días post-OBX				
Análisis conductual		Análisis morfológico				
PCA	Conducta	Región	Longitud	Arborización	Orden	Número de astrocitos
Locomoción	Sin cambios	CA1	[↑] p=0.0011	[↑]	[↑]	Sin cambios
Erguidos	Sin cambios	CA3	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Acicalamientos	Sin cambios	DG	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
		PFC	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	[↑] p=0.0197
		BLA	[↑] p=0.0006	[↑]	[↑]	Sin cambios

Tabla 7 C) Resumen de cambios conductuales en la PCA y de astrocitos ocasionados por el modelo OBX. [↑]: aumento.

XIV. PUBLICACIÓN

Arch Vet Sci Med 2021; 4 (2):24-33

DOI: 10.26502/avsm.022



Research Article

***Curcuma longa* Administration Significantly Reduces Acute and Persistent Inflammatory Pain Measures in Male and Female Rats**

Mario Alberto Bautista-Carro^{1,2}, Gonzalo Flores³, Tommaso Iannitti³, Gumaro Galindo-Paredes^{1,4}, Julio César Morales-Medina^{1*}

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, AP 62, CP90000, Tlaxcala, México

²Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma, Tlaxcala, México

³Lab. Neuropsiquiatría, Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur 6301, SanManuel, 72570, Puebla, México

⁴Doctorado en Ciencias, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, Ciudad de México, México

Corresponding Author: Julio César Morales-Medina, Km 10.5 carretera San Martin Texmelucan, Ixtacuixtla, Tlaxcala, Mexico

Received: 06 April 2021; **Accepted:** 14 April 2020; **Published:** 05 May 2021

Citation: Mario Alberto Bautista-Carro, Gonzalo Flores, Tommaso Iannitti, Gumaro Galindo-Paredes, Julio César Morales-Medina. *Curcuma longa* Administration Significantly Reduces Acute and Persistent Inflammatory Pain Measures in Male and Female Rats. *Archives of Veterinary Science and Medicine* 4 (2021): 24-33.

Abstract

Pain management is a worldwide public health concern particularly in women given its high prevalence and severity. Moreover, current pharmaceuticals induce numerous side effects including dependence and tolerance. Therefore, the search for novel therapeutic targets for the treatment

of various forms of pain is of foremost importance. In this regard, *Curcuma longa* (C. longa) or turmeric has shown anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Henceforth, in this work, we evaluate the potential anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of C. longa in two models

of peripheral inflammation in male and female rats. Rats were administered with the inflamogens carrageenan (acute inflammation inducer) and complete Freund's adjuvant (CFA) (persistent inflammation inducer) in the hindpaw to elicit mechanical allodynia and paw oedema. At the peak of mechanical allodynia, *C. longa* was administered orally and mechanical thresholds and paw size were monitored until the mechanical thresholds were back to baseline values. *C. longa* reduced mechanical allodynia in rats with acute or persistent inflammation-induced allodynia in male and female rats to a similar degree. This is the first study to employ a combination of pharmacodynamic models of acute and persistent inflammation to assess efficacy of *C. longa* on inflammatory pain behavior, also considering sex differences. We found that *C. longa* reverses inflammation-induced mechanical allodynia in male and female rats therefore showing promise as an effective anti-nociceptive agent. When using the carrageenan and CFA models, both male and female rats can be used without concerns related to sex bias.

Keywords

Allodynia; *Curcuma longa*; Sex differences; Inflammation; Pain; nociception; inflamogens

1. Introduction

Inflammation is known to induce swelling and pain [1]. While acute inflammation is protective, chronic is detrimental, displaying spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia [1]. Moreover, there is a major prevalence and intensity of pain in women compared to men [2]. In addition, current therapies for treatment of chronic pain are inadequate and

some can induce chronic pain, e.g. opioids [1] and chronic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can result in several adverse effects including damage to the gastrointestinal tract [3]. To bridge this gap and find novel therapeutic targets, we rely on animal models that mimic inflammatory processes and have translational value.

Administration of the inflamogens carrageenan or complete Freund's adjuvant (CFA) results in mechanical allodynia and swelling, therefore, extensively used to test prospective analgesic and anti-inflammatory compounds [4, 5]. For instance, CFA produces a long-lasting inflammatory response accompanied by mechanical allodynia lasting between 1 and 2 weeks with peak observed on day 3 post-administration [6]. Moreover, CFA increases the expression of prostaglandins as well as COX-2 in the spinal cord within hours [7]. Carrageenan induces acute inflammatory pain, which is established already at 1 hr and peaks at 4 hr post-carrageenan administration [5, 6].

At the site of injection, carrageenan increased the expression of prostaglandins, nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) [8, 9] and interleukin (IL)-1 β (IL-1 β) in serum [10]. Therefore, CFA and carrageenan are two well-established models to test potential anti-inflammatory and analgesic compounds.

Plants provide abundant secondary metabolites with possible physiological effects in humans [11, 12]. *Curcuma longa* (*C. longa*) or turmeric is a plant member of the Zingiberaceae, native to Asia [11, 12]. *C. longa* consistently displays anti-inflammatory and anti-oxidant properties [11-13]. In particular, *C. longa* reduced the expression of IL-6, TNF- α and interferon- γ (IFN- γ) in vitro [14],

molecules of the inflammatory soup, in vitro. Therefore, in the current study and, for the first time, we characterized the possible anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *C. longa* in two pharmacodynamic rat models of peripheral inflammation and pain in male and female rats.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and housing

Male (n=61) and female (n=62) Wistar rats 2-3 months of age from our local animal facility at the Centro de Investigacion en Reproduccion Animal (CINVESTAV, Mexico) were housed three to four per cage in a room maintained on a 12-hour light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. Three cohorts of rats were used for our experiments to test biological properties of *C. longa*. The first cohort was treated with carrageenan, the second cohort with CFA and a third cohort used for open field test (OFT) experiments.

All procedures complied with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, within the technical guidelines for the production, care and use of animals in the laboratory issued by SAGARPA Mexico (NOM-062 ZOO-1999) and ARRIVE guidelines for the use of animals [15]. All efforts were made to minimize animal suffering. If animals displayed signs of distress prior or during experimentation, they were immediately assessed by a veterinarian and, if necessary, euthanized.

2.2 Baseline mechanical threshold testing

In brief, rats were acclimated to a stainless steel grid within individual Plexiglas boxes (20 x 13 x 10 cm; three white opaque walls and one clear wall) for 60 min, and then tested for baseline (BL) mechanical thresholds with Von Frey monofilaments (Stoelting

Inc., IL, USA) [6, 16]. For each animal, the mid-plantar region of the left hind paw was stimulated with an incremental series of eight monofilaments of logarithmic stiffness. The 50% withdrawal threshold was determined using the up-down method of Dixon, modified by Chaplan et al.(1994) [17]. First, an intermediate Von Frey monofilament (number 4.31 exerting 2.0 g of force) was applied perpendicular to the plantar skin, causing a slight bending. If there was a positive response, consisting of a rapid withdrawal of the paw within 6 seconds, a smaller filament was applied. In contrast, a negative response within six seconds resulted in the use of a larger filament. After BL mechanical thresholds were evaluated, paw thickness was determined with a calliper according to the McCarson method [4]. Then, either CFA or carrageenan was injected.

2.3 Administration with complete freund's adjuvant

After BL mechanical threshold and paw thickness evaluation, an intradermal administration with CFA (Sigma, St. Louis, MO; 50 μ l) was administered to rats' ventral mid-plantar left hind paw [5, 6]. Mechanical responses, as previously described for BL mechanical threshold testing, and paw oedema were measured on the left hind paw 3 days post-injection.

2.4 Administration with Carrageenan

A 3% carrageenan solution was prepared by dissolving carrageenan (Sigma, C1867-5G) in saline, heating to 37°C and vortexing [5, 6]. The solution was stored at 4°C overnight. After BL measurements, rats received an intradermal injection of the carrageenan solution (3%; 50 μ l) into their ventral mid-plantar left hind paw. Mechanical responses and paw oedema were

measured on the left hind paw 4 hours post-injection.

2.5 OFT

To dissociate the impact of *C. longa* on antinociception from sedation, locomotor activity was measured using the OFT. The OFT assessed the total locomotion of the animals after treatment with *C. longa*. In brief, this test was carried out in a square arena (90*90*45 cm) with no top lid [5]. The arena was divided into 25 equal-size squares with 300 LUX of light intensity.

2.6 Administration of *C. Longa*

C. longa (Ayurveda, Valencia, Spain; batch number: 1016-100g) was administered in rats treated with CFA, carrageenan or undergoing OFT. In rats treated with CFA on day 3 and with carrageenan at 4h, *C. longa* (100 mg/kg) or vehicle (0.5% of gum tragacanth in 0.1M phosphate-buffer saline pH 7.4) were administered orally using a gavage after performing mechanical threshold testing, as previously described in Vidal et al. (2017) [13]. In brief, oral doses were administered by intragastric gavage at 0.5 mL/kg using a syringe connected to a gavage needle (16-gauge with a ball-shaped tip).

Paw oedema measurement and von Frey filament assessment were performed at 15, 30, 60, 90 and 120 minutes post-treatment. For OFT, rats were first habituated to the behavioral room for 60 min, then injected with either *C. longa* or vehicle, placed in the arena and recorded for a 60-min period. Total locomotion in the arena was evaluated by a subject blind to the testing condition. The arena was cleaned with ethanol prior and after each trial.

2.7 Statistical methods

The data was analysed using GraphPad Prism

(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Mechanical threshold, paw oedema, area under the curve (AUC) data and locomotor activity data were analysed using a two-way ANOVA followed by Sidak's *post-hoc* test. In all cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Carrageenan and CFA decreases mechanical thresholds and increases paw diameter in male and female rats

A significant effect of carrageenan on mechanical thresholds was observed at 4h post-treatment compared to BL (Figure 1A). A significant effect of carrageenan on paw size was observed at 4h post-treatment (Figure 1B). A reduction in mechanical thresholds at 3 days post-CFA treatment compared to BL was observed (Figure 1C). At 3 days post-CFA treatment paw size was also increased (Figure 1D). No differences between sexes were observed.

3.2 Curcuma does not modulate locomotor behaviour in rats

C. longa does not increase locomotion but there were a difference between sexes was observed with female rats displaying higher locomotion (Figure 2). *C. longa* increased the mechanical thresholds compared to vehicle in carrageenan-treated rats, as assessed by AUC analysis, (Figure 4A). No modifications in paw diameter were observed after *C. longa* treatment in carrageenan-treated rats (Figure 4B).

In CFA-treated rats, the AUC analysis revealed an effect of *C. longa* treatment (Figure 4C). No changes in paw diameter were observed after *C. longa* treatment (Figure 4D).

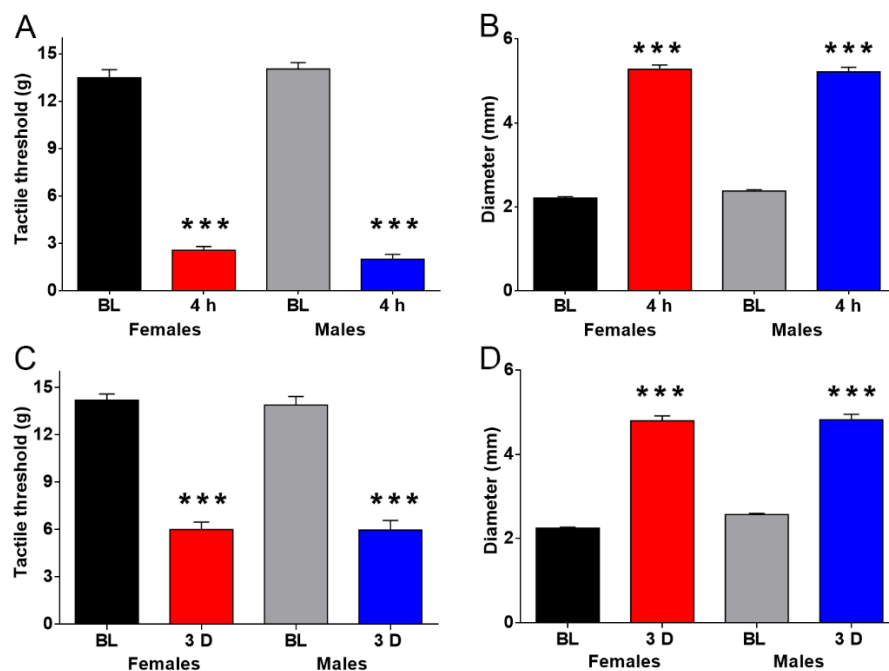


Figure 1: Inflammogen administration into the hindpaw induces mechanical allodynia and paw oedema. Carrageenan administration reduced the mechanical thresholds as assessed by two-way ANOVA [Treatment $F(1,86)=910.2$, $p<0.001$; Sex $F(1, 86)=0.001$, $p=0.9727$; Interaction $F(1, 86)=2.158$, $p=0.1454$] (A) and increased the paw size as assessed by two-way ANOVA [Treatment $F(1,86)=1407$, $p<0.001$; Sex $F(1, 86)=0.4501$, $p=0.5041$; Interaction $F(1, 86)=1.971$, $p=0.1639$] (B) in male and female rats. Complete Freund's adjuvant (CFA) administration resulted in mechanical allodynia [Treatment $F(1,88)=260.2$, $p<0.001$; Sex $F(1, 88)=0.1148$, $p=0.7355$; Interaction $F(1, 88)=0.0838$, $p=0.7729$] (C) and increased the paw size (D), as assessed by two-way ANOVA [Treatment $F(1, 88)=709.9$, $p<0.001$; Sex $F(1, 88)=3.860$, $p=0.0526$; Interaction $F(1, 88)=2.695$, $p=0.1042$] in male and female rats. The results are presented as mean \pm SEM, *** $p<0.001$, $n=22-24$ rats per group. BL, baseline; D, days; h, hours.

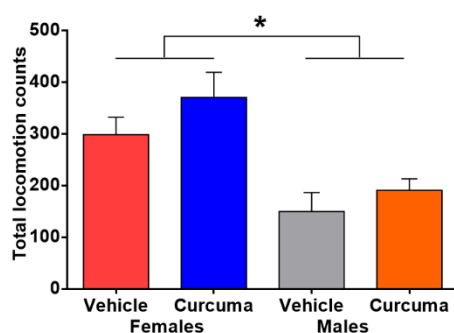


Figure 2: Effect of *C. longa* on spontaneous locomotor activity in rats. This figure shows the total locomotion in the arena for 60 min with a difference between sexes in locomotor behaviour [Treatment $F(1,28)=2.379$, $p=0.1342$; Sex $F(1,28)=20.13$, $p<0.001$; Interaction $F(1,28)=0.1809$, $p=0.6739$]. The results are presented as mean \pm SEM, $n=8$ rats for all groups.

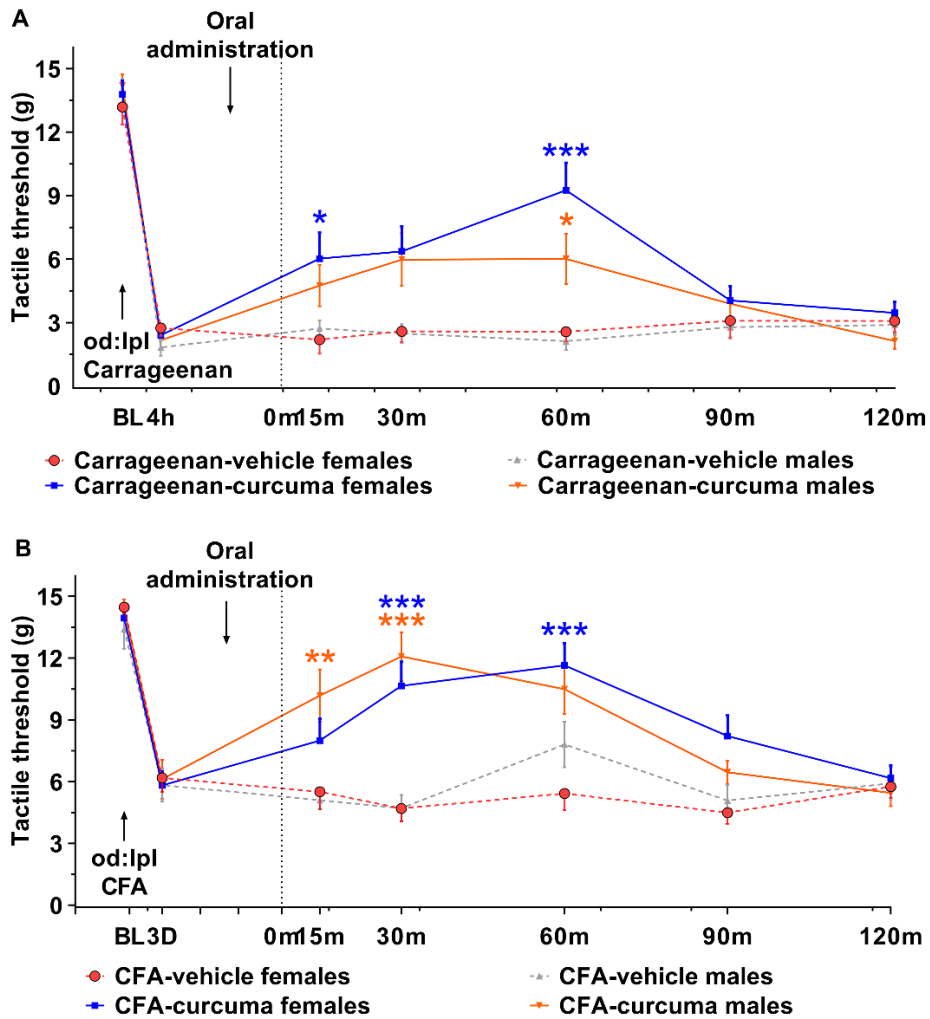


Figure 3: Time-course of the effect of *C. longa* post inflammogen administration on mechanical allodynia and paw oedema in rats. (A) shows mechanical response threshold at baseline (BL), at 4 h post-carrageenan administration and at 15, 30, 60, 90 and 190 min post *C longa* administration. A two-way ANOVA analysis showed a significant effects increasing the mechanical thresholds at 15 and 60 minutes post-carrageenan between *C. longa* and vehicle in females [Treatment $F(1,120)=32.34$, $p<0.001$; Time $F(5,120)=4.409$, $p<0.001$; Interaction $F(5,120)=5.939$, $p<0.001$] and males [Treatment $F(1,126)=16.34$, $p<0.001$; Time $F(5,126)=3.068$, $p<0.01$; Interaction $F(5,126)=3.15$, $p<0.01$] with significant difference between *C. longa* and vehicle at 60 minutes post-carrageenan. (B) depicts the mechanical response threshold at baseline (BL), at 4 h post- Complete Freund's adjuvant (CFA) administration and at 15, 30, 60, 90 and 190 min post *C longa* administration. A two-way ANOVA indicated an overall effect in females treated with CFA [Treatment $F(1,132)=40.64$, $p<0.001$; Time $F(5, 132)=3.036$, $p<0.01$; Interaction $F(5, 132)=5.427$, $p<0.001$] with significant difference between *C. longa* and vehicle at 15 and 60 minutes post-treatment and males [Treatment $F(1,120)=27.14$, $p<0.001$; Time $F(5, 120)=5.474$, $p<0.001$; Interaction $F(5, 120)=5.510$, $p<0.001$] with significant differences between *C. longa* and vehicle at 30 and 60 minutes post-treatment (B).

The results are presented as mean \pm SEM, $n=11-12$ rats per group. * $p<0.05$ compared to vehicle-treated female rats, *** $p<0.001$ compared to vehicle-treated female rats, * $p<0.05$ compared to vehicle-treated male rats, ** $p<0.01$ compared to vehicle-treated male rats, *** $p<0.001$ compared to vehicle-treated male rats. BL, baseline.

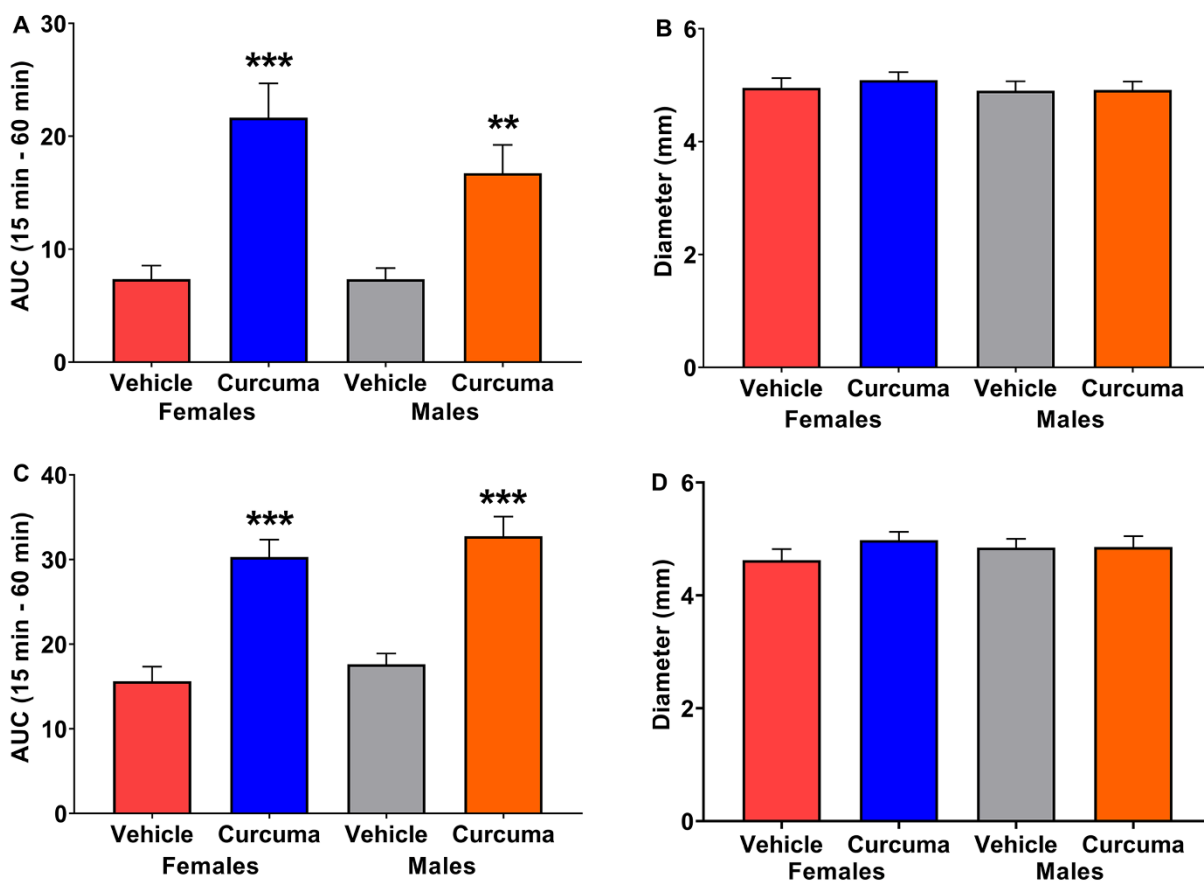


Figure 4: Area under the curve (AUC) of the effect of *C. longa* post inflamogen administration on mechanical allodynia and paw oedema in rats. (A) presents the AUC for the carrageenan model between 15 and 60 min post *C. longa* or vehicle administration as shown by two-way ANOVA [Treatment $F(1,41)=30.81$, $p<0.001$; Sex $F(1,41)=1.329$, Interaction $F(1,41)=1.315$, $p=0.2581$]. (B) shows the mean diameter of the left hindpaw 4 h post-carrageenan administration and 120 min post *C longa* administration. (C) shows the AUC for the Complete Freund’s adjuvant (CFA) model between 15 and 60 min post *C. longa* or vehicle administration as indicated by a two- way ANOVA [Treatment $F(1,42)=62.40$, $p<0.001$; Sex $F(1, 42)=1.385$, $p=0.2459$; Interaction $F(1. 42)=0.01509$, $p=0.9028$]. (D) shows the mean diameter of the left hindpaw 3 days post-CFA administration and 120 min post *C longa* administration. The results are presented as mean \pm SEM, $n=11-12$ rats per group ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

4. Discussion

As expected, administration of carrageenan or CFA induced oedema and mechanical allodynia ipsilateral to the site of injection. Moreover, this is the first study that evaluates the anti-nociceptive effects of *C. longa* in two models of peripheral inflammation and pain in male and female rats.

Administration of *C. longa* transiently reversed the inflammation-induced mechanical allodynia in both sexes in rats. First, we evaluated the effect of *C. longa*, administered at 100 mg/Kg in rats undergoing nociception and locomotor behavioural tests. Previously, Zhu et al. (2014) showed that curcumin dosed at 10-40 mg/Kg, did not affect spontaneous

locomotor activity. Similarly, the present study showed no changes in locomotor activity suggesting an analgesic rather than a sedative effect.

The present results show that *C. longa* displays anti-nociceptive effects on carrageenan- and CFA-induced mechanical allodynia in male and female rats. Previous studies have shown that curcumin, display anti-nociceptive properties in other models of pain. For example, in rats treated with CFA in the joint, curcumin reduced behavioural signs of pain [18]. Acute administration of curcumin also transiently reversed the mechanical allodynia in a male rat model of postoperative pain [19]. A limitation of both studies is they were carried out only in male rodents. The present study show an anti-nociceptive role of *C. longa* in male and female rats. Moreover,, co-administration of *C. longa* with *Allium hookeri* suppressed the expression of cytokines namely IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-13 and IL-17, known to regulate inflammation and pain [14]. Therefore, we hypothesize that *C. longa* induces anti-nociceptive effects by modulating the inflammatory soup.

Most of the studies using preclinical models of pain are usually only run in males although women present higher prevalence of pain [2, 20]. Oddly, no more than 10% of preclinical research is undertaken evaluating sex differences [20]. Preclinical studies show that female rodents have greater sensitivity to pain while male rodents are more sensitive to analgesic compounds [2]. In the present study, we observed that inflamogen induced mechanical allodynia generates a similar response in male and female rats, adding to previously published

literature. Moreover, *C. longa* presented similar anti-nociceptive effects in male and female rats in both the models assayed. In contrast, there is cumulative evidence of pharmaceutical compounds displaying greater benefits in male rats [2]. Our group recently showed that cerebrolysin, a multimodal neuropeptide preparation, was more effective in female rats treated with CFA or carrageenan, suggesting that these models of inflammation-induced pain can be used to determine sex differences [6]. These models will be useful given the need for further research to assess sex differences in the mode of action of biopharmaceutical preparations.

The results presented in this study are novel as we are the first to demonstrate analgesic properties of *C. longa* in two models of inflammatory pain and, importantly, the first to show such analgesic properties in both sexes in rats, which will permit further studies to be conducted in either sex, without concerns of bias. These findings extend our knowledge of the effect of *C. longa* on pain and inflammation, signalling the need for further clinical studies to confirm translational relevance.

Conflict-of-Interest Statement

The authors have no known conflicts of interest in regards to the materials discussed in this manuscript.

Acknowledgments

JCMM and GF recognize the National Research System of Mexico (CONACyT) for membership. MABC and GGP thanks CONACyT for scholarships (No. 775675 and 2019-000037-02NACF) respectively. This work was funded by CINVESTAV.

References

1. Ji RJ, Nackley A, Huh Y, et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology* 129 (2018): 343-366.
2. Mogil JS. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nature reviews. Neuroscience* (2020).
3. Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 24 (2010): 121-132.
4. McCarson KE. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Current protocols in pharmacology* 70 (2015): 541-549.
5. Iannitti T, Di Cerbo A, Loschi A, et al. Repeated administration of a flavonoid-based formulated extract from citrus peels significantly reduces peripheral inflammation-induced pain in the rat. *Food Sci Nutr.*, In press (2020).
6. Morales-Medina JC, Flores G, Vallelunga A, et al. Cerebrolysin improves peripheral inflammatory pain: Sex differences in two models of acute and chronic mechanical hypersensitivity. *Drug Dev Res* (2019): 513-518.
7. Fang JF, Liang Y, Du JY, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation attenuates CFA-induced hyperalgesia and inhibits spinal ERK1/2-COX-2 pathway activation in rats. *BMC Complement Altern Med* 13 (2013): 134.
8. Vinegar R, Schreiber W, et al. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 166 (1969): 96-103.
9. Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, et al. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *European journal of pharmacology* 211 (1992): 177-182.
10. Huber JD, Campos CR, Mark KS, et al. Alterations in blood-brain barrier ICAM-1 expression and brain microglial activation after lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (2006): H732-H740.
11. Flores G. Curcuma longa L. extract improves the cortical neural connectivity during the aging process. *Neural regeneration research* 12 (2017): 875-880.
12. Sun J, Chen F, Braun C, et al. Role of curcumin in the management of pathological pain. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 48 (2018): 129-140.
13. Vidal B, Vazquez-Roque RA, Gnecco D, et al. Curcuma treatment prevents cognitive deficit and alteration of neuronal morphology in the limbic system of aging rats. *Synapse* 71 (2017).
14. Lee SY, Cho SS, Li Y, et al. Anti-inflammatory Effect of Curcuma longa and Allium hookeri Co-treatment via NF-kappaB and COX-2 Pathways. *Scientific reports* 10 (2020): 5718.
15. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS biology* 8 (2010): e1000412.
16. Morales-Medina JC, Rastogi A, Mintz E, et al. Increased immediate early gene activation in the basolateral amygdala following persistent peripheral inflammation. *Neuroreport*, In press (2020).
17. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods* 53 (1994): 55-63.
18. Arora R, Kuhad A, Kaur IP, et al. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats. *European journal of pain* 19 (2015): 940-952.
19. Zhu Q, Sun Y, Yun X, et al. Antinociceptive effects of curcumin in a rat model of postoperative pain. *Scientific reports* 4 (2014): 4932.
20. Mogil JS. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature reviews. Neuroscience* 13 (2012): 859-8

XIV.I Resúmenes y carteles

XIV.I.I Congresos internacionales y nacionales 2020

A) Federation of European Neuroscience Societies

#5728 Acute Curcuma longa administration reduces inflammation-induced mechanical allodynia in male and female rat

Julio César Morales-Medina¹, Mario Alberto Bautista-Carro¹, Gumaro Galindo- Paredes¹, Tommaso Iannitti².

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. ²Charles River Discovery Research Services, Research Unit, Bristol, United Kingdom

D. Sensory and Motor Systems > D.8 Pain > D.8.f Pharmacological and non-pharmacological analgesia

Abstract Submission

Abstract Body

Background: Pain management is a worldwide public health concern particularly in women given their high prevalence and severity. Moreover, current pharmaceuticals induce numerous side effects including dependence and tolerance. Therefore, the search for novel therapeutic targets for the treatment of various forms of pain are of foremost importance. In this regard, Curcuma longa (C. longa) have shown anti-inflammatory and immunomodulatory effects. *Aims:* This study examined the anti-nociceptive and anti-edema effects of C. longa in two well-known rat models of peripheral inflammation in male and female rats. *Methods:* Such models are based on the administration of the inflamogens carrageenan, with maximum effect at 4 hours post-injection, and complete Freund's adjuvant (CFA), with maximum effect at three days post-injection into the hind paw. *Results:* C. longa treatment reduced the inflammation-induced mechanical allodynia carrageenan and CFA administered rats. The antinociceptive effect of C. longa was observed in a similar degree in male and female rats. There were no effects of C. longa in reducing the paw edema. *Conclusion:* Henceforth, C. longa reversed the inflammation-induced mechanical allodynia in the rat and place C. longa as an effective antinociceptive agent.

B) 8º Congreso Nacional de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ)

Evaluación del posible efecto analgésico y antiinflamatorio de *Curcuma longa* en dos modelos de inflamación periférica en la rata Wistar

Mario Alberto Bautista Carro^{1,2}, Julio César Morales Medina² y Gumaro Galindo Paredes²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UATx

carrobautista@gmail.com

Trabajo de Investigación

Palabras clave: *Curcuma longa*, alodinia, inflamación, analgesia, carragenina y adyuvante completo de Freund.

Introducción

El dolor es la manifestación clínica más frecuente, con mayor prevalencia e intensidad en mujeres que hombres¹. Sin embargo, los analgésicos y antiinflamatorios actuales presentan diferencias de género en su respuesta, así como efectos secundarios negativos². Por estas razones, se buscan opciones alternativas como *Curcuma longa* (*C. longa*) que ha demostrado poseer propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras³. Por lo que, en el presente estudio se investigaron los efectos analgésicos y antiinflamatorios de *C. longa* en los modelos de inflamación periférica de carragenina y el adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas hembra y macho.

Objetivos

- Analizar el efecto de *C. longa* sobre la alodinia mecánica e inflamación inducida por agentes inflamatorios y pro-nociceptivos durante un periodo corto y prolongado en ratas hembra y macho.
- Comparar el efecto analgésico de *C. longa* con respecto al sexo.
- Comparar el efecto antiinflamatorio de *C. longa* con respecto al sexo.
- Evaluar efectos sedantes de *C. longa*.

Metodología

Se utilizaron ratas macho y hembra de la cepa Wistar, a las cuales se les administró carragenina y el CFA por vía intradérmica en la extremidad trasera izquierda⁴, para evaluar el efecto analgésico y antiinflamatorio de *C. longa* que fue administrada por vía oral⁵. Además, se evaluaron posibles efectos sedantes de *C. longa* mediante la prueba de campo abierto⁶.

Resultados y discusión

La alodinia mecánica ocasionada por carragenina y el CFA se redujo después de la

administración de *C. longa* en ambos sexos, sin embargo, las ratas hembra mostraron un mayor efecto a los 60 minutos en comparación con los machos. De forma semejante, la administración de curcumina (un metabolito activo de *C. longa*) tuvo efectos anti-hiperalgésicos en un modelo de dolor post-operatorio en ratas macho⁶. Por otro lado, en nuestro estudio *C. longa* no mostro efectos sedantes en ambos sexos. De igual manera, han reportado que la curcumina no muestra efectos sedantes en ratas macho⁶, lo que sugiere un efecto analgésico. Hasta este momento, nuestro estudio es el primero que evalúa los efectos de *C. longa* en estos dos modelos de inflamación y dolor periféricos, así como las consecuencias analgésicas y sedantes en la rata hembra.

Conclusión

El presente estudio demuestra que la administración única de *C. longa* podría ser útil para el tratamiento del dolor inflamatorio.

Referencias

1. Mogil, J. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012, 13, 859–866.
2. Bartley, E.; Fillingim, R. B. *Br. J. Anaesth.* 2013, 111, 52–58.
3. Sun, J.; et al. *Phytomed.* 2018, 48, 129–140.
4. Morales-Medina; et al. *Drug Dev. Res.* 2019, 80, 513–518.
5. Vidal, B.; et al. *Synapse.* 2017, 71, e21952.
6. Zhu, Q.; et al. *Sci. Rep.* 2015, 4, 4932.

C) XXV Curso Internacional de Bases Biológicas de la Conducta, UATx

Evaluación del posible efecto analgésico y antiinflamatorio de *Curcuma longa* en dos modelos de inflamación periférica en la rata Wistar

Mario Alberto Bautista Carro^{1,2}, Julio César Morales Medina² y Gumaro Galindo Paredes²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV, UATx

carrobautista@gmail.com

El dolor es caracterizado por ser la manifestación clínica más frecuente, con mayor prevalencia e intensidad en mujeres que hombres. Sin embargo, los analgésicos y antiinflamatorios actuales presentan diferencias de género en su respuesta, así como numerosos efectos secundarios negativos. Por estas razones, se buscan alternativas como *Curcuma longa* (*C. longa*) que ha demostrado poseer un amplio espectro de propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Por lo que, en el presente estudio se investigaron los efectos analgésicos y antiinflamatorios de *C. longa* en los modelos de inflamación periférica de carragenina y el adyuvante completo de Freund, durante un periodo corto y prolongado respectivamente, en rata hembra y macho de la cepa Wistar. Como resultado, el tratamiento agudo con *C. longa* redujo significativamente la alodinia mecánica ocasionada por ambos modelos de inflamación periférica y en ambos sexos. Por lo que, concluimos que *C. longa* podría ser útil para el tratamiento del dolor inflamatorio.

1. Introducción

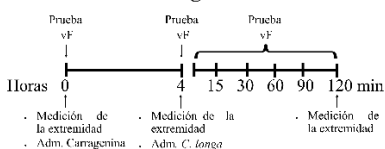
El dolor es caracterizado por ser la manifestación clínica más frecuente, con mayor prevalencia e intensidad en mujeres que hombres¹. Sin embargo, los analgésicos y antiinflamatorios actuales presentan diferencias de género en su respuesta, así como numerosos efectos secundarios negativos². Por estas razones, se buscan opciones alternativas como *Curcuma longa* (*C. longa*) que ha demostrado poseer un amplio espectro de propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras³. Por lo que, en el presente estudio se investigaron los efectos analgésicos y antiinflamatorios de *C. longa* en los modelos de inflamación periférica de carragenina y el Aduvante Completo de Freund (CFA) durante un periodo corto y prolongado respectivamente, en rata hembra y macho de la cepa Wistar. Como resultado, el tratamiento agudo con *C. longa* redujo significativamente la alodinia mecánica ocasionada por ambos modelos de inflamación periférica en ambos sexos.

2. Objetivos

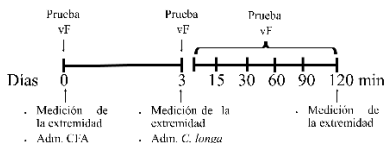
- Analizar el efecto de *C. longa* sobre la alodinia mecánica e inflamación inducida por agentes inflamatorios y pronociceptivos durante un periodo corto y prolongado en ratas hembra y macho.
- Comparar el efecto analgésico de *C. longa* con respecto al sexo.
- Comparar el efecto antiinflamatorio de *C. longa* con respecto al sexo.
- Evaluar efectos sedantes de *C. longa*.

3. Diseño experimental

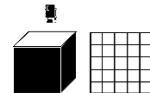
3.1 Modelo de carragenina



3.2 Modelo del CFA



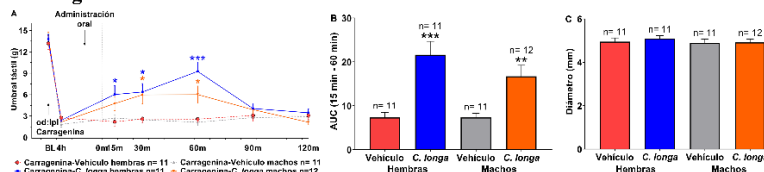
3.3 Prueba de campo abierto (PCA)



Caja de madera negro brillante sin tapa (90 x 90 x 90cm), con iluminación a 300 lux.

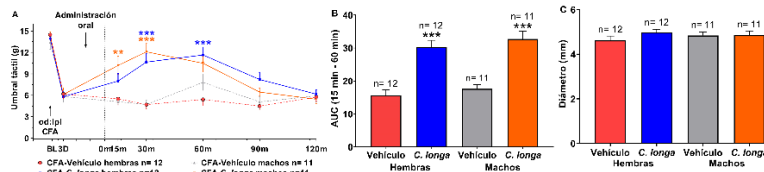
4. Resultados

4.1 *C. longa* redujo la alodinia mecánica pero no la inflamación ocasionada por carragenina



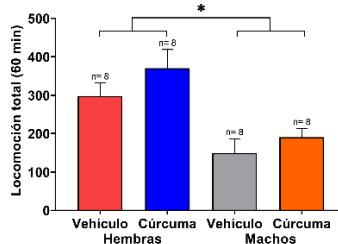
Umbral de respuesta mecánica del valor basal (BL) y 4 horas después de la administración de carragenina, luego a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después del tratamiento con *C. longa* con efectos significativos entre 15 y 60 minutos (Fig. A). Los resultados fueron confirmados por el análisis del área bajo la curva (AUC) con el tratamiento como el principal contribuyente, sin diferencias de sexo (Fig. B). Sin embargo, no se observaron modificaciones en el edema de la extremidad después del tratamiento con *C. longa* (Fig. C). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

4.2 *C. longa* redujo la alodinia mecánica pero no la inflamación ocasionada por el CFA



Umbral de respuesta mecánica del valor BL y 3 días (3D) después de la administración del CFA, luego a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después del tratamiento con *C. longa* con efectos significativos entre 15 y 60 minutos (Fig. A). Los resultados fueron confirmados por el análisis del AUC con el tratamiento como el principal contribuyente, sin diferencias de sexo (Fig. B). Sin embargo, no se observaron modificaciones en el edema de la extremidad después del tratamiento con *C. longa* (Fig. C). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

4.3 *C. longa* no alteró la conducta locomotora en la PCA



El análisis indicó una diferencia entre sexos, sin un efecto de *C. longa* en la actividad locomotora, lo que sugiere un efecto analgésico en lugar de sedante.

5. Conclusión

El presente estudio demuestra que la administración única de *C. longa* podría ser útil para el tratamiento del dolor inflamatorio.

6. Referencias

- Mogil JS. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012 Dec 20;13(12):859-66.
- Bartley EJ, Fillingim RB. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British Journal of Anaesthesia*. 2013 Jul;111(1):52-8.
- Sun J, Chen F, Braun C, Zhou Y-Q, Rittner H, Tian Y-K, et al. Role of curcumin in the management of pathological pain. *Phytomedicine*. 2018 Sep 15;48:129-40.

XIV.I.II Congresos internacionales y nacionales 2021

A) XIII Jornadas de Ciencias Químicas, UAZ

La bulbectomía olfatoria induce hiper-respuesta a la novedad en la rata macho Wistar:

Análisis temporal conductual

Mario Alberto Bautista Carro^{1,2} y Julio César Morales Medina²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UATx

carrobautista@gmail.com

Trabajo de Investigación

Palabras clave: depresión, modelo animal, bulbectomía olfatoria, campo abierto.

Introducción

La depresión es un trastorno mental emocional, que afecta a todas las edades y clases sociales, por lo cual, es la principal causa mundial de discapacidad laboral y social (WHO, 2018). Además, existe un vínculo establecido entre el suicidio y la depresión (WHO, 2018), lo que agrega mayor peso a este problema de salud mundial. La bulbectomía olfatoria bilateral (OBX) es un modelo animal de depresión con validez predictiva, aparente y de constructo (Willner & Mitchell, 2002). Además, la OBX induce cambios de comportamientos característicos de conductas tipo depresivas. Un cambio ampliamente aceptado es un aumento de la conducta motora 27 días después de la cirugía (Morales-Medina et al., 2013), utilizando la prueba de campo abierto (PCA). Dentro de la PCA se registra la locomoción, siendo el número de los cuadrantes recorridos en los que está dividido el campo, en este caso, proporciona una buena medida de la codificación a un entorno nuevo (Prut & Belzung, 2003). Otros parámetros evaluados dentro de la PCA son, la frecuencia de erguidos y acicalamientos del roedor, en este caso, un aumento puede interpretarse como una predisposición a conductas ansiogénicas, es decir, aquellos comportamientos que son repetitivos, invariables y aparentemente sin propósito. (Prut & Belzung, 2003). El aumento de la conducta motora en la rata con OBX se asocia con déficits en el hipocampo una región del cerebro involucrada en la codificación de la novedad de lugares u objetos (Kaplan et al., 2014). Ya que, la OBX a los 28 días postcirugía induce atrofia dendrítica y disminución de la proliferación celular en neuronas del hipocampo (Morales-Medina et al., 2013). Esta área neuroanatómica también parece ser disfuncional en pacientes con depresión mayor (Song & Leonard, 2005). Por lo que, este estudio se propuso investigar las alteraciones motoras ocasionadas por la OBX a los 7 y 28 días de recuperación postcirugía en grupos independientes, ya que, nos puede indicar una reorganización neuronal desde una perspectiva temporal.

Objetivos

General

Evaluar el efecto de la OBX en la conducta motora con respecto al curso del tiempo.

Específicos

Después de 7 y 28 días de realizar la OBX o cirugía Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Medir el comportamiento exploratorio.
- Cuantificar el número de acicalamientos y postura erguida.
- Comparar el comportamiento exploratorio, el número de acicalamientos y posturas erguidas.

Metodología

Se utilizaron 32 ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de edad. Se formaron 2 grupos de 2 subgrupos cada uno: subgrupo 1: ratas con OBX y subgrupo 2: ratas Sham. El primer grupo contó con 7 días de recuperación postcirugía y el segundo grupo 28 días, a continuación, se llevó a cabo la PCA.

Cirugía de la OBX

Se anestesiaron con una mezcla ketamina/xilazina administrada por vía intraperitoneal, posteriormente, se afeitó la cabeza y se realizó asepsia, luego se hizo una incisión sagital en la línea media del cráneo desde la frente hasta el dorso de la nariz; después, se perforaron dos orificios de 2 mm, ubicándose a 8 mm anterior a bregma y 2 mm de la línea media del hueso frontal, entonces, los OB fueron removidos por una cánula unida a una bomba de agua destilada; las ratas Sham fueron operadas de manera similar, sin remover los BO; luego, se llenaron los orificios con esponja hemostática, se suturó y se realizó asepsia (Kelly et al., 1997; van Riezen & Leonard, 1990).

PCA

Esta prueba se realizó en una arena cuadrada negra brillante (90x90x90 cm) sin tapa superior, en un campo dividido en 25 cuadrados de igual tamaño, con 300-400 LUX de iluminación. Después de 1 hora de habituación se colocó a la rata en el centro del campo y se le permitió explorar durante 5 minutos, (Morales-Medina et al., 2012). La exploración fue videograbada y a continuación, se evaluó la conducta locomotora, frecuencia de acicalamientos y erguidos.

Resultados y discusión

Las investigaciones sobre los cambios conductuales ocasionados por la OBX en la PCA a corto tiempo son escasos. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que después de 7 días existe un aumento de la actividad locomotora en las ratas con OBX, además, no se mostró alterado el número de erguidos y acicalamientos. De forma semejante (Vinkers et al., 2009) reportó que ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con OBX presentaron una hiperactividad en su “home

“cage” 3 días después de la cirugía. Estas alteraciones motoras recientes a la cirugía sugieren un déficit temprano para adaptarse a un ambiente.

De igual forma, nuestros resultados revelaron que 28 días después de la cirugía OBX aumenta la actividad locomotora, así como la postura erguida pero no el número de acicalamientos. Similar a la literatura previamente reportada, donde el modelo de la OBX conduce a un aumento de la conducta motora en la PCA 14 días (Burke et al., 2013), 27 días (Morales-Medina et al., 2013) y 29 días (Mar, 2002) después de la cirugía en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Además, Morales-Medina et al., (2013) reportó un aumento en la frecuencia de postura erguida 27 días después de la cirugía. Por lo que estas alteraciones conductuales indican una mayor desregulación respecto al transcurso del tiempo.

Por otro lado, el peso corporal después de 7 y 28 días de recuperación de la cirugía OBX o Sham, las ratas no mostraron diferencias significativas, por lo que indica que la lesión no causa trastornos del apetito.

Conclusiones

El presente estudio muestra que la rata con OBX Wistar macho mantiene un aumento en la conducta motora desde los 7 hasta los 28 días postcirugía interpretado como una falta de adaptación a entornos nuevos. Sin embargo, la postura erguida se nota alterada hasta los 28 días de recuperación, interpretada como un aumento a conductas ansiogénicas. En conjunto estos resultados temporales pueden indicar una reorganización neuronal progresiva con respecto al curso del tiempo.

Referencias

1. Burke N; et al. *Genes. Brain. Behav.* 2013, 12(7), 705–713.
2. Kelly J. P., Wrynn A., & Leonard B. *Pharmacol. Ther.* 1997, 74(3), 299–316.
3. Mar, A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002, 73(3), 703–712.
4. Morales-Medina J. C., et al, *Neuropep.* 2012, 46(6), 329–334.
5. Morales-Medina J. C.; et al. *Neuro*, 2013. 236, 233–243.
6. Prut L., & Belzung, C. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, 463(1–3), 3–33.
7. Song C., & Leonard B. E. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005, 627-647.
8. van Riesen H., & Leonard B. E. *Pharmacol. Ther.* 1990, 47(1), 21–34.
9. Vinkers C. H., et al. *Neuro*. 2009, 159(1), 39–46.
10. WHO. *World Health Organization*. 2018.
11. Willner P.; Mitchell P.J. *Behav. Pharmacol*, 2002. 13(3), 169–188.

1. Introducción

La depresión es un trastorno del estado anímico, que reduce la calidad de vida durante algunas semanas o más tiempo. El modelo de la bulbectomía olfatoria (OBX) a los 28 días postcirugía induce atrofia dendrítica en el hipocampo¹, siendo una región involucrada en la codificación de la novedad y almacenamiento de recuerdos. Esta área neuroanatómica también parece ser disfuncional en pacientes con depresión mayor².

La prueba de campo abierto (PCA) es utilizada para investigar el comportamiento exploratorio (conducta horizontal) y relacionado con la ansiedad (conductas verticales). Por lo que, se realizó la PCA a los 7 y 28 días postcirugía para evaluar la trayectoria del comportamiento en la rata con OBX. Los resultados indican un aumento en la conducta horizontal y una desregulación con respecto al curso del tiempo en la conducta vertical.

2. Objetivos

2.1 General

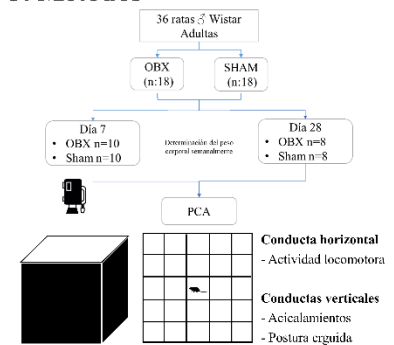
Evaluar el efecto de la OBX en la conducta motora con respecto al curso del tiempo.

2.2 Específicos

Después de 7 y 28 días de realizar la OBX o cirugía Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Medir el comportamiento exploratorio.
- Cuantificar el número de acicalamientos y postura erguida.

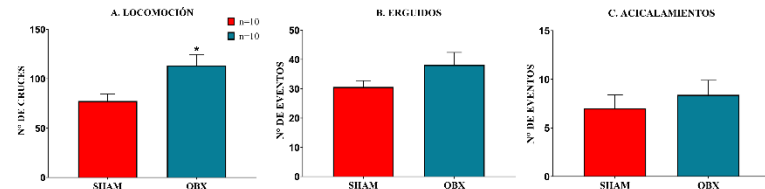
3. Métodos



Caja de madera negra brillante sin tapú (90 x 90 cm), con iluminación a 300-400 lux.

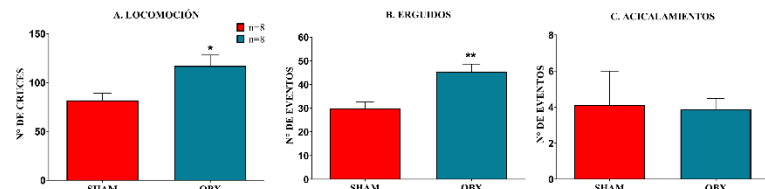
4. Resultados

4.1 Actividad horizontal y vertical 7 días postcirugía OBX utilizando la PCA



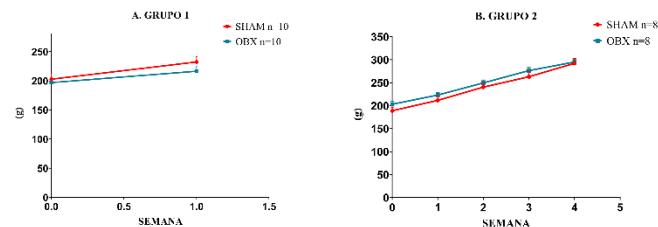
La rata OBX Wistar macho presentó un aumento de locomoción (conducta horizontal) con respecto a su control (A) $p=0.01$, no así en el número de erguidos ni acicalamientos (B y C) (conductas verticales).

4.2 Actividad horizontal y vertical 28 días postcirugía OBX utilizando la PCA



La rata OBX Wistar macho presentó un aumento de locomoción (conducta horizontal) (A) $p=0.01$, así como en la postura erguida (conducta vertical) (B) $p=0.002$ con respecto a su control, no así en el número de acicalamientos (C).

4.3 Peso corporal después de la cirugía OBX y SHAM



No presentaron diferencias significativas el grupo con 7 días de recuperación postcirugía (A) y el grupo con 28 días de recuperación postcirugía (B).

5. Conclusiones

El presente estudio muestra que la rata con OBX Wistar macho mantiene un aumento en la conducta horizontal desde los 7 hasta los 28 días postcirugía interpretado como una falta de adaptación a entornos nuevos. Sin embargo, la postura erguida se nota alterada hasta los 28 días de recuperación, interpretada como un aumento a conductas ansiogénicas de acuerdo con el curso del tiempo. Por otro lado, la OBX no causa trastornos del apetito.

6. Referencias

1. Morales-Medina JC, Juarez I, Venancio-García E, Cabrera SN, Menard C, Yu W, et al. Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience*. 2013 Apr;236:233-43.
2. Song C, Leonard BH. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005 Jan;29(4-5):627-47.

B) 49th Meeting of the European Brain and Behaviour Society

Olfactory bulbectomy induces hyperlocomotion and mechanical allodynia associated with astrogliosis in the rat

Julio César Morales-Medina¹, Gumaro Galindo- Paredes¹, Mario Alberto Bautista-Carro¹

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

²Maestría en Ciencias Biológicas, UATx, CP 90070, Tlaxcala, México



CINVESTAV
Prof. Julio César Morales Medina
Autopista San Martín Texmelucan. Tlaxcala Km. 10,5
90120 Tlaxcala
Mexico

Participant ID: 819
Dear Prof. Julio César Morales Medina,

Thank you for submitting an abstract for the **49th Meeting of the European Brain and Behaviour Society 2021**. Today we would like to give you important information regarding your Poster Presentation.

For the Poster Exhibition please bring your **printed poster** with the following poster measurements to the conference center in Lausanne:

120cm wide x 180cm high – portrait format

Please include all co-authors to the poster.

Title	Olfactory bulbectomy induces hyperlocomotion and mechanical allodynia associated with astrogliosis in the rat
Session Details	Poster Session Part IV: Stress & Anxiety / Social Behaviour Wednesday, Sep 8, 2021 4:40 PM - 5:30 PM
Presenting Author	Prof. Julio César Morales-Medina
Co-authors	Gumaro Galindo-Paredes and Bautista-Carro Mario Alberto

If you have any questions, please do not hesitate to contact us.

Best regards,

Your EBBS-Team at INTERPLAN

INTERPLAN
Congress, Meeting & Event Management AG
Phone: +49 (0)89 54 82 34 - 820
Email: ebbs@interplan.de

C) 9º Congreso Nacional de Ciencias Químico-Biológicas, UAZ

Efecto temporal de la bulbectomía olfatoria en respuesta a la novedad en la rata Wistar macho

Mario Alberto Bautista Carro^{1,2}, Julio César Morales Medina²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV, UATx

carrobautista@gmail.com

Trabajo de Investigación

Palabras clave: depresión, modelo animal, bulbectomía olfatoria, campo abierto.

Introducción

La depresión mayor (DM) es un trastorno mental emocional, altamente debilitante (1). Los pacientes más avanzados con DM presentan una reducción del volumen del hipocampo (2). La bulbectomía olfatoria (OBX) es un modelo animal de depresión bien validado (3). Un cambio conductual del modelo OBX ampliamente aceptado es un aumento de la conducta motora 27 días postcirugía (4), utilizando la prueba de campo abierto (PCA). Este comportamiento se ha interpretado como una falta de adaptación a un entorno novedoso (5), y ha sido asociado con alteraciones en el hipocampo, ya que, es una región del cerebro involucrada en la codificación de la novedad ambiental (6). Una hipótesis es, que las alteraciones conductuales parecen depender del tiempo o evolución de la enfermedad. Por lo que, este estudio se propuso investigar las alteraciones motoras ocasionadas por la OBX en periodos críticos postcirugía en grupos independientes.

Objetivos

General

Evaluar el efecto temporal de la OBX en la conducta motora y su asociación con el curso del tiempo.

Específicos

Después de 7, 28 y 105 días de realizar la cirugía OBX o Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Medir la locomoción
- Cuantificar los acicalamientos y erguidos

Metodología

Se utilizaron 52 ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de edad. Se formaron 3 grupos de 2 subgrupos cada uno: subgrupo 1: ratas con OBX y subgrupo 2: ratas Sham. El primer grupo

contó con 7 días de recuperación postcirugía, el segundo grupo 28 días y el tercer grupo 105 días. Posteriormente, se realizó la PCA, donde se evaluó la locomoción y el número de acicalamientos y erguidos.

Resultados y discusión

Nuestros resultados demuestran que 7 días postcirugía OBX existe un aumento de la actividad locomotora. De forma semejante, ratas macho Sprague-Dawley con OBX presentaron hiperactividad en su “home cage” 3 días postcirugía (7). De igual forma, nuestros resultados revelaron que 28 días postcirugía OBX aumenta la actividad locomotora, así como la postura erguida. Similar a la literatura previamente reportada, donde la OBX conduce a un aumento de la conducta locomotora en la PCA 14 días (8), 27 días (4) y 29 días (9) postcirugía en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Además, (4) reportó un aumento en la postura erguida. Por otro lado, nuestros resultados no revelaron conductas motoras alteradas 105 días postcirugía. De forma contrastante han reportado aumento de la actividad locomotora 70 días postcirugía, en ratas de la cepa Sprague-Dawley con OBX (10). Estas alteraciones motoras en la PCA durante un periodo agudo y subagudo sugieren un déficit para adaptarse a un ambiente nuevo. Sin embargo, las investigaciones sobre cambios conductuales en un periodo crónico son escasos y hasta donde sabemos, somos los primeros en reportar que la hiper-respuesta a la novedad ambiental se revierte 105 días postcirugía OBX.

Conclusiones

La rata Wistar macho con OBX presenta una hiper-respuesta a la novedad máxima en el día 28 y extinguida en los 105 días postcirugía.

Referencias

1. WHO. *World Health Organization*. **2018**.
2. Roddy, et al. *Biolog. Psychiat.* 2019, 85(6), 487–497.
3. Willner P., Mitchell P.J. *Behav. Pharmacol.* **2002**, 13(3), 169–188.
4. Morales-Medina J. C.; et al. *Neuro*, **2013**, 236, 233–243.
5. Kelly J. P., Wrynn A., & Leonard B. *Pharmacol. Ther.* **1997**, 74(3), 299–316.
6. Kaplan, R., et al. *Hippocam.* **2014**, 24(7), 740–750.
7. Vinkers C. H., et al. *Neuro*. **2009**, 159(1), 39–46.
8. Burke N., et al. *Genes. Brain. Behav.* **2013**, 12(7), 705–713.
9. Mar, A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, 73(3), 703–712.
10. Hendriksen, H., et al. *Neuropharm.* **2012**, 62(1), 270–277.

Efecto temporal de la bulbectomía olfatoria en respuesta a la novedad en la rata Wistar macho

MARIO ALBERTO BAUTISTA CARRO^{1,2} Y JULIO CÉSAR MORALES MEDINA²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV, UATx

1. Introducción

La depresión mayor (DM) es un trastorno mental emocional, altamente debilitante (1). Los pacientes más avanzados con DM presentan una reducción del volumen del hipocampo (2). La bulbectomía olfatoria (OBX) es un modelo animal de depresión bien validado (3). Un cambio conductual del modelo OBX ampliamente aceptado es un aumento de la conducta motora 27 días postcirugía (PCA), utilizando la prueba de campo abierto (PCA). Este comportamiento se ha interpretado como una falta de adaptación a un entorno novedoso (5), y ha sido asociado con alteraciones en el hipocampo, ya que, es una región del cerebro involucrada en la codificación de la novedad ambiental (6). Una hipótesis es, que las alteraciones conductuales parecen depender del tiempo o evolución de la enfermedad. Por lo que, este estudio se propuso investigar las alteraciones motoras ocasionadas por la OBX en periodos críticos postcirugía en grupos independientes.

2. Objetivos

2.1 General

Evaluar el efecto temporal de la OBX en la conducta motora y su asociación con el curso del tiempo.

2.2 Específicos

Después de 7, 28 y 105 días de realizar la cirugía OBX o Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Medir la locomoción
- Cuantificar los acicalamientos y erguidos

3. Métodos

- Grupo 1

Cirugía OBX o Sham PCA
Días 0 1 2 3 4 5 6 7

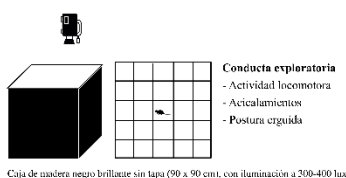
- Grupo 2

Cirugía OBX o Sham PCA
Días 0 7 14 21 28

- Grupo 3

Cirugía OBX o Sham PCA
Días 0 35 70 105

3.1 PCA



4. Resultados

4.1 Efecto de la OBX en la PCA a los 7 días postcirugía

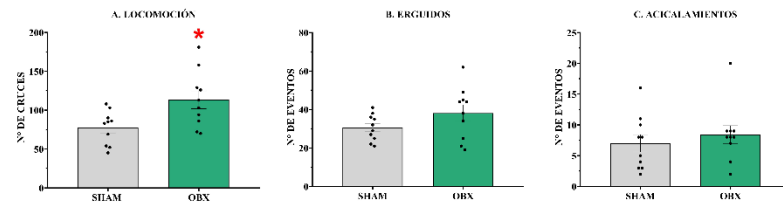


Figura 1. La OBX aumentó la actividad locomotora pero no el número de erguidos y acicalamientos. Fig., A) Se observó una diferencia estadística significativa $p=0.0154$. Fig., B) No se observó una diferencia estadística significativa $p=0.1361$. Fig., C) No se observó una diferencia estadística significativa $p=0.5023$. Según el análisis "t student" con diferencias entre las ratas OBX y Sham, $n=10$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

4.2 Efecto de la OBX en la PCA a los 28 días postcirugía

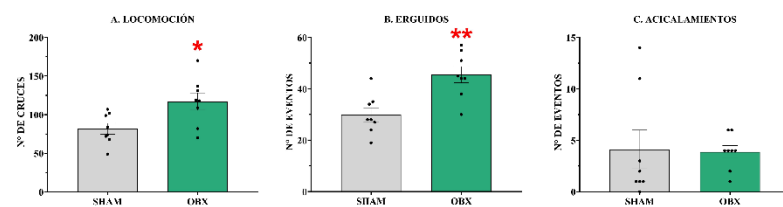


Figura 2. La OBX aumentó la actividad locomotora y el número de erguidos, pero no el número de acicalamientos. Fig., A) Se observó una diferencia estadística significativa $p=0.0182$. Fig., B) Se observó una diferencia estadística significativa $p=0.0021$. Fig., C) No se observó una diferencia estadística significativa $p=0.9009$. Según el análisis "t student" con diferencias entre las ratas OBX y Sham, $n=8$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

4.3 Efecto de la OBX en la PCA a los 105 días postcirugía

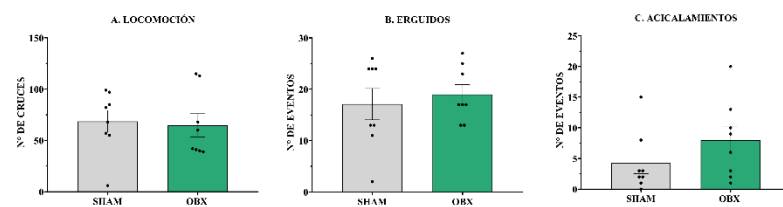


Figura 3. La OBX no alteró la actividad locomotora, el número de erguidos y acicalamientos. Fig., A) No se observó una diferencia estadística significativa $p=0.8077$. Fig., B) No se observó una diferencia estadística significativa $p=0.6094$. Fig., C) No se observó una diferencia estadística significativa $p=0.2116$. Según el análisis "t student" con diferencias entre las ratas OBX y Sham, $n=8$ ratas por grupo. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

5. Conclusión

La rata Wistar macho con OBX presenta una hiper-respuesta a la novedad máxima en el día 28 y extinguida en los 105 días postcirugía.

6. Referencias

- 1) World Health Organization (WHO). OMS | Depresión. WHO. 2018.
- 2) Roddy DW, Farrell C, Doolin K, Roman E, Tozzi L, Frodl T, et al. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biological Psychiatry*. 2019 Mar;85(6):487-97.
- 3) Willner P, Mitchell PJ. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology*. 2002 May;13(3):169-88.
- 4) Morales-Medina JC, Juárez L, Venancio-García E, Cabrera SN, Menard C, Yu W, et al. Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. *Neuroscience*. 2013 Apr;236:233-43.
- 5) Kelly JP, Wynn AS, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997 Jan;74(3):299-316.
- 6) Kaplan R, Homer AJ, Bandettini PA, Doeller CF, Burgess N. Human hippocampal processing of environmental novelty during spatial navigation. *Hippocampus*. 2014 Jul;24(7):740-50.

D) XXVI Curso Internacional de Bases Biológicas de la Conducta, UATx

La rata Wistar macho con bulbectomía olfatoria presenta hiper-respuesta a la novedad de forma temporal

Mario Alberto Bautista Carro^{1,2} y Julio César Morales Medina²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UATx

carrobautista@gmail.com

Palabras clave

Depresión, modelo animal, bulbectomía olfatoria, campo abierto.

La depresión mayor es un trastorno mental altamente debilitante y los pacientes más avanzados presentan una reducción del volumen del hipocampo. La bulbectomía olfatoria es un modelo animal de depresión bien validado y entre los cambios conductuales las ratas muestran una hiper-respuesta a la novedad ambiental asociada con alteraciones en el hipocampo, ya que, es una región involucrada en la codificación de la novedad. Sin embargo, las alteraciones conductuales parecen depender del tiempo o evolución de la enfermedad. Este estudio evaluó el efecto temporal de la bulbectomía olfatoria en la rata Wistar macho en respuesta a la novedad ambiental. Se utilizó la prueba de campo abierto, donde se analizó la locomoción, el número de acicalamientos y erguidos en grupos independientes. Los resultados demostraron que 7 días postcirugía aumentó la actividad locomotora; de igual forma, 28 días postcirugía aumentó la actividad locomotora, así como la postura erguida. En contraste, 105 días postcirugía no hubo conductas motoras alteradas. Estas alteraciones motoras durante periodos agudo y subagudo sugieren un déficit para adaptarse a un ambiente nuevo. Además, las investigaciones sobre cambios conductuales en periodos crónicos son escasos. Hasta donde se tiene conocimiento, el nuestro es el primer estudio en reportar que la hiper-respuesta a la novedad ambiental se revierte 105 días postcirugía. En conclusión, la rata Wistar macho con bulbectomía olfatoria presenta una hiper-respuesta a la novedad máxima en el día 28 y extinguida en los 105 días postcirugía.

Agradecimientos

Bautista Carro agradece a CONACyT por la beca con el número de apoyo: 775675.

A) XIV Jornadas de Ciencias Químicas, UAZ

La bulbectomía olfatoria induce temporalmente hiperactividad a la novedad ambiental y cambios astrocíticos en la corteza prefrontal

Mario Alberto Bautista Carro^{1,2} y Julio César Morales Medina²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UATx

carrobautista@gmail.com

Trabajo de Investigación

Palabras clave: depresión, bulbectomía olfatoria, campo abierto, astrocitos, corteza prefrontal

Introducción

La depresión mayor (DM) es un trastorno mental emocional, altamente debilitante (1). La etiología de la DM es heterogénea, ya que, varios factores, solos o en combinación, pueden predisponer al trastorno (2). Estudios *post mortem* de la corteza prefrontal (CPF) demuestran hipertrofia de astrocitos en adultos jóvenes comparado con adultos mayores, ambos diagnosticados con DM, evaluados con la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) (3). La CPF se ha asociado con funciones cognitivas y ejecutivas (4). La bulbectomía olfatoria (OBX) es un modelo animal de depresión bien validado (5). En este modelo, es ampliamente reportado un aumento de la locomoción 27 días postcirugía (6) utilizando la prueba de campo abierto (PCA). Este comportamiento se ha interpretado como una falta de adaptación a un entorno nuevo (7). Además, (6) reporta un aumento de erguidos en la PCA, este comportamiento representa exploración visual, auditiva, olfativa y somatosensorial (8;9). Una hipótesis es, que las alteraciones conductuales y astrocíticas parecen depender del tiempo o evolución de la enfermedad. Además, (3) sugiere que la patología de astrocitos podría ser un contribuyente temprano a la etiología de la DM. Por lo que, este estudio se propuso investigar los cambios conductuales en la PCA y astrocíticos de la CPF ocasionados por la OBX en periodos críticos postcirugía en grupos independientes.

Objetivos

General

Evaluar el efecto temporal de la OBX en la conducta motora y en los astrocitos.

Específicos

Después de 7, 28 y 105 días de realizar la cirugía OBX o Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Analizar el comportamiento locomotor y frecuencia de erguidos
- Cuantificar los astrocitos positivos a GFAP en la CPF
- Evaluar la morfología de los astrocitos en la CPF

Metodología

Se utilizaron 52 ratas macho Wistar de dos meses de edad. Se formaron 3 grupos de 2 subgrupos cada uno: subgrupo 1: ratas con OBX y subgrupo 2: ratas Sham. El primer grupo contó con 7 días, el segundo con 28 días y el tercero con 105 días de recuperación postcirugía. Posteriormente, se realizó la PCA e inmediatamente después se perfundió con paraformaldehído para fijar y obtener los cerebros. Finalmente se recolectaron cortes coronales de CPF, para biomarcar a los astrocitos con el anticuerpo GFAP.

Resultados y discusión

Demostramos que la rata Wistar macho con OBX aumenta la locomoción en el día 7 y hasta el día 28 postcirugía. Similar a la literatura previamente reportada, donde la OBX aumenta la locomoción en la PCA a los 14 días (10), 27 días (6) y 29 días (11). Estas alteraciones motoras sugieren un déficit para adaptarse a un ambiente nuevo. Además, en el día 28 postcirugía aumentó la frecuencia de erguidos en la PCA. De igual forma, (6) es el único en reportar un aumento de la frecuencia de erguidos 27 días postcirugía. Actualmente, somos los primeros en demostrar hiperlocomoción durante un periodo de 7 días post-OBX, así como en reportar que la hiper-respuesta a la novedad ambiental se revierte 105 días post-OBX. Por otro lado, al realizar el análisis morfológico y cuantificar los astrocitos positivos a GFAP en la CPF, las ratas de 7 y 28 días post-OBX tenían un mayor número de astrocitos sin alteraciones morfológicas. De forma semejante, (12) ha demostrado que las ratas Wistar con OBX exhiben aumentos del número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en la CPF 2 meses después de la cirugía. Nuestros resultados señalan que esta alteración conductual de la rata con OBX, no parece tener relación con la morfología astrocítica en la CPF.

Conclusiones

La OBX induce hiperactividad en un entorno nuevo después de 7 días y máxima en el día 28 postcirugía, simultáneamente, con un aumento de astrocitos en la CPF. Estos cambios son extinguidos a los 105 días postcirugía.

Referencias

1. WHO. World Health Organization. 2018.
2. Jesulola, E.; Micalos, P. & Baguley, I. B. *Brain Res.* 2018, 341, 79–90.
3. Miguel-Hidalgo, J; et al. *Biol. Psychiatry.* 2000, 48(8), 861–873.
4. Koenigs, M., & Grafman, J. *Brain Research.* 2009, 201(2), 239–243.
5. Willner P., Mitchell P.J. *Behav. Pharmacol.* 2002. 13(3), 169–188.
6. Morales-Medina J. C.; et al. *Neuro*, 2013. 236, 233–243.
7. Kelly J. P., Wrynn A., & Leonard B. *Pharmacol. Ther.* 1997, 74(3), 299–316.
8. Kozler, P; Maresova, D. & Pokorny, J. *Neuro Endocrinology Letters.* 2017, 38(7), 495–501.
9. Lever, C.; Burton, S. & O'Keefe, J. *Rev. Neurosciences.* 2006, 17(1–2), 111–133.
10. Burke N., et al. *Genes. Brain. Behav.* 2013, 12(7), 705–713.
11. Mar, A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002, 73(3), 703–712.
12. Cízková D; Raceková E. *Physiol Res.* 1997, 46(6), 487–495.

B) 10mo Congreso Nacional de Ciencias Químico-Biológicas, UAZ



Modelo de depresión genera hiperactividad temporal a la novedad ambiental y cambios astrocíticos en la corteza prefrontal

MARIO ALBERTO BAUTISTA-CARRO^{1,2} Y JULIO CÉSAR MORALES-MEDINA²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATX)

²Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV



1. Introducción

Estudios post mortem de la corteza prefrontal (CPF) de pacientes diagnosticados con depresión mayor (DM), demuestran hipertrofia de astrocitos en adultos jóvenes comparado con adultos mayores, evaluados con la proteína ácido fibrilar glial (GFAP)¹. Por lo que, se sugiere que la patología de astrocitos podría ser un contribuyente temprano a la etiología de la DM. La CPF se ha asociado con funciones cognitivas y ejecutivas². La bulbotomía olfatoria (OBX) es un modelo animal de depresión bien validado³. En este modelo, es ampliamente reportado un aumento de la locomoción 27 días postcirugía⁴ utilizando la prueba de campo abierto (PCA). Este comportamiento se ha interpretado como una falta de adaptación a un entorno nuevo⁵. Además, se reporta un aumento de erguidos en la PCA⁶, este comportamiento representa exploración visual, auditiva, olfativa y somatosensorial^{6,7}. Una hipótesis es, que las alteraciones conductuales y astrocíticas parecen depender del tiempo o evolución de la enfermedad.

2. Objetivos

2.1 General

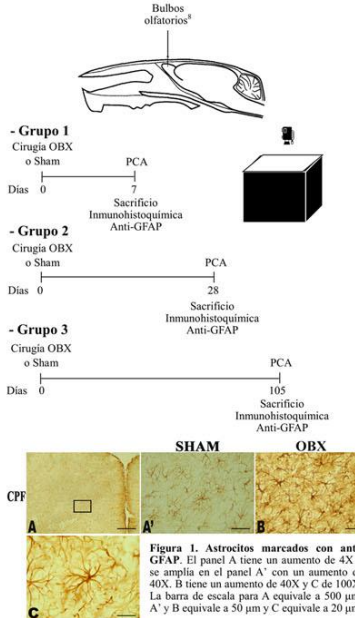
Evaluar el efecto temporal de la OBX en la conducta motora y los astrocitos.

2.2 Específicos

Después de 7, 28 y 105 días de realizar la cirugía OBX o Sham en grupos independientes se evaluarán los siguientes objetivos:

- Analizar el comportamiento locomotor, frecuencia de erguidos y acicalamientos
- Cuantificar los astrocitos positivos a GFAP en la CPF
- Evaluar la morfología de los astrocitos en la CPF

3. Métodos



6. Referencias

- Mignot-Hidalgo, E. et al. *Biol Psychiatry*. 2000; 48(8): 861-873.
- Koenigs, M., & Grafman, J. *Brain Research*. 2009; 20(2): 239-243.
- Willner, P., Mitchell, P.J. *Behav Pharmacol*. 2002; 13(2): 169-188.
- Morales-Molina J. C., et al. *Neuro*. 2013; 236: 233-243.
- Kelly J. P., Wynn A., & Leonard B. *Pharmacol Ther*. 1997; 74(3): 299-316.
- Kooze, P., Marroens, D. & Pokorny, J. *Neuro Endocrinol Lett*. 2017; 38(7): 495-501.
- Lever, C., Burton, S. & O'Keefe, J. *Rev Neurosci*. 2006; 17(1-2): 111-133.
- Van Riessen and Loosend. *Pharmac Ther*. 1990; 47: 21-34.

4. Resultados

4.1 Efecto de la OBX en la PCA y astrocitos en la CPF 7 días postcirugía

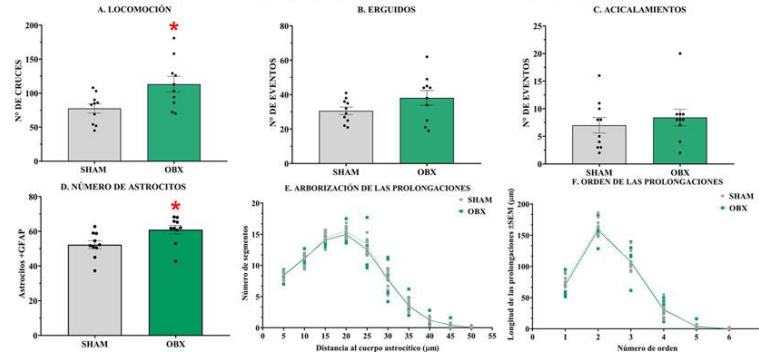


Figura 2. La OBX aumentó la actividad locomotora y el número de astrocitos. Se observó una diferencia estadística significativa en A) $p=0.0154$ y D) $p=0.0197$. Según el análisis "t student" con diferencias entre las ratas OBX y Sham, $n=10$ ratas. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

4.2 Efecto de la OBX en la PCA y astrocitos en la CPF 28 días postcirugía

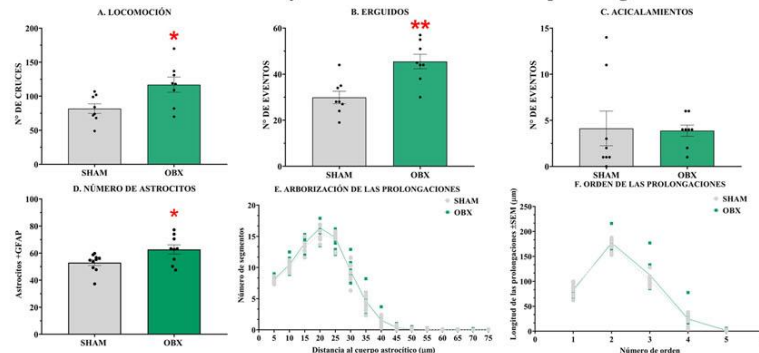


Figura 3. La OBX aumentó la actividad locomotora, el número de erguidos y el número de astrocitos. Se observó una diferencia estadística significativa en A) $p=0.0182$; B) $p=0.0021$ y D) 0.0238 . Según el análisis "t student" con diferencias entre las ratas OBX y Sham, $n=8$ y 9 ratas. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$; $**p<0.01$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

4.3 Efecto de la OBX en la PCA y astrocitos en la CPF 105 días postcirugía

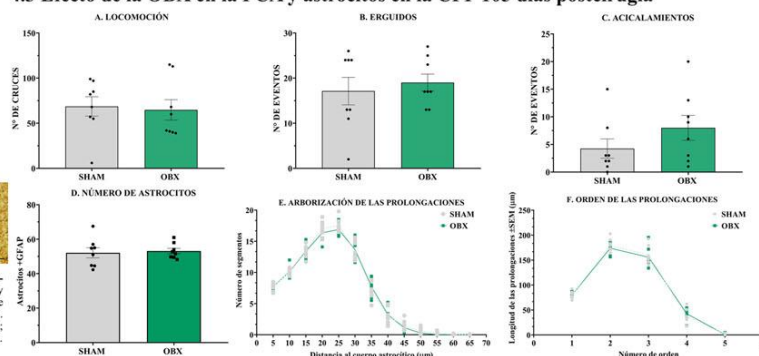


Figura 4. La OBX no alteró la actividad motora ni los astrocitos. $n=8$ ratas. Se consideró una probabilidad de ($*p<0.05$) para considerarse significativo. Todos los datos son expresados como la media \pm SEM.

5. Conclusión

La OBX induce hiperactividad temporal a un entorno nuevo coincidente con un aumento de astrocitos en la CPF. La alteración conductual no parece tener relación con la morfología astrocítica.

C) Federation of European Neuroscience Societies

Olfactory bulbectomy induces time-dependent hyperlocomotion and gliosis in the male rat

Julio César Morales-Medina¹, Mario Alberto Bautista-Carro^{1,2}

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UATx, Tlaxcala, México.

²Maestría en Ciencias Biológicas, UATx, CP 90070, Tlaxcala, México

Abstract

Background. Major depression disorder (MDD) induces a constellation of behavioral deficits including difficulties to adapt to novelty. A working hypothesis of MDD include astrocytic and microglia activation in the central nervous system. The prefrontal cortex (PFC) and hippocampus are two brain regions affected in MDD. Olfactory bulbectomy (OBX) is a well-known preclinical model of depression-related behavior in rodents.

Aims. In the present study, we tested the hypothesis that OBX induce alterations to adapt to a novel environment as a result of gliosis in the PFC and hippocampus in a time-dependent manner in the rat.

Methods. To test a possible lack of adaptation to novel places, we measured horizontal and vertical behaviors in the open field test (OFT). To determine whether OBX modulated astrocytic and/or glial expression, we measured the number and morphology of glial fibrillary acidic protein and Iba1 in the PFC and hippocampus. All these measurements were done in three independent cohorts at three critical times after surgery: one, four and fifteen weeks.

Results. OBX rats presented hyperlocomotion in the OFT at one and four weeks after surgery, interpreted as a failure of adaptation to novel environment. At four weeks after surgery, OBX rats displayed increased rearing and grooming, suggesting alterations in stress-coping behaviors. The number of astrocytes was increased in the PFC in OBX rats.

Conclusions. The data from this preclinical animal model supports the immunological theory of MDD. These results add further support to the validity and usefulness of the OBX rat as a model of depression.

Olfactory bulbectomy induces time-dependent hyperlocomotion and gliosis in the male rat

Julio C Morales-Medina¹, and Mario Alberto Bautista-Carro^{1,2}

¹CINVESTAV-Tlaxcala, México, ²Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, CP 90070, Tlaxcala, México

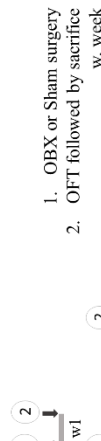
1. Background

Major depression disorder (MDD) induces numerous signs and symptoms including difficulties to adapt to novelty. A working hypothesis of MDD include astrocytic and microglia activation in the central nervous system (CNS) (2). The prefrontal cortex (PFC) and hippocampus are two brain regions affected in MDD (5). Olfactory bulbectomy (OBX) is a well-known preclinical model of depression-related behavior in rodents (1, 4). Our group and others have previously shown that OBX increases locomotion in the open field test (OFT) four weeks after surgery (5-7). Most research in the OBX rat show results 4-5 weeks after surgery (1, 4). Remain to be known when is the time that the abnormal behavior is observed and when is extinct. Moreover remains to be investigated is whether astrocytes and/or microglia in the CNS are involved in the behavioral deficits in the OBX.

2. Objectives

- To determine the effects of OBX in locomotor behavior in rats at three critical times after surgery
- To quantify the effects of OBX in the expression of astrocytes in the PFC and hippocampus at three critical times after surgery

3. Experimental design

- OBX or Sham surgery
 - OFT followed by sacrifice
- W, week
- 

4. Results

4.1. OBX increases the number of quadrants travelled one week after surgery

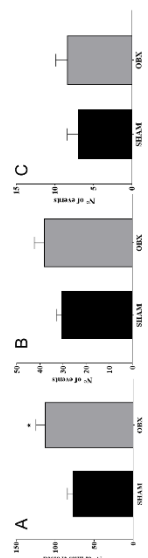


Fig. 2. One week after surgery, OBX increased the distance travelled (A) with no effect in rearing (B) or grooming (C). ** $p < 0.05$ compared to Sham-treated rats.

4.2. OBX increases the number of quadrants travelled and grooming four weeks after surgery

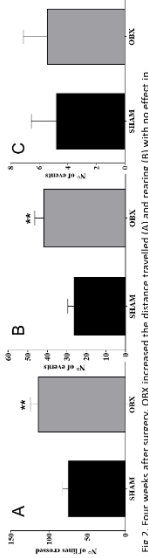


Fig. 3. Four weeks after surgery, OBX increased the distance travelled (A) and rearing (B) with no effect in grooming (C). ** $p < 0.01$ compared to Sham-treated rats.

4.3. OBX does not modify behaviors in the open field fifteen week after surgery

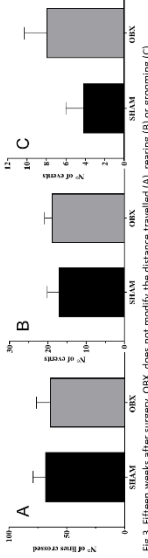


Fig. 4. Fifteen weeks after surgery, OBX does not modify the distance travelled (A), rearing (B) or grooming (C).

4.4. OBX increases the density of astrocytes without affecting the complexity of the processes one week after surgery

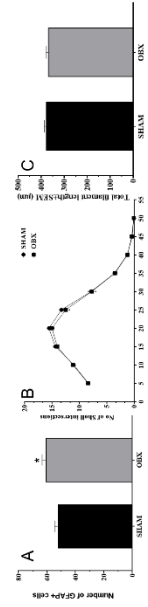


Fig. 5. OBX increases the density of astrocytes in the PFC (A). No significant change was observed in the processes of astrocytes (B) or total length (C) * $p < 0.05$ compared to Sham-treated rats.

4.5. OBX selectively increases astrocytic density in the PFC four week after surgery

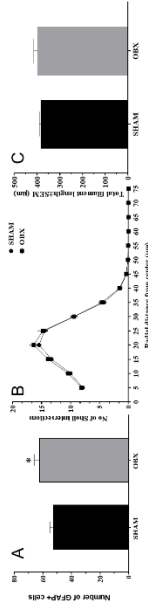


Fig. 6. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).

4.6. OBX does not affect density or morphology of astrocytes fifteen week after surgery

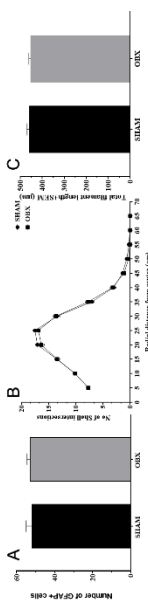


Fig. 7. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).



4.7. Representative images of GFAP positive cells in the PFC. A, C and E are shown at 4x magnification. All other images at 40x magnification. Scale bar for E is 500 μm . Scale bar for E' and F are 50 μm .

7. References

- J. P. Kelly, A. S. Wynne, B. E. Leonard, *Pharmacol & Ther* 74, 299-316 (1997).
- E. Pothos, P. Micalos, L. I. Bughio, *Behav Brain Res* 343, 79-90 (2018).
- C. Herber, G. Turecki, M. Mechawar, *J Psychiatric Res* 48, 847-861 (2010).
- J. C. Morales-Medina et al., *Neuroscience* 296, 233-241 (2013).
- D. Wang et al., *Behav Brain Res* 178, 262-273 (2007).
- A. Mier, E. Speckensmeiter, *J. Neurosci. Pharmacol. Biomed Behav* 79, 705-712 (2005).

5. Summary

OBX increases locomotion one week after surgery
 OBX increases locomotion and grooming four weeks after surgery
 OBX does not modify behaviors in the open field fifteen week after surgery
 OBX increases the astrocytic density in the PFC at one and four weeks after surgery
 OBX does not modify the density or structure of astrocytes in the hippocampus

6. Conclusion

The OBX induces alterations to novelty associated with increased density of astrocytes in the PFC in the rat.
 The data from this preclinical animal model supports the immunological theory of MDD. These results add further support to the validity and usefulness of the OBX rat as a model of depression.

1. Background
Major depression disorder (MDD) induces numerous signs and symptoms including difficulties to adapt to novelty. A working hypothesis of MDD include astrocytic and microglia activation in the central nervous system (CNS) (2). The prefrontal cortex (PFC), the basolateral amygdala (BLA) and hippocampus are brain regions affected in MDD (3). Olfactory bulbectomy (OBX) is a well-known preclinical model of depression-related behavior in rodents (1, 4). Our group and others have previously shown that OBX increases locomotion in the open field test (OFT) four weeks after surgery (5-7). Most research in the OBX rat show results 4-5 weeks after surgery (1, 4). Remain to be known when is the time that the abnormal behavior is observed and when is extinct. Moreover remains to be investigated whether astrocytes and/or microglia in the CNS are involved in the behavioral deficits in the OBX.

4. Results

4.1 OBX increases the number of quadrants travelled

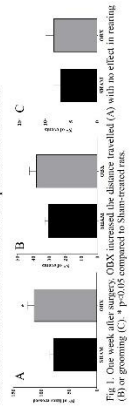


Fig. 1. One week after surgery, OBX increases the distance travelled (A) with the effect of rearing (B) or grooming (C). * p<0.05 compared to Sham-treated rats.

4.2 OBX increases the density of astrocytes in the PFC without affecting the complexity of the processes

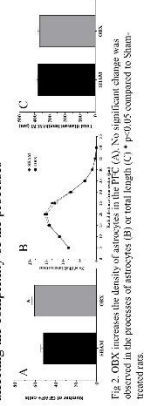


Fig. 2. OBX increases the density of astrocytes in the PFC (A). No significant change was observed in the processes of astrocytes (B) or total length (C). * p<0.05 compared to Sham-treated rats.

4.3 OBX does not affect density or morphology of astrocytes in CA1

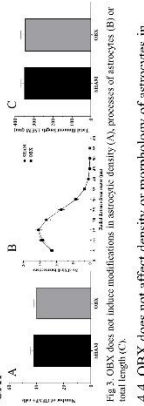


Fig. 3. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).

4.4 OBX does not affect density or morphology of astrocytes in BLA

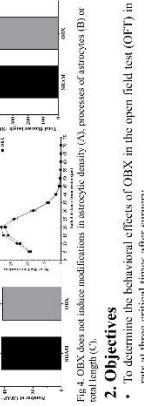


Fig. 4. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).

2. Objectives

- To determine the behavioral effects of OBX in the open field test (OFT) in rats at three critical times after surgery
- To quantify the effects of OBX in the expression of astrocytes in the PFC, BLA and hippocampus at three critical times after surgery

3. Experimental design



Group 2: Four weeks after surgery

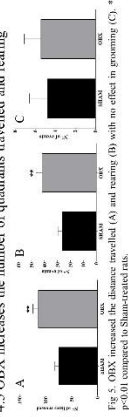


Fig. 5. OBX increases the number of quadrants travelled (A) with the effect of rearing (B) or grooming (C). * p<0.01 compared to Sham-treated rats.

4.5 OBX selectively increases astrocytic density in the PFC

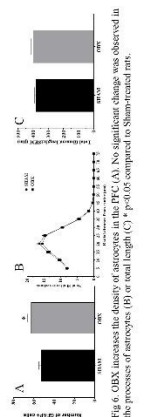


Fig. 6. OBX increases the density of astrocytes in the PFC (A). No significant change was observed in the processes of astrocytes (B) or total length (C). * p<0.05 compared to Sham-treated rats.

4.6 OBX does not affect density or morphology of astrocytes in CA1

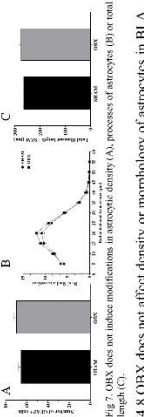


Fig. 7. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).

4.7 OBX does not affect density or morphology of astrocytes in BLA

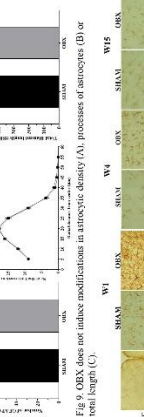
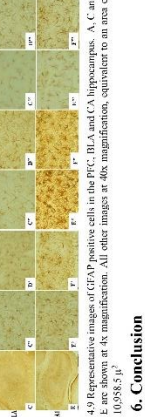


Fig. 8. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).



6. Conclusion

The OBX induces alterations to novelty associated with increased density of astrocytes in the PFC in the rat. Our preclinical model supports the immunological theory of MDD. These results add further support to the validity and usefulness of the OBX rat as a model of depression.

Group 3: Fifteen weeks after surgery

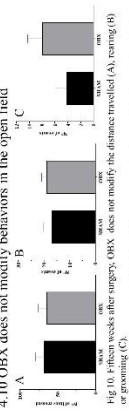


Fig. 11. OBX does not modify the distance travelled (A), rearing (B) or grooming (C).

4.10 OBX does not modify behaviors in the open field

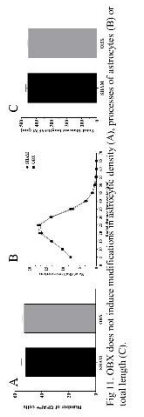


Fig. 12. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).

4.11 OBX does not affect density or morphology of astrocytes in the PFC

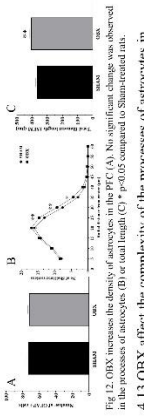


Fig. 13. OBX does not induce modifications in astrocytic density (A), processes of astrocytes (B) or total length (C).

4.12 OBX affect the complexity of the processes of astrocytes in CA1

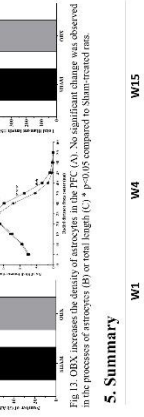


Fig. 14. OBX increase the density of astrocytes in the PFC (A). No significant change was observed in the processes of astrocytes (B) or total length (C). * p<0.05 compared to Sham-treated rats.

4.13 OBX affect the complexity of the processes of astrocytes in BLA



Fig. 15. OBX increase the density of astrocytes in the PFC (A). No significant change was observed in the processes of astrocytes (B) or total length (C). * p<0.05 compared to Sham-treated rats.

5. Summary

Behaviors	W1	W4	W15
Locomotion and rearing	(↑) Locomotion	(↑) Locomotion	No changes
Density of astrocytes	(↑) Density of astrocytes	(↑) Density of astrocytes	No changes
Complexity of processes of astrocytes	No changes	No changes	(↑) processes of astrocytes

7. References

- J. F. Kelly, A. S. Wynn, B. E. Leonard. *Pharmacol. Ther.* 74, 209-216 (1997).
- J. L. Drevets, P. Micus, L. Rajkovic. *Behav. Brain Res.* 94, 29-39 (2000).
- J. C. Morales-Medina, T. Izumi, A. Frensch, H. K. Calder, *Behav. Brain Res.* 317, 542-555 (2017).
- J. C. Morales-Medina et al. *Neuroscience* 344, 211-221 (2017).
- J. C. Morales-Medina et al. *Neuroscience* 344, 211-221 (2017).
- A. Mita, E. Spechtmeier, J. Rockenstein, *Proteinase Research* 73, 70-71 (2002).