



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA
AMIDA HIDROLASA DE ÁCIDOS
GRASOS POR UNA NUEVA
MACAMIDA SINTÉTICA MACOMCH-01
EN EL COMPORTAMIENTO TIPO
DEPRESIVO A TRAVÉS DE LA
MODULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN
DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA DE
RATONES BALB/C”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN NEUROCIENCIA

CARLOS MEDINA SALDIVAR

LIMA – PERÚ

2022

ASESOR

PhD. Luis Fernando Pacheco Otálora

JURADO DE TESIS

DR. ALFONSO ZA VALETA MARTÍNEZ-VARGAS

PRESIDENTE

MG. ANA CECILIA COLAROSSO SALINAS

VOCAL

DRA. CARLA JEANNINE GONZALES ARIMBORGO

SECRETARIA

DEDICATORIA.

El presente trabajo, así como todo el sacrificio que implicó su creación, está dedicado a mis padres, hermanos, familiares y amigos que experimentaron mi ausencia durante su desarrollo.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis padres, Santos y Graciela, todo el soporte y la confianza depositada en mí, porque sin ellos este proyecto nunca se habría gestado.

Agradezco al Dr. Luis Otálora, al Dr. Juan Manuel Iglesias, a la Dra. Grace Pardo y a todos mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Neurociencias – UAC, porque sin su instrucción y consejos, este proyecto nunca habría sido desarrollado.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto financiado por FONDECYT con código 025-2019-FONDECYT-DE

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA AMIDA HIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS POR UNA NUEVA MACAMIDA SINTÉTICA MACOMCH-01 EN EL COMPORTAMIENTO TIPO DEPRESIVO A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DOPAMINÉRG

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	eprints.ucm.es Fuente de Internet	1%
3	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1%
4	aprenderly.com Fuente de Internet	<1%
5	www.investigobiblioteca.uvigo.es Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	riuma.uma.es Fuente de Internet	<1%

patents.google.com

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	9
2.1.	Marco teórico	9
2.1.1.	Depresión clínica.....	9
2.1.1.1.	Definición y criterios de diagnóstico	9
2.1.1.2.	Tratamiento terapéutico	10
2.1.1.3.	Modelos animales para el estudio de la depresión.....	12
2.1.1.4.	Modelos de estrés agudo.....	13
2.1.1.5.	Modelo agudo de nado forzado.	14
2.1.1.6.	Evaluación de efecto ansiogénico mediante prueba de caja clara-oscura	15
2.1.1.7.	Evaluación de efecto ansiogénico y locomotor mediante prueba de campo abierto	16
2.1.2.	Sistema endocannabinoide	17
2.1.2.1.	Síntesis de anandamida.....	17
2.1.2.2.	Metabolismo de anandamida	20
2.1.3.	Receptores endocannabinoide.....	20
2.1.3.1.	Receptor endocannabinoide 1 - CB1	21
2.1.3.2.	Receptor endocannabinoide 2 - CB2	23
2.1.4.	Circuito mesolímbico	24
2.1.4.1.	Área tegmental ventral.....	25
2.1.4.2.	Núcleo accumbens	26
2.1.5.	Neurotransmisión dopaminérgica	27
2.1.6.	Receptores dopaminérgicos	28
2.1.6.1.	Receptores dopaminérgicos tipo 1	28
2.1.6.2.	Receptores dopaminérgicos tipo 2.....	30
2.2.	Planteamiento del problema de investigación	33
2.3.	Justificación del estudio	33
III.	HIPÓTESIS	35
IV.	OBJETIVOS	36
4.1.	Objetivos generales	36

4.2. Objetivos específicos.....	36
V. METODOLOGÍA.....	37
5.1. Animales.....	37
5.2. Fármacos	37
5.3. Diseño experimental.....	38
5.4. Crianza de ratones	40
5.5. Creación de grupos experimentales.....	40
5.6. Evaluación comportamental	41
5.6.1. Habitación	41
5.6.2. Administración de drogas	41
5.6.3. Prueba de nado forzado.....	42
5.6.4. Prueba de caja clara-oscura.....	43
5.6.5. Prueba de campo abierto	45
5.8. Análisis molecular.....	47
5.8.1. Diseño experimental del análisis molecular.....	47
5.8.2. Muestra.....	47
5.8.2.1. Descripción y procesamiento de muestra	47
5.8.2.2. Eutanasia de animales.....	47
5.8.2.3. Extracción y conservación de encéfalos	48
5.8.2.4. Cortes en frío de encéfalos.....	48
5.8.2.5. Microdissección de núcleo accumbens	50
5.8.3. Extracción de ácidos nucleicos (RNA)	50
5.8.3.1. Cuantificación de contenido y pureza de RNA	52
5.8.3.2. Integridad de RNA.....	52
5.8.3.3. Tratamiento con DNasa	53
5.8.3.4. Evaluación de contaminación (DNA genómico).....	53
5.8.4. Transcripción reversa.....	55
5.8.5. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....	56
5.8.5.1. Información de genes blanco para qPCR.....	56
5.8.5.2. Oligonucleótidos diseñados para qPCR.....	56
5.8.5.3. qPCR con sondas intercalantes (SYBR Green®).....	58
5.8.5.4. Eficiencia de amplificación para genes <i>18S</i> y <i>Faah</i>	60
5.8.5.5. Creación de librería.....	60
5.8.5.6. qPCR con sondas de hidrólisis (TaqMan®).....	63

5.8.5.7. Cuantificación relativa.....	64
5.9. Análisis estadístico	65
5.10. Consideraciones éticas	66
VI. RESULTADOS	67
6.1. Evaluación comportamental	67
6.1.1. MACOMCH-01 reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado	67
6.1.2. MACOMCH-01 no muestra propiedades ansiogénicas en la prueba de caja clara oscura	69
6.1.3. MACOMCH-01 incrementa la actividad locomotora pero no muestra propiedades ansiogénicas en la prueba de campo abierto.....	70
6.2. Análisis molecular	73
6.2.1. MACOMCH-01 incrementa el nivel de expresión de <i>Faah</i> y <i>Cnr1</i> en núcleo accumbens	73
6.2.2. MACOMCH-01 no produce cambios significativos en los niveles de expresión de <i>Drd1</i> y <i>Drd2</i> en núcleo accumbens	76
VII. DISCUSIÓN	78
VIII. CONCLUSIONES	90
IX. RECOMENDACIONES	91
X. REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS	93
XI. ANEXOS	

RESUMEN

MACOMCH-01 es una macamida semisintética que ha demostrado, *in-vitro*, actividad inhibitoria de amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), enzima encargada del metabolismo de endocannabinoides. Este hecho sugiere un potencial efecto antidepresivo. Sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios que comprueben este potencial en modelos preclínicos. El presente estudio evaluó el efecto de la administración de MACOMCH-01 a tres dosis diferentes en el comportamiento tipo depresivo de ratones BALB/c. Asimismo, se determinó el efecto en la expresión de genes relacionados a la neurotransmisión endocannabionide (*Napepld*, *Faah*, *Cnr1* y *Cnr2*) y dopaminérgica (*Drd1* y *Drd2*) en el núcleo accumbens. Se emplearon 97 ratones BALB/c machos de 2 meses de edad y se aplicó el modelo de estrés agudo de nado forzado. El comportamiento tipo depresivo fue evaluado mediante la misma prueba de nado forzado, mientras que los efectos secundarios ansiogénico y locomotor fueron evaluados mediante la prueba de caja clara-oscura y de campo abierto, respectivamente. Para el análisis de nivel de expresión génica se realizaron midrodisecciones del núcleo accumbens (core) y se realizó la cuantificación relativa de RNA mediante RT-qPCR. Se observó que la dosis de 10 mg/kg i.p. de MACOMCH-01 redujo el comportamiento tipo depresivo en ratones BALB/c machos expuestos a estrés agudo. Asimismo, MACOMCH-01 incrementó la expresión de *Faah* y *Cnr1* en núcleo accumbens, mientras que *Drd1* y *Drd2* no demostraron cambios significativos en el nivel de expresión.

PALABRAS CLAVES

Estrés agudo, Inhibidor FAAH, Nucleus accumbens, Real-Time PCR

ABSTRACT

MACOMCH-01 is a semi-synthetic macamide that has shown *in-vitro* inhibitory activity of fatty acid amide hydrolase (FAAH), an enzyme responsible for the metabolism of endocannabinoids. This fact suggests a potential antidepressant effect. However, to date no studies have been reported to verify this potential in preclinical models. The present study evaluated the effect of MACOMCH-01 administration at three different doses on depressive-like behavior in BALB/c mice. Likewise, the effect on endocannabinoid (*Napepld*, *Faah*, *Cnr1* and *Cnr2*) and dopaminergic (*Drd1* and *Drd2*) neurotransmission-related gene expression in the nucleus accumbens was also be determined. For this purpose, 97 male BALB/c mice, 2 months old were used. The forced swimming acute stress model was applied. Depressive-like behavior was evaluated using the same forced swimming test, while the anxiogenic and locomotor secondary effect were evaluated using the light-dark box and open field tests, respectively. For the analysis of the level of gene expression, midrodissections of the nucleus accumbens (core) and RNA relative quantification by RT-qPCR were performed. The dose of 10 mg/kg i.p. MACOMCH-01 reduced the depressive phenotype in male BALB/c mice exposed to acute stress. Likewise, MACOMCH-01 increased the expression of *Faah* and *Cnr1* in the nucleus accumbens, while *Drd1* and *Drd2* did not show significant changes in the expression level.

KEY WORDS

Acute stress, FAAH inhibitor, Nucleus accumbens, Real-Time PCR

I. INTRODUCCIÓN

La depresión clínica (trastorno mayor depresivo) es un trastorno afectivo heterogéneo caracterizado por la presencia de sentimientos de tristeza y/o anhedonia significativos (*Asociación Americana de Psiquiatría, Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM 5.*, 2014). Además, pueden estar acompañada por síntomas secundarios como la irritabilidad, alteración en el sueño, alteraciones de peso, fatiga, sentimientos de minusvalía, recurrentes pensamientos suicidas y marcada disminución de capacidad de concentración. En conjunto, estos síntomas afectan de manera considerable la calidad de vida y la productividad del paciente (*World Health Organization: The global burden of disease: 2004 update.* , 2004). Actualmente, la depresión es uno de los trastornos más prevalentes en nuestra sociedad. Se estima que afecta a 163 millones de personas a nivel mundial (Murray, 2018), mientras que en Perú 1.9 millones de habitantes mayores de 12 años (Cutipé Cárdenas et al., 2018). La alta prevalencia, la cronicidad del tratamiento (Jacob, 2012), la recurrencia sintomática (Gauthier, Mucha, Shi, & Guerin, 2019) y el abandono terapéutico (Ho, Chong, Chaiyakunapruk, Tangiisuran, & Jacob, 2016) los cuales incrementan el uso de recursos para el tratamiento de cada paciente, posicionan a la depresión como un problema de salud pública importante (Jacob, 2012).

Desde el punto de vista neurobiológico, la etiología de la depresión aún no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, se han descrito factores importantes responsables del desarrollo del trastorno. Una de las primeras hipótesis desarrolladas sobre la etiología de la depresión fue la hipótesis de las monoaminas. En ella se establecía que la depresión era causada por la depleción de serotonina,

dopamina y noradrenalina en el sistema nervioso central (Chouinard, 2019). Sin embargo, esta teoría no podía explicar el retraso de la efectividad de los antidepresivos clásicos, los cuales, si bien incrementaban el nivel de monoaminas cerebrales, este incremento no mejoraba la sintomatología de manera inmediata ni en todos los pacientes (Boku, Nakagawa, Toda, & Hishimoto, 2018). Otros trabajos apuntaban a que era la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (H-P-A) el responsable del desarrollo de la depresión (Lopez-Duran, Kovacs, & George, 2009; Stetler & Miller, 2011). En esta hipótesis se proponía que la disregulación de la retroalimentación negativa de producción de cortisol (en humanos) y corticosterona (en roedores) predisponía al individuo a una escasez de recursos para lidiar frente a situaciones estresantes, lo que desencadenaba en el fenotipo depresivo. Esta hipótesis ganó más solidez al establecerse la relación, entre la disregulación de dicho eje con cambios en la neuroplasticidad y neurogénesis evidenciada en núcleos subcorticales como el hipocampo (Boku et al., 2018; Masi & Brovedani, 2011), corteza prefrontal (Belleau, Treadway, & Pizzagalli, 2019; Bennett, 2011), y núcleo accumbens (Klok et al., 2011; J. C. Zhang et al., 2014). La evidencia más actual apunta a la relevancia que tiene la relación entre los centros cerebrales de recompensa y la depresión. La revisión bibliográfica publicada por Fox & Lobo (2019) detallan los cambios morfológicos y electrofisiológicos observados en los centros de recompensa, es decir, el circuito mesolímbico, producto del establecimiento del fenotipo depresivo en modelos animales, así como los principales factores moleculares asociados a la resiliencia y susceptibilidad (Fox & Lobo, 2019). Esta hipótesis es bastante promisoria debido a que asocia de manera más completa la relación que existe entre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal,

circuito mesolímbico y regiones relevantes como el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala cerebral.

Para entender la asociación entre estas regiones cerebrales es necesario describir el nodo conector de todos ellos: el circuito mesolímbico o circuito de la recompensa. El circuito mesolímbico está principalmente conformado por la interconexión entre el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens, los cuales a su vez se comunican con diversas otras regiones cerebrales. El área tegmental ventral es un núcleo constituido por neuronas dopaminérgicas (65%), GABAérgicas (35%) y glutamatérgicas (5%) (Holly & Miczek, 2016; Sesack & Grace, 2010). Este núcleo proyecta sinapsis dopaminérgicas principalmente al núcleo accumbens, y en menor grado a estructuras como el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala basolateral y central (Russo & Nestler, 2013). En cuanto al núcleo accumbens, este se encuentra formando parte del núcleo estriado dorsal y está constituido principalmente por neuronas GABAérgicas (*medium spiny neurons* - MSN) divididas en dos subpoblaciones que expresan receptores dopaminérgicos D1 (MSN-D1) o D2 (MSN-D2) (C. R. Gerfen & Surmeier, 2011). Estas neuronas reciben proyecciones sinápticas dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral y proyecciones glutamatérgicas de otras regiones como hipocampo, corteza prefrontal y amígdala basolateral. Asimismo, las neuronas GABAérgicas del núcleo accumbens se proyectan hacia diversas regiones dependiendo de la subpoblación observada. Las MSN-D1 se proyectan nuevamente hacia el área tegmental ventral, hacia sustancia nigra y núcleo pálido ventral, mientras que las MSN-D2 se proyectan únicamente hacia núcleo pálido ventral (Smith, Lobo, Spencer, & Kalivas, 2013). Se ha descrito que, dependiendo de qué subpoblación es activada,

esta puede estar más asociada a estímulos de recompensa (MSN-D1) o de aversión (MSN-D2), (Lu et al., 2021; Soares-Cunha et al., 2020). Esta evidencia posiciona al núcleo accumbens como una región cerebral intercomunicadora muy importante altamente relacionada a la percepción del placer, aversión y, por lo tanto, un foco de estudio relevante en la descripción de la neurobiología de la depresión.

Como se mencionó previamente, el núcleo accumbens recibe proyecciones principalmente dopaminérgicas del área tegmental ventral, por lo que está supeditado a la actividad moduladora de este último. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito otro mecanismo de modulación sináptica adicional al provisto por las neuronas dopaminérgicas. Este sistema modulador es el sistema endocannabinoide. El sistema endocannabinoide, presente en el espacio sináptico, tiene una función moduladora de la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y GABAérgica mediante la reducción de la neurotransmisión en situaciones de sobreestimulación. Esta función moduladora es ejercida a través de la activación de receptores acoplados a proteína G, llamados receptores cannabinoide por moléculas derivadas de lípidos de membrana denominados endocannabinoides. El proceso de modulación endocannabinoide inicia en la membrana postsináptica y es desencadenado por una constante y fuerte activación de receptores acoplados a proteína $G_{q/11}$ (receptores glutamatérgicos o GABAérgicos), la consecuente despolarización de membrana, apertura de canales de calcio voltaje-dependientes (VGCC) y el ingreso de iones Ca^{+2} (Hashimoto, Ohno-Shosaku, & Kano, 2007). Este suceso de eventos induce la síntesis calcio-dependiente de N-araquidiloil-fosfatidiletanolamina (N-ArPE) a partir de lípidos de membrana (fosfoglicéridos y fosfatidiletanolamina) (Basavarajappa, 2007a). Acto

seguido, la enzima fosfolipasa D específica para NAPE (NAPE-PLD) escinde a N-ArPE para producir N-araquidonoiletanolamina (anandamida) (Maccarrone, 2017) que constituye uno de los principales endocannabinoides, junto con 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Hashimotodani et al., 2007). Una vez sintetizados en la neurona postsináptica, los endocannabinoides atraviesan la membrana celular y se movilizan hacia la membrana presináptica, donde se ubican los receptores cannabinoides. Al ser una señalización que va desde la neurona postsináptica a la presináptica, este tipo de señalización se denomina “retrógrada”. Actualmente se han descrito dos tipos de receptores endocannabinoides: CB1, presente principalmente en sistema nervioso central con función reguladora de la neurotransmisión y CB2, presente en regiones cerebrales y periféricas con función neuroinflamatoria y plasticidad neuronal (Ibsen, Connor, & Glass, 2017). Estos receptores, al ser activados, liberan la subunidad $G\beta\gamma$ y esta a su vez inhibe los canales de calcio voltaje-dependientes y activa los canales rectificadores de potasio (GIRK) en la membrana presináptica. Como resultado, el ingreso de Ca^{+2} se ve limitado y la liberación de neurotransmisores desde las vesículas es restringido, reduciendo de esta forma la neurotransmisión (Hashimotodani et al., 2007). Es importante mencionar que este tipo de modulación solo se lleva a cabo cuando los endocannabinoides son sintetizados bajo las condiciones postsinápticas mencionadas anteriormente. Debido a que estas condiciones no se cumplen todo el tiempo, sino en situaciones de sobreestimulación, la síntesis de endocannabinoides es esporádica. Es por este motivo que los endocannabinoides no se almacenan en vesículas para su posterior liberación, sino que son sintetizados “a demanda” en la misma membrana plasmática (Basavarajappa, 2007b). La señalización

endocannabinoide es dependiente de la síntesis y biodisponibilidad de anandamida y similares, por lo que es regulada mediante su degradación. Estas reacciones de degradación por hidrólisis son realizadas por diferentes enzimas con cierto grado de selectividad, siendo la más importante la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), quien se encarga de la degradación del endocannabinoide anandamida. FAAH hidroliza anandamida produciendo ácido araquidónico y etanolamina, los cuales luego son reciclados y devueltos a la membrana celular (Maccarrone, 2017).

El sistema endocannabinoide también se relaciona consistentemente con la aparición de síntomas depresivos e incluso con la resiliencia a estos. Diversos estudios apuntan a que la disminución de la actividad endocannabinoide (Hill & Gorzalka, 2009), sea mediante uso de antagonistas CB1 (Christensen, Kristensen, Bartels, Bliddal, & Astrup, 2007; Janero & Makriyannis, 2009), delección genética de receptores CB1, (Aso, Ozaita, Serra, & Maldonado, 2011; Valverde & Torrens, 2012), sobreactividad de la enzima FAAH (Rafiei & Kolla, 2021) o disminución de cannabinoides endógenos (Gorzalka & Hill, 2011) reproducen los rasgos depresivos. Por otro lado, el aumento de la señalización CB1 mediante uso de agonistas o cannabinoides análogos confiere resiliencia (Vieira et al., 2020) o disminuye los efectos depresivos (Bambico & Gobbi, 2008; Segev, Rubin, Abush, Richter-Levin, & Akirav, 2014), por lo que son considerados potenciales antidepresivos. Asimismo, se ha descrito que la inhibición de la enzima FAAH, la cual incrementaría la biodisponibilidad de anandamida y otros endocannabinoides, también muestra efectos antidepresivos (Dong et al., 2020; Ren, Wang, Zhang, & Chen, 2020). Esta información ha permitido el diseño de fármacos novedosos con

potencial antidepresivo a través de vías neurológicas alternativas a los antidepresivos clásicos. Tal es el caso del fármaco URB-597, derivado carbamato con efecto inhibidor de la enzima FAAH, el cual ha demostrado efecto antidepresivo en modelos animales a nivel comportamental y molecular (Alteba et al., 2020; Jiang et al., 2019; Piomelli et al., 2006; Rafiei & Kolla, 2021; Realini et al., 2011). En la búsqueda de nuevas fuentes de fármacos inhibidores de FAAH con potencial antidepresivo similares a URB597, se encontró que una familia de moléculas extraídas las raíces de *Lepidium meyenii* (maca) también poseía este efecto farmacológico. Este grupo de moléculas, posteriormente denominadas macamidas, evidenciaron en estudios *in-vitro* actividad inhibitoria de la enzima FAAH con IC₅₀ desde 0.153 μM (Wu, Kelley, Pino-Figueroa, Vu, & Maher, 2013). Este efecto inhibitorio concordaba con estudios previos que evidenciaban efectos antidepresivos de extractos de maca (Brooks et al., 2008; Rubio, Caldas, Davila, Gasco, & Gonzales, 2006; Stojanovska et al., 2015), por lo que se especuló que dicho efecto antidepresivo podría ser atribuido al contenido de macamidas. De todas las macamidas reportadas, MACOMCH-01 (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida) constituye una de las macamidas cuyo perfil bioquímico ha sido mejor descrito mediante estudios *in-vitro* (Alasmari, Bhlke, Kelley, Maher, & Pino-Figueroa, 2019) y que a la fecha se posiciona como un potencial candidato antidepresivo.

No obstante, si bien los datos bioquímicos *in-vitro* son robustos y congruentes con la literatura, a la fecha no se ha reportado investigaciones que evidencien este efecto antidepresivo en modelos preclínicos. Por otro lado, los fármacos que actúan en la vía endocannabinoide también se caracterizan por tener

potenciales efectos secundarios en otros sistemas (Griebel et al., 2018). En general, estos fármacos tienen potencial para afectar al sistema locomotor (Bogathy, Kostyalik, Petschner, Vas, & Bagdy, 2019) ser ansiogénicos (Moreira, Grieb, & Lutz, 2009) e incluso producir adicción (Gamaledin et al., 2012; Orio, Edwards, George, Parsons, & Koob, 2009; Serrano & Parsons, 2011) o síndrome de abstinencia (Tai et al., 2015), por lo que se desconoce si MACOMCH-01 también podría generar estos efectos secundarios. Finalmente, si bien se ha descrito que la inhibición de FAAH ha demostrado tener efecto antidepresivo, son escasas las publicaciones que relacionen este efecto potenciador del sistema endocannabinoide con el circuito de la recompensa o circuito mesolímbico, el cual como se mencionó anteriormente, es el circuito que relaciona tanto al eje H-P-A con diferentes regiones cerebrales y la percepción de estímulos placenteros o aversivos.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial efecto antidepresivo, así como también los potenciales efectos secundarios locomotores y ansiogénicos de MACOMCH-01 como inhibidor de FAAH en un modelo murino expuesto a estrés agudo mediante pruebas comportamentales. De igual forma, también se propuso evaluar el efecto a nivel molecular de la administración de MACOMCH-01 en la señalización endocannabinoide y dopaminérgica a través de la expresión de genes relacionados a dichas vías en el núcleo accumbens, principal nodo conector del sistema mesolímbico o de recompensa.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco teórico

2.1.1. Depresión clínica

2.1.1.1. Definición y criterios de diagnóstico

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría, (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, por sus siglas en inglés: DSM-V), guía de referencia para diagnóstico de trastornos psiquiátricos, la depresión clínica o trastorno mayor depresivo es una afección de la esfera afectiva caracterizada por la presencia de sentimientos de tristeza o anhedonia persistente y deshabilitador. El DSM-V establece como criterio de diagnóstico la presencia de 5 o más síntomas descritos en la **Tabla 1**. Dentro de estos síntomas observados, necesariamente deben estar presente el síntoma 1 y/o 2. Estos síntomas deben estar presentes por más de 2 semanas, la mayor parte del día, la mayoría de días. Asimismo, ninguno de estos síntomas debe estar relacionado a otra comorbilidad o uso de fármacos.

Tabla 1. Síntomas descritos por el DSM-V usados para el diagnóstico de depresión clínica

1	Sentimientos de tristeza
2	Disminución considerable de percepción de placer por actividades otrora placenteras
3	Alteración considerable del peso (pérdida o ganancia)
4	Alteración del sueño (insomnio o hipersomnio)
5	Alteraciones psicomotoras (hipoactividad o hiperactividad)
6	Fatiga
7	Autopercepción de minusvalía o culpa
8	Disminución de capacidad de concentración
9	Pensamientos autolesivos

Para un correcto diagnóstico, todos estos síntomas deben ser observados y evaluados por un profesional médico. Las guías clínicas recomiendan el uso de pruebas de evaluación de depresión como es el caso del Inventario de Depresión de Beck (BDI) (García-Batista, Guerra-Pena, Cano-Vindel, Herrera-Martínez, & Medrano, 2018), Escala de depresión de Montgomery-Asberg (MADRS) (Quilty et al., 2013), Escala de depresión de Hamilton (HDRS) (Carrozzino, Patierno, Fava, & Guidi, 2020) entre otros. Estas guías permiten cuantificar mediante cuestionarios la presencia y gravedad de los síntomas depresivos. En el Perú se recomienda el uso de la Escala de Hamilton (Escalante Palomino & Uribe Obando, 2008). Dependiendo del puntaje obtenido en las herramientas de diagnóstico y según la experiencia del profesional evaluador, la depresión clínica puede subdividirse en leve, moderado, grave, con características psicóticas, en remisión parcial, en remisión total o no especificado ("International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics," 2022).

2.1.1.2. Tratamiento terapéutico

El tratamiento terapéutico propuesto a los pacientes va a depender del objetivo terapéutico, y este a su vez depende del diagnóstico y subtipo de depresión clínica. En general, el tratamiento terapéutico está dirigido a la remisión de los síntomas agudos de la depresión clínica o a evitar su reaparición. La Guía Práctica de Depresión Clínica del Perú propone tanto tratamiento psicoterapéutico como farmacológico (Escalante Palomino & Uribe Obando, 2008). Dentro de lo descrito por el tratamiento farmacológico, este documento recomienda grupos farmacológicos dependiendo de la evolución del paciente (**Tabla 2**).

Tabla 2. Tratamiento farmacológico propuesto por la Guía Práctica de Depresión Clínica del Perú

Fase	Objetivo terapéutico	Fármacos antidepresivos sugeridos
Aguda	Remisión de síntomas (8-12 semanas)	Inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram) Antidepresivos tricíclicos (amitriptilina) Antidepresivos atípicos (mirtazapina) Inhibidor de recaptación de serotonina/noradrenalina (venlafaxina, duloxetina)
Continuación	Prevención de recaídas (6 meses)	Mismo fármaco y dosis de fase aguda
Mantenimiento	Prevención de recurrencia (entre 2 - 5 años)	Mismo fármaco y dosis de fase aguda

Las guías nacionales consideran también la posibilidad aparición de síntomas agudos refractarios al tratamiento farmacológico, por lo que sugiere un procedimiento terapéutico en caso de fallo terapéutico. Luego de iniciar con fármacos inhibidores de la recaptación de serotonina (fluoxetina o sertralina) y no observar mejoría terapéutica en al menos 2 semanas, la guía recomienda incrementar escalonadamente la dosis hasta la máxima terapéutica. De no observarse respuesta luego de 4 semanas, propone cambiar de antidepresivo (puede ser del mismo grupo o de otro), aumentando dosis o usando combinaciones de fármacos. Si bien la guía acepta el uso de más de un antidepresivo a la vez, recomienda por sobre ello la monoterapia (Obando, Alosilla, Riquelme, Paredes, & Freyre, 2008). Sin embargo, pese a la intervención farmacológica ampliamente descrita en las guía terapéuticas, uno de los principales problemas de la depresión

clínica sigue siendo el fallo terapéutico. Se estima 38% de los pacientes que reciben tratamiento antidepresivo de primera línea no alcanza el objetivo terapéutico entre 6 y 12 semanas, mientras que el 54% de los pacientes no alcanza la remisión de los síntomas (Gerald Gartlehner et al., 2008). Este problema ha generado una motivación a nivel mundial por encontrar nuevos fármacos antidepresivos con un mejor perfil terapéutico y con menos reacciones adversas.

2.1.1.3. Modelos animales para el estudio de la depresión

El éxito en el descubrimiento de nuevas moléculas está supeditado al modelo animal empleado. Un fármaco novedoso evaluado en un mal modelo animal puede dar conclusiones erradas sobre su potencial efecto antidepresivo. Es por eso que antes de estudiar un fármaco en animales es necesario revisar la validez del modelo animal a emplearse. Un modelo animal es considerado válido cuando cumple tres criterios: **i)** validez aparente (del inglés *face validity*, cuando el modelo animal presenta un fenotipo similar o análogo al trastorno), **ii)** validez de constructo (cuando el desarrollo del fenotipo parte de una etiología o base neurobiológica similar) y **iii)** validez predictiva (cuando una intervención terapéutica control obtiene resultados clínicos análogos en humanos) (Anisman & Matheson, 2005; Willner & Mitchell, 2002). Un modelo animal es más válido mientras más se cumplan estos tres criterios. A su vez, estos criterios serán alcanzados de mejor manera mientras exista una mayor comprensión del trastorno. Sin embargo, cuando nos centramos en el estudio de la depresión clínica, tanto la presentación clínica (Penninx, Lamers, & Milaneschi, 2018) como la etiología (Williams, 2016) es heterogénea. Adicional a lo anterior, es imposible modelar y evaluar, en animales, aspectos cognitivos superiores asociados a la depresión tales como sentimientos de

culpa, minusvalía o pensamientos autolesivos o suicidas (Cryan, Markou, & Lucki, 2002). Con todo lo mencionado, la selección de un modelo animal válido para el estudio de la depresión constituye todo un reto para los investigadores. A la fecha se han descrito diversos modelos animales empleando a roedores para el estudio de la depresión (Hao, Ge, Sun, & Gao, 2019; Menard, Hodes, & Russo, 2016). Cada modelo murino cumple en mayor o en menor medida los tres criterios de validez y presentan ventajas y desventajas asociadas. Estos modelos pueden ser divididos en modelos de estrés agudo, estrés crónico y de depresión secundaria o iatrogénica (Krishnan & Nestler, 2011).

2.1.1.4. Modelos de estrés agudo

Son considerados los modelos para *screening* o tamizaje temprano de potenciales antidepresivos. Estos modelos evalúan el efecto agudo de la intervención farmacológica en el modelo murino al cual se le aplica un estresor de corta duración (usualmente 1 o 2 días). La ventaja de estos modelos es que son fáciles y rápidos de aplicar, además de que son confiables y específicos. Los modelos de estrés agudo también presentan inconvenientes. Considerando que la depresión es un trastorno crónico, estos modelos tienen la desventaja de ser débiles en cuanto a la validez de constructo. Adicionalmente, los antidepresivos clásicos suelen mostrar respuesta terapéutica luego de varias semanas, por lo que estos modelos agudos no son sensibles a antidepresivos como inhibidores selectivos de recaptación de serotonina. Pese a lo anterior, los modelos de estrés agudo siguen siendo opciones viables y empleadas internacionalmente para el *screening* inicial de antidepresivos. Entre los modelos más empleados encontramos el modelo de nado forzado, de suspensión por la cola, restricción aguda de movimiento e

indefensión aprendida (Cryan et al., 2002; Krishnan & Nestler, 2011; Porsolt, 2000). En el presente trabajo de investigación se empleó el modelo de nado forzado modificado para su aplicación en ratones.

2.1.1.5. Modelo agudo de nado forzado.

La prueba de nado forzado fue diseñada originalmente en 1977 por Porsolt para evaluar el comportamiento tipo depresivo en ratas y posteriormente modificada para ratones (Porsolt, Le Pichon, & Jalfre, 1977). Luego, esta misma prueba se constituiría como un modelo de estrés agudo para depresión al replicar el comportamiento de desesperación frente a un estímulo aversivo inescapable como es el nado forzado (Porsolt, 2000). El modelo consiste en colocar al roedor en un cilindro inescapable con agua por 5 minutos en ratas y 6 minutos en ratones. El riesgo de ahogarse y la necesidad de nadar para mantenerse a flote constituye el estresor agudo. El comportamiento depresivo se mide indirectamente mediante la medición del tiempo en que el roedor permanece inmóvil. Un incremento en el tiempo de inmovilidad puede interpretarse como una disminución del intento por escapar del estímulo aversión y una rendición ante la impotencia (Lucki, Dalvi, & Mayorga, 2001). Este modelo presenta gran evidencia en cuanto a la validez predictiva ya que puede detectar efectos antidepresivos agudos mediante la reducción de la inmovilidad del roedor durante la prueba. No obstante, este modelo presenta un sesgo importante ya que diversos fármacos pueden afectar la movilidad del individuo incrementando su comportamiento ansioso o directamente la actividad locomotora por vías alternas a las esperadas en el modelo. Esta alteración en la inmovilidad podría interpretarse erróneamente como un efecto antidepresivo. Para reducir el riesgo de sesgo producto de efecto de la droga, especialmente en

fármacos endocannabinoides, se plantean diversas pruebas comportamentales complementarias que evalúan el espectro ansioso y locomotor del roedor (Griebel et al., 2018). Para fines de reducción de riesgo de sesgo en el presente estudio, se seleccionaron las pruebas de caja clara-oscura y de campo abierto para evaluar el comportamiento ansioso y el efecto locomotor en los ratones. Asimismo, pese a que el modelo prevé la ausencia de un grupo control puro (no expuesto a estresor) debido a que la misma prueba de evaluación constituye el estresor agudo, esto no resulta en un impedimento para la detección temprana, simple y reproducible del efecto antidepressivo de una droga (Porsolt, 2000)..

2.1.1.6. Evaluación de efecto ansiogénico mediante prueba de caja clara-oscura

La prueba de caja oscura fue descrita por primera vez por Crawley & Goodwin en 1980 y fue empleada para evaluar el efecto ansiolítico de las benzodiazepinas (Crawley & Goodwin, 1980). Esta prueba comportamental tenía la ventaja de poder ser aplicado rápidamente y sin necesidad de entrenamiento previo, a comparación de otras pruebas como la prueba de conflicto de Vogel. En la actualidad la prueba ha pasado por diversas modificaciones dependiendo del autor y el estudio, no obstante el principio sigue siendo el mismo. El principio de la evaluación del comportamiento tipo ansioso de esta prueba reside en el conflicto que experimenta el ratón por explorar de manera espontánea un ambiente nuevo y la aversión que naturalmente siente por áreas abiertas e iluminadas. Para la evaluación se coloca al ratón en un aparato bicameral intercomunicado por un pequeño pasaje. Una de estas cámaras es transparente y está expuesta a una fuente de luz de 400 lx (caja clara), mientras que la otra cámara es oscura y representa un

ambiente seguro para el ratón (caja oscura) (Bourin & Hascoet, 2003). El ratón es colocado inicialmente en la caja clara. La medición del comportamiento tipo ansioso se evalúa comparando el tiempo de permanencia en la cámara clara, el número de transiciones y la latencia del ratón por ingresar por primera vez a la cámara oscura.

2.1.1.7. Evaluación de efecto ansiogénico y locomotor mediante prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto fue descrita por primera vez en 1934 por Calvin Hall y se usó principalmente para evaluar los componentes comportamentales y fisiológicos de la esfera emotiva de los roedores frente a eventos estresantes mediante indicadores como la defecación y micción (Hall, 1934). Años más tarde esta misma prueba sería usada para evaluar, además de la esfera emotiva, el comportamiento tipo ansioso y medir la locomoción de roedores mediante su habilidad ambulatoria (Seibenhener & Wooten, 2015). Esta prueba consiste en colocar al roedor en el centro de un campo cuadrado o circular con paredes lo suficientemente altas como para evitar su escape. El principio de la evaluación del comportamiento tipo ansioso reside en contraponer la curiosidad innata del ratón por explorar ambientes novedosos versus la necesidad de buscar refugio y escapar de lugares considerados riesgosos. Un ratón con comportamiento tipo ansioso pasará menos tiempo explorando el centro del campo abierto al considerarse expuesto a posibles amenazas. Por otro lado, tenderá a pasar más tiempo junto a las paredes del campo en busca de refugio (tigmotaxia) (Kraeuter, Guest, & Sarnyai, 2019). La forma objetiva de medir este comportamiento es mediante el tiempo acumulado de permanencia en el centro del campo y el número de transiciones

desde los bordes al centro. El principio de la evaluación de la actividad locomotora reside en el principio de que un ratón sano muestra una mayor actividad deambulatoria que un ratón con este tipo de afección. La forma objetiva de medir este comportamiento es mediante la distancia acumulada de deambulación del ratón durante la prueba. Asimismo, también se mide el tiempo que el ratón permanece inmovil en una sola posición (Kraeuter et al., 2019).

2.1.2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es un mecanismo molecular presente tanto en sistema inmunológico como en sistema nervioso. Dentro del sistema nervioso tiene una función moduladora de la neurotransmisión sináptica ya sea de manera directa (glutamatérgica y GABAérgica) o indirecta (dopaminérgica). Para el cumplimiento de esta función, el sistema endocannabinoide requiere de un conjunto de enzimas, predominantemente postsinápticas, que sinteticen y metabolicen los endocannabinoides. Asimismo, requiere de receptores específicos que lleven a cabo los cambios moleculares modulatorios. Estos receptores denominados receptores endocannabinoides pueden ubicarse predominantemente en la terminación axonal presináptica (CB1) (Huang, Chen, & Zhang, 2016) o en el área somatodendrítica postsináptica (CB2) (H. Y. Zhang et al., 2014). Dado que la señalización endocannabinoide se transmite generalmente desde la neurona postsináptica a la presináptica se denomina “señalización retrógrada”.

2.1.2.1. Síntesis de anandamida

Los endocannabinoides son sustancias de naturaleza lipídica que, a diferencia de los neurotransmisores clásicos que se sintetizan y se almacenan en

vesículas para su posterior liberación, se sintetizan bajo determinadas circunstancias y se liberan inmediatamente. A este tipo de síntesis se denomina “a demanda”. Los dos endocannabinoides más abundantes presentes en el sistema nervioso central son anandamida (AEA) y 2-acilglicerol. Cada uno de ellos son sintetizados por diferentes vías metabólicas, no obstante su síntesis responde al mismo estímulo promotor.

Como se mencionó previamente, los endocannabinoides se sintetizan en la neurona postsináptica. Existen al menos dos promotores que dan inicio a la síntesis “a demanda” de los endocannabinoides: la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCR) con subunidad $G\alpha_{q/11}$ y la despolarización de la membrana mediante el ingreso de iones calcio (Hashimoto et al., 2007).

Diversos neurotransmisores como el glutamato y GABA pueden interactuar con GPCR selectivos que presentan una subunidad $G\alpha_{q/11}$ en su estructura. La activación de $G\alpha_{q/11}$ incrementa la actividad de la adenilato ciclasa en la membrana postsináptica, lo que conlleva a una acumulación de cAMP. El cAMP por su lado promueve la actividad de la fosfoquinasa A (PKA) y esta a su vez potencia la acción de la enzima N-aciltransferasa (Cadas, Gaillet, Beltramo, Venance, & Piomelli, 1996). Esta enzima es muy importante dado que condensa una molécula de fosfatidiletanolamina (PE) con ácido araquidónico proveniente de fosfoglicéridos (PG) provenientes de la membrana celular. El resultado de esta condensación se denomina N-araquidonilfosfatidiletanolamina (N-ArPE). A partir de este punto, N-ArPE puede tomar diversas vías metabólicas que derivan finalmente en la síntesis de AEA. La vía más importante es llevada a cabo por la enzima fosfolipasa D específica de N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD). NAPE-PLD hidroliza N-

ArPE en AEA y ácido fosfatídico (Maccarrone, 2017). Otras vías alternas para la síntesis de AEA comprenden la acción de enzimas como sPLA2 y Lyso-PLD. Para una lectura más detallada del mecanismo se recomienda la revisión escrita por Basavarajappa (2007) (Basavarajappa, 2007a). La **Figura 1** permite una mejor visualización de los procesos bioquímicos relacionados a la síntesis de anandamida. Otro evento promotor de la síntesis “a demanda” de endocannabinoides es la despolarización de la membrana postsináptica que se caracteriza por el ingreso de iones calcio al interior de la neurona postsináptica. El incremento de Ca^{+2} tiene la capacidad de incrementar la actividad de la encima N-aciltransferasa, la cual da inicio a la síntesis de anandamida. Asimismo, también se ha reportado la existencia de N-aciltransferasas independientes de calcio que aportan en la síntesis de AEA (Jin et al., 2007).

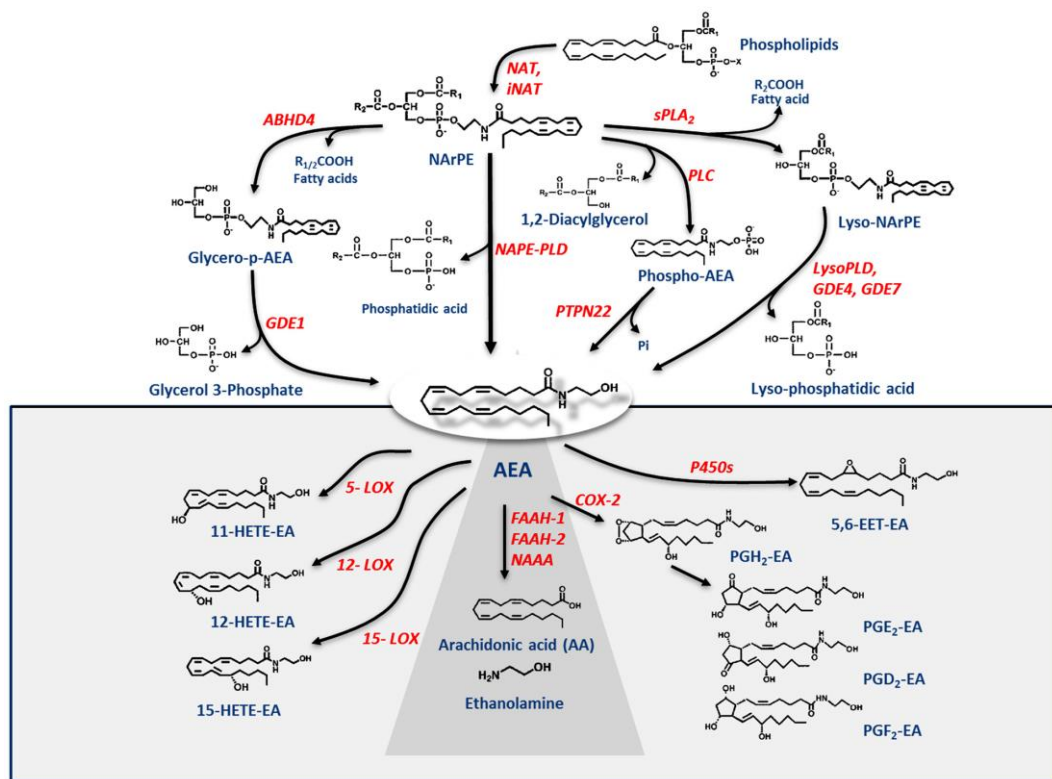


Figura 1. Via metabólica de la síntesis y degradación del endocannabinoide anandamida (AEA). Imagen extraída del artículo de Macarrone (2017).

2.1.2.2. Metabolismo de anandamida

Luego de ser sintetizados, anandamida y los demás endocannabinoides son liberados al espacio sináptico a través del transportador de endocannabinoides (AMT). Una vez allí interactúan con los receptores endocannabinoides ubicados en la membrana presináptica. Asimismo, para mantener una señalización controlada, diversas enzimas se encargan de degradar el excedente de endocannabinoides producidos. Una de las enzimas más importantes en la degradación de anandamida es la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Esta enzima transmembrana ubicada en la membrana de la neurona presináptica se encarga de hidrolizar a la anandamida produciendo ácido araquidónico y etanolamina, los cuales se reciclan y vuelven a la membrana celular. Asimismo, existen otras enzimas como la ciclooxigenasa-2, 5-, 12- y 15-lipooxigenasa y monooxigenasas de citocromo P450 también se encargan de degradar a la anandamida y otros endocannabinoides, cumpliendo un rol de control de la biodisponibilidad junto con FAAH (Maccarrone, 2017). La **Figura 1** permite una mejor visualización de los procesos bioquímicos relacionados a la degradación enzimática de anandamida.

2.1.3. Receptores endocannabinoide

Existen dos tipos de receptores endocannabinoides: CB1 y CB2. Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G y la función fisiológica que genera su activación depende de las subunidades en su estructura y la ubicación del receptor. De manera general se puede decir que la

activación de los receptores endocannabinoides reduce la excitabilidad neuronal cumpliendo una función moduladora frente a eventos de excesiva neurotransmisión.

2.1.3.1. Receptor endocannabinoide 1 - CB1

El receptor CB1 se expresa abundantemente en la terminal presináptica de neuronas de regiones como corteza, hipocampo, núcleo estriado y cerebelo. Este GPCR de tipo A está conformado por una subunidad $G\alpha_{i/o}$ y una subunidad $G\beta\gamma$. Además cuenta con dominios de unión a β -arrestina, la cual también interviene en el mecanismo de acción del receptor (Ye, Cao, Wang, & Zhou, 2019). Una vez activado por un agonista, el receptor libera la subunidad $G\beta\gamma$, la cual actúa reduciendo las corrientes de calcio en los canales de calcio dependientes de voltaje. Asimismo, activa los canales reguladores de potasio (GIRK), permitiendo el ingreso de iones K^+ y estabilizando el potencial de la membrana neuronal (Ver **Figura 2**). La interacción con ambos receptores reduce de manera directa la excitabilidad neuronal y la liberación calcio-dependiente de neurotransmisores almacenados en vesículas. Adicionalmente, la subunidad $G\beta\gamma$ también activa a la enzima fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), la cual a su vez produce la fosforilación de diferentes MAP kinasas (ERK1/2, JNK, Akt, p38) que intervienen en la regulación de la expresión de diferentes genes. Por otro lado, la subunidad $G\alpha_{i/o}$ reduce la actividad catalítica de la adenilato ciclasa, reduciendo como consecuencia la disponibilidad de cAMP. Esta reducción de cAMP también reduce la activación de PKA, lo que podría significar una reducción en la excitabilidad neuronal mediada por la activación de canales de calcio y cierre de canales de potasio. Asimismo, la subunidad $G\alpha_{i/o}$ interactúa con la proteína β -arrestina-1 lo que traería

como consecuencia una activación temprana de ERK1/2, su traslocación al núcleo y promoción de transcripción génica y proliferación celular (Ibsen et al., 2017).

β -arrestina es una proteína que interactúa con el GPCR en ausencia de la proteína G e interviene en la regulación y localización de los receptores CB. La β -arrestina se une al GPCR en dos sitios: el C-terminal fosforilado y el extremo citoplasmático. Una vez unido, la β -arrestina evita que el GPCR se vuelva a activar propiciando su desensibilización. Adicionalmente, produce una regulación de la expresión de GPCR mediante la internalización del receptor y su remoción de la membrana. La β -arrestina también tiene capacidad de inducir la fosforilación de ERK1/2, no obstante la forma en que lo hace difiere de la inducción observada por la subunidad $G\alpha$. En este caso, el efecto sobre ERK1/2 suele ser más lento, menos intenso pero de mayor duración. Asimismo, la pERK dependiente de β -arrestina suele concentrarse en los endosomas, donde produce inhibición de factores de transcripción y fosforilación de proteínas relacionadas a la dinámica del citoesqueleto, apoptosis y migración celular (Leo & Abood, 2021).

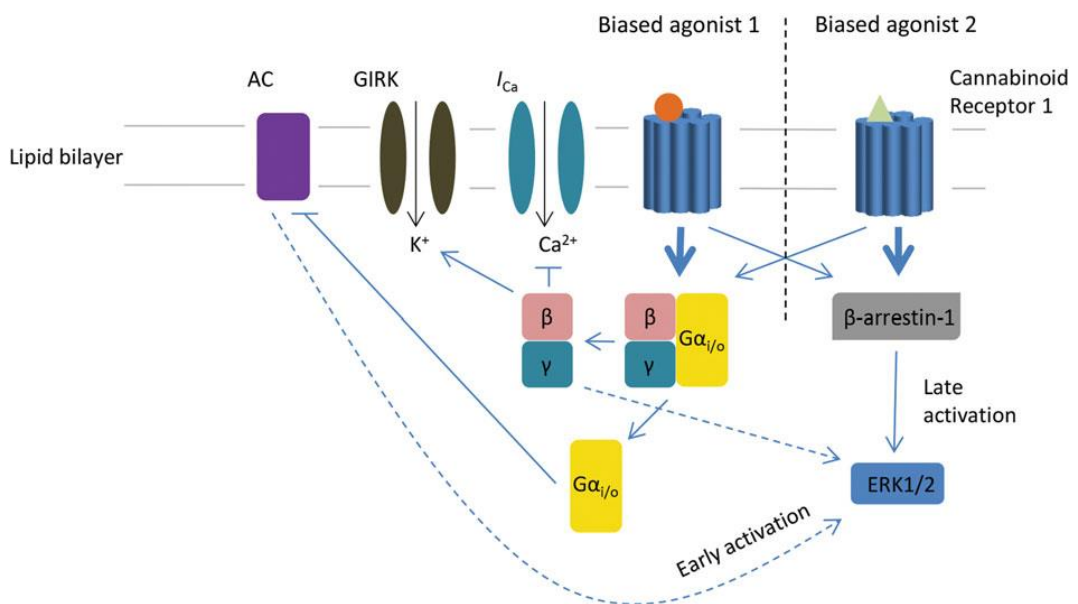


Figura 2. Bloqueo de canales de calcio y apertura de canales reguladores de potasio medida por la subunidad $\beta\gamma$ del receptor cannabinoide 1 activado. Imagen extraída del artículo publicado por Ibsen et al. (2017)

2.1.3.2.Receptor endocannabinoide 2 - CB2

Antiguamente se pensaba que el receptor CB2 no se expresaba en el sistema nervioso central sino que cumplía su función moduladora en el sistema inmunológico, encontrándose en tejidos como endotelio pulmonar, huesos, sistema gastrointestinal y bazo. No obstante, la literatura actual sugiere que, si bien a niveles fisiológicos la expresión de CB2 es muy baja (no detectable desde un punto de vista metodológico), este sí se expresa en el sistema nervioso central. A diferencia del receptor CB1 que se expresa principalmente en las terminaciones presinápticas, CB2 se expresa en las áreas somatodendríticas postsinápticas de regiones como retina, corteza, núcleo estriado, hipocampo, amígdala, tronco encefálico y cerebelo (Atwood & Mackie, 2010). La distribución postsináptica de CB2 explica las diferencias en cuanto a su efecto fisiológico comparado con receptores CB1, pese a contar con la misma estructura como GPCR (Chen, Gao, Gao, Su, & Wu, 2017), CB2 también presenta una subunidad $G\alpha_{i/o}$ la cual al ser activada, inhibe a la adenilatociclasa. Esto, como se mencionó anteriormente, reduce el flujo de canales de calcio y abre los canales de potasio (GIRK), reduciendo así la excitabilidad neuronal (Atwood & Mackie, 2010). En el circuito mesolímbico esto es relevante puesto que la activación de CB2 reduciría la liberación de dopamina en las terminales neuronales .

Como se mencionó previamente, en condiciones fisiológicas la expresión de CB2 es reducida. Sin embargo, se ha observado que estados patológicos como dolor

neuropático, accidentes cerebrovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cuadros de adicción pueden inducir un incremento de la expresión de CB2. Se especula que este incremento respondería a un intento fisiológico por recuperar la homeostasis en la excitabilidad neuronal (Chen et al., 2017).

2.1.4. Circuito mesolímbico

El área tegmental ventral es una región del mesencéfalo con abundante presencia de neuronas dopaminérgicas. Dependiendo de hacia dónde se proyectan estas neuronas pueden formar distintos circuitos. La proyecciones dopaminérgicas dirigidas a la corteza prefrontal media forman el denominado circuito mesocortical, mientras que las neuronas dopaminérgicas que se proyectan al núcleo estriado ventral, más específicamente al núcleo accumbens forman el circuito mesolímbico (Ver **Figura 3**). Para describir al circuito mesolímbico es necesario describir a sus dos componentes principales: el área tegmental ventral y el núcleo accumbens.

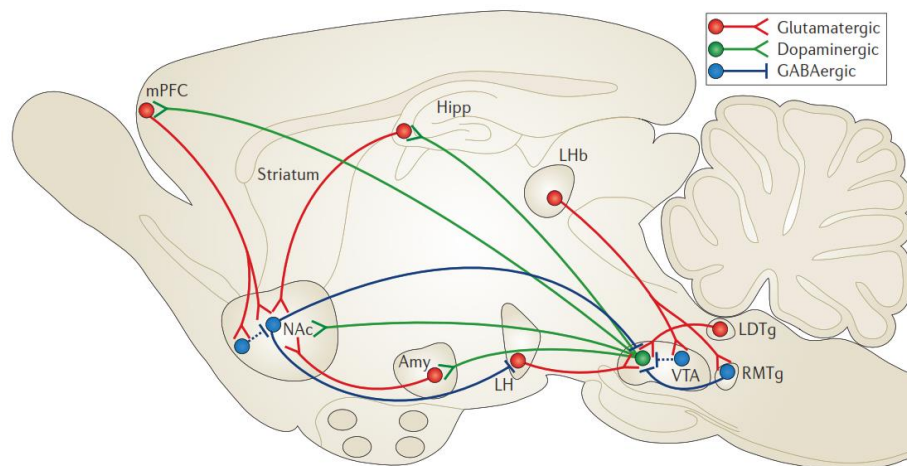


Figura 3. Esquema representativo de las principales proyecciones relacionadas al circuito mesolímbico (área tegmental ventral (VTA) y núcleo accumbens (NAc)) del cerebro de ratón. Imagen extraída del artículo publicado por Russo & Nestler (2013).

2.1.4.1. Área tegmental ventral

El área tegmental ventral (VTA) es una región cerebral ubicada en el mesencéfalo y, junto con la sustancia nigra, constituyen los núcleos con mayor población dopaminérgica en el encéfalo. La población neuronal del VTA está compuesta por neuronas dopaminérgicas (65%), interneuronas GABAérgicas (35%) y glutamatérgicas (5%) (Holly & Miczek, 2016; Sesack & Grace, 2010). Esta región neuronal es inervada por otras regiones que cumplen un papel modulador en la liberación de dopamina. Neuronas glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal medial y tegmentum dorsal lateral (LDTg) inervan a las neuronas dopaminérgicas y tienen una función predominantemente excitatoria, propiciando la liberación de dopamina. Por otro lado, estructuras como el tegmento rostromedial (RMTg) y el núcleo accumbens envían proyecciones GABAérgicas a las neuronas dopaminérgicas, reduciendo así su excitabilidad y resultando en una disminución de la liberación de dopamina. Asimismo, neuronas glutamatérgicas de la habénula lateral (LHb) reducen la liberación de dopamina de manera indirecta al proyectarse a las interneuronas GABAérgicas del VTA. Estas interneuronas inhibitorias liberan GABA sobre los receptores GABAérgicos de las neuronas dopaminérgicas produciendo su excitabilidad (Russo & Nestler, 2013). Este núcleo proyecta sinapsis dopaminérgicas principalmente al núcleo accumbens, y en menor grado a estructuras como el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala basolateral y central (Russo & Nestler, 2013).

2.1.4.2. Núcleo accumbens

El núcleo accumbens es una región perteneciente al núcleo estriado ventral. Está compuesto principalmente por neuronas GABAérgicas (95%) e interneuronas colinérgicas (5%) (Fox & Lobo, 2019; Russo & Nestler, 2013). Las neuronas GABAérgicas son denominadas *medium spiny neurons* (MSN) las cuales expresan receptores dopaminérgicos D1 o D2, formándose dos subpoblaciones definidas. Estas MSN reciben proyecciones predominantemente dopaminérgicas provenientes del VTA. Asimismo, proyecciones glutamatérgicas provenientes de hipocampo, mPFC y amígdala basolateral interactúan con la terminal sináptica proveniente de VTA para incrementar la liberación de dopamina (Covey, Mateo, Sulzer, Cheer, & Lovinger, 2017). Por otro lado, interneuronas GABAérgicas de dentro del mismo núcleo accumbens también interactúan con las terminaciones sinápticas dopaminérgicas, cumpliendo un papel inhibitorio y reduciendo la liberación de dopamina. Las interneuronas colinérgicas también cumplen un papel relevante en la liberación de dopamina de manera indirecta. La acetilcolina liberada por las CIN interactúan con receptores nicotínicos de acetilcolina (nACh-R) y receptores metabotrópicos de acetilcolina (mACh-R) de las proyecciones glutamatérgicas propiciando una liberación de glutamato. Este a su vez interactúa con las terminaciones dopaminérgicas incrementando la liberación de dopamina (Mateo et al., 2017). Es importante mencionar que tanto las proyecciones glutamatérgicas como las interneuronas colinérgicas expresan receptores endocannabinoides en sus terminales, mientras que las neuronas dopaminérgicas e interneuronas colinérgicas carecen de ellos. Esto es relevante dado que la activación de receptores CB1 en las proyecciones glutamatérgicas reduciría la liberación de glutamato, reduciendo la

liberación de dopamina. Por otro lado, la activación de CB1 en interneuronas GABAérgicas reduciría su potencial inhibitorio y permitiría una mayor liberación de dopamina (Covey et al., 2017). Finalmente, las MSN del núcleo accumbens también se proyectan a diferentes regiones cerebrales dependiendo de la subpoblación estimulada. Las MSN-D1 se proyectan nuevamente hacia el área tegmental ventral, hacia sustancia nigra y núcleo pálido ventral, mientras que las MSN-D2 se proyectan únicamente hacia núcleo pálido ventral (Smith et al., 2013).

2.1.5. Neurotransmisión dopaminérgica

La dopamina es un neurotransmisor monoaminérgico sintetizado en axones y dendritas de neuronas dopaminérgicas. Su síntesis parte de la L-fenilalanina, la cual es transformada en L-tirosina por la enzima fenilalanina hidroxilasa. Luego, la enzima tiroxina hidroxilasa se encarga de convertir la L-tirosina en L-DOPA. Finalmente, L-DOPA pasa a ser dopamina por acción de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC). La dopamina sintetizada es almacenada en vesículas sinápticas por medio de los transportadores de monoamina vesicular 2 (VMAT2). Estas vesículas permiten la conservación y posterior liberación calcio-dependiente de la dopamina en el compartimento axonal y somatodendrítico (Meiser, Weindl, & Hiller, 2013). Las regiones cerebrales en donde se concentra la mayor cantidad de neuronas dopaminérgicas son la sustancia nigra y área tegmental ventral, y en un menor grado el campo retrorubral, bulbo olfatorio y diversos núcleos hipotalámicos (A11-A15).

Las neuronas dopaminérgicas, a diferencia de las glutamatérgicas y GABAérgicas, liberan dopamina de manera regular de forma tónica (2-4 Hz) o fásica (15-30 Hz) dependiendo de la región cerebral. La despolarización de la

membrana de la neurona dopaminérgica conlleva a la apertura de canales de calcio tipo L (dependiente de voltaje). La entrada de calcio permite la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana celular y con ello la liberación de dopamina en el sitio sináptico o en el espacio extracelular (Yu, Tucker, Levitan, Shepard, & Canavier, 2014). Las principales proyecciones dopaminérgicas inervan tanto núcleo estriado dorsal como ventral, además de regiones corticales y subcorticales del sistema límbico. Estas regiones, lógicamente, expresan gran abundancia de receptores dopaminérgicos.

2.1.6. Receptores dopaminérgicos

La dopamina liberada interactúa con los receptores dopaminérgicos presentes en las neuronas postsinápticas y presinápticas (autoreceptores). Los receptores dopaminérgicos son una familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR), de los cuales se han descrito 5 receptores que son nombrados numéricamente desde el receptor dopaminérgico 1 hasta el 5 (DR1 - DR5). Asimismo, dependiendo del efecto metabotrópico producido, estos receptores se subclasifican en receptores dopaminérgicos tipo 1 (DR1 y DR5) y receptores dopaminérgicos tipo 2 (DR2, DR3 y DR4) (Martel & Gatti McArthur, 2020). Neve et al. (2004) publicaron una revisión sobre la señalización dopaminérgica la cual se recomienda para una profundización más extensa del tema (Neve, Seamans, & Trantham-Davidson, 2004).

2.1.6.1. Receptores dopaminérgicos tipo 1

Los receptores dopaminérgicos tipo 1 (DR1 y DR5) son GPCR que tienen una acción predominantemente excitatoria gracias a la acción de su subunidad

$G\alpha_{s/olf}$. La subunidad $G\alpha_{s/olf}$ interactúa con la adenilato ciclasa y estimula su actividad enzimática (Tesmer, Sunahara, Gilman, & Sprang, 1997). La adenilato ciclasa transforma la adenosina trifosfato (ATP) en adenosina monofosfato cíclica (cAMP). El cAMP interactúa con la proteinquinasa A (PKA) y habilita sus propiedades catalíticas las cuales dan inicio a diversas reacciones enzimáticas. Uno de los sustratos más importantes de PKA es DARPP-32 (fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP de 32 kDA), la cual, al ser fosforilada en Thr75 por PKA, promueve la inhibición de la fosfatasa 1. Como se explicará más adelante, es el incremento de PKA y de DARPP-32 el principal, pero no exclusivo responsable del incremento de la excitabilidad producto de la activación de los receptores dopaminérgicos tipo 1 (Ver **Figura 4**).

Se especula que la activación de DR1 y la posterior cascada PKA-DARPP-32 reduce la corriente iónica en los canales de potasio dependientes de voltaje y canales rectificadores de potasio, los cuales que evita que estos puedan estabilizar el potencial de membrana de la neurona (Peleg, Varon, Ivanina, Dessauer, & Dascal, 2002; Touhara & MacKinnon, 2018). Asimismo, esta misma cascada también incrementa la conductancia de los canales de calcio tipo L y reduce la de los canales de calcio tipo N- y P/Q-, lo que promueve la despolarización de la membrana (Peleg et al., 2002).

La activación de receptores dopaminérgicos tipo 1 también influyen en la regulación de receptores glutamatérgicos. Los receptores AMPA y MNDA incrementan su respuesta a agonistas mediante la interacción con el receptor DR1 a través de vías CREB y fosforilación dependiente de PKA-DARPP-32 (Flores-Hernández et al., 2002).

El efecto que tienen los DR1 sobre la regulación de los receptores GABA es variada debido a que estos últimos están conformados por diferentes unidades α , β y γ las cuales responden de manera distinta a la acción de las proteinquinasas. En general se ha observado que en el estriado ventral la acción de DR1 tiende a reducir las corrientes de los receptores GABA a través de la vía PKA/DARPP-32/PP1 (Flores-Hernandez et al., 2000).

Finalmente, los receptores DR1 también pueden propiciar cambios a nivel génico mediante la activación de factores de transcripción como CREB (del inglés *cyclic AMP response element-binding protein*) y MAP quinasas (quinasa de proteína activada por mitógeno) como ERK, p38 y JNK, todas dependientes de cAMP (C. H. Gerfen, Miyachi, Paletzki, & Brown, 2002; Zhen, Uryu, Wang, & Friedman, 1998).

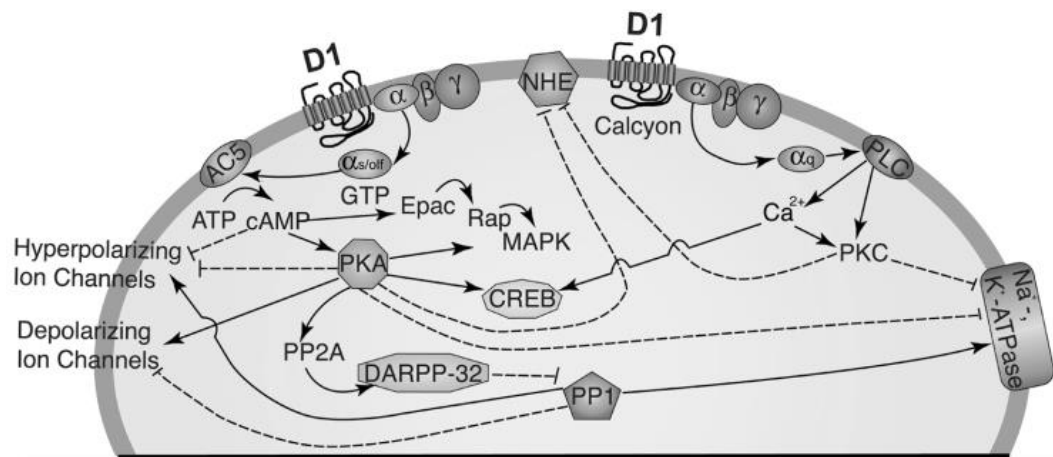


Figura 4. Cascada de señalización producto de la activación de receptores dopaminérgico DR1. Imagen extraída del artículo publicado por Neve et al. (2004).

2.1.6.2. Receptores dopaminérgicos tipo 2

Los receptores dopaminérgicos tipo 2 (DR2, DR3 y DR4), a diferencia de los de tipo 1, presentan en su estructura una subunidad $G\alpha_{i/o}$. Esta subunidad, en

conjunto con $G_{\beta\gamma}$ son las responsables del efecto predominantemente inhibitorio de este receptor.

La subunidad $G_{\alpha_{i/o}}$ actúa de manera contraria a $G_{\alpha_{s/olf}}$ de DR1, inhibiendo a la adenilato ciclasa. Para ello, se une al dominio citosólico C1 de la adenilato ciclasa y reduce su capacidad enzimática, reduciendo como consecuencia la activación de PKA y la fosforilación de todos sus sustratos secundarios como el DARPP-32 (Dessauer, Chen-Goodspeed, & Chen, 2002). Esto en principio produce un efecto opuesto al resultado de la activación de los receptores DR1 (Ver **Figura 5**).

Adicionalmente, los receptores DR2 presenta una subunidad $G_{\beta\gamma}$ es responsable de muchos de los efectos observados tras la activación del receptor. La activación de DR2 libera la subunidad $G_{\beta\gamma}$, activando los canales rectificadores de potasio (GIRK) (Peleg et al., 2002), propiciando la estabilización del potencial de membrana y reduciendo la excitabilidad neuronal. Este efecto sobre los GIRK se observa tanto en neuronas dopaminérgicas (como mecanismo de autorregulación) como en neuronas del estriado ventral que expresan DR2.

Asimismo, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ reduce la actividad de los receptores de calcio dependientes de voltaje. Esta actividad inhibitoria se da mediante la unión con el extremo COOH terminal y/o la región de unión I-II de los canales de calcio y la reducción de la corriente de iones por el canal (Qin, Platano, Olcese, Stefani, & Birnbaumer, 1997). La reducción de actividad de canales de calcio da como consecuencia la reducción de la excitabilidad neuronal.

Por otro lado, las cascadas de señalización de las MAP quinasas en general son estimuladas por acción de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ de los DR2. Dentro de las

principales vías de MAP quinasas estimuladas están Akt, ERK1/2 y SAPK/JNK. Todas estas vías de señalización están relacionadas principalmente a la síntesis de DNA y mitogénesis (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007).

Otra acción relevante de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ es la regulación de fosfolipasa C (PLC β 1). PLC β 1 moviliza las reservas de calcio mediante inositol trifosfato (Fisher, Jenkins, Tall, Burke, & Smrcka, 2020). Esta movilización de calcio activa la calcineurina y con ello reduce las corrientes de calcio de los canales de calcio tipo L.

La presencia de neuronas GABAérgicas (MSN) con los receptores DR1 y DR2 en una misma región como lo es el núcleo accumbens complica la interpretación del efecto la estimulación de estos receptores y el resultado morfológico o electrofisiológico final. Estas subpoblaciones neuronales reciben proyecciones de diferentes núcleos y que son estos núcleos los que se activan de diferente forma frente a diferentes estímulos estresores. Conocer qué núcleos se estimulan y cómo afectan a las neuronas del estriado ventral es clave para describir la génesis de trastornos como la depresión.

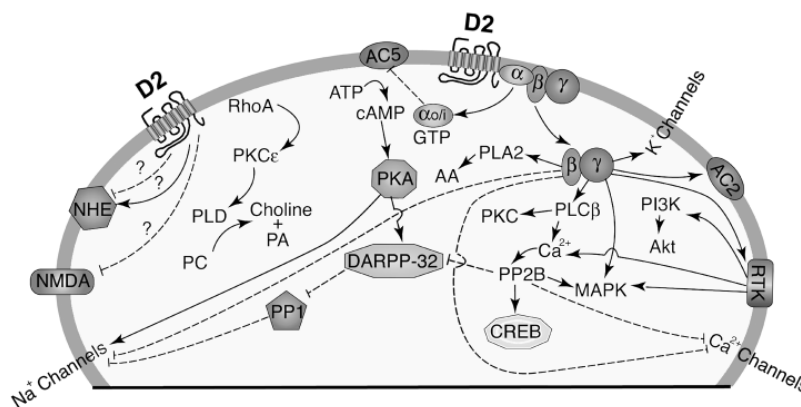


Figura 5. Castada de señalización producto de la activación de receptores dopaminérgico DR2. Imagen extraída del artículo publicado por Neve et al. (2004).

2.2.Planteamiento del problema de investigación

A la fecha existe evidencia preclínica de que los inhibidores de la enzima FAAH tienen la capacidad de reducir síntomas depresivos en modelos animales. MACOMCH-01 es un inhibidor FAAH encontrado en *Lepidium meyenii* que tiene estudios *in-vitro* y que lo posicionan como un potencial candidato con efecto antidepresivo. Sin embargo, aún no se han publicado estudios comportamentales *in-vivo* que comprueben este supuesto efecto antidepresivo en modelos animales. Adicional a ello, no se ha descrito el efecto que producen los inhibidores de FAAH en la señalización endocannabinoide y dopaminérgica a nivel molecular en la vía mesolímbica, que a la luz de la evidencia actual, se posiciona como un nodo conector importante en el desarrollo de la depresión.

2.3.Justificación del estudio

La depresión clínica es considerada uno de los trastornos con mayor impacto en la salud mental de las personas alrededor del mundo. Este impacto es exacerbado por el gran porcentaje de fallo terapéutico y recaídas de síntomas agudos en los pacientes. Esto se traduce en un incremento constante de la prevalencia del trastorno en la sociedad, ineficacia en el uso de recursos nacionales en el tratamiento y, en casos más extremos, incremento de tasa de mortalidad asociada al trastorno. Pese a que desde la década de los 60s se vienen desarrollando nuevas opciones terapéuticas a medida que se alcanza una mejor comprensión de la etiología del trastorno, es evidente que el tratamiento universal y efectivo de la depresión sigue siendo esquivo para los profesionales de la salud. Aún con todo lo mencionado

anteriormente, los intentos por comprender mejor las bases neurobiológicas de la depresión han dado luces sobre posibles alternativas para su tratamiento, basado en estudios a nivel pre-clinico. Una de estas alternativas, altamente promisorias basadas en la evidencia pre-clinica, es la enfocada en el sistema endocannabinoide. A través de este sistema se han propuesto fármacos novedosos que, si bien muchos aún se encuentran en fase de estudios preclínicos, tienen potencial como futuro tratamiento. Dentro de estas alternativas farmacológicas se encuentran aquellas que se encuentran en la naturaleza y forman parte del legado cultural regional. Este es el caso de la maca (*Lepidium meyenii*) el cual, por conocimiento popular y apoyada por evidencia científica, es propuesta como un antidepresivo natural. El presente estudio busca ir un paso más allá, al estudiar un compuesto semisintético presente en la maca como potencial antidepresivo (MACOMCH-01). Asimismo, se busca estudiar el efecto antidepresivo desde un punto de vista comportamental y molecular, dos aspectos muy importantes e interrelacionados que buscan dar un soporte lógico al posible efecto y mecanismo de acción. Este trabajo de investigación no solo tiene como intención aportar a los conocimientos generales sobre la etiología de depresión y mostrar evidencia sobre un potencial fármaco alternativo a los antidepresivos clásicos, sino que también busca exponer a la maca, raíz cultivada en la zona andina del Perú, y al conocimiento popular como fuente de referencia para posibles futuros estudios científicos en el campo de la neurociencia.

III. HIPÓTESIS

La administración intraperitoneal de MACOMCH-01, comparado con la administración de solución vehículo, reduce el comportamiento tipo depresivo en ratones BALB/c machos expuestos al modelo de estrés agudo

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

- Determinar el efecto de la administración intraperitoneal de MACOMCH-01 en el comportamiento tipo depresivo en ratones BALB/c.
- Determinar el efecto de la administración intraperitoneal de MACOMCH-01 en la expresión de genes relacionados a la neurotransmisión endocannabinoide y dopaminérgica en núcleo accumbens de ratones BALB/c.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antidepresivo de MACOMCH-01 mediante la prueba de nado forzado.
- Evaluar el efecto ansiogénico de MACOMCH-01 mediante la prueba de caja clara oscura y de campo abierto.
- Evaluar el efecto locomotor de MACOMCH-01 mediante la prueba de campo abierto.
- Evaluar el cambio en niveles de expresión de genes asociados a la neurotransmisión endocannabinoide en núcleo accumbens (*Napepld*, *Faah*, *Cnr1* y *Cnr2*).
- Evaluar el cambio en niveles de expresión de genes asociados a la neurotransmisión dopaminérgica en núcleo accumbens (*Drd1* y *Drd2*).

V. METODOLOGÍA

5.1. Animales

Se emplearon 97 ratones BALB/c machos de 2 meses de edad y con un peso entre 25 y 45 g. Se establecieron las condiciones de crianza y alimentación de los animales de experimentación con la finalidad de asegurar el cumplimiento de los requerimientos mínimos establecidos por la Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón (Fuentes Paredes, Mendoza Yanavilca, Rosales Fernández, & Cisneros Tarmeño, 2008) Los animales de experimentación fueron alojados en el bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco. Las condiciones ambientales de alojamiento en el bioterio para el mantenimiento de roedores fueron: humedad relativa de $45 \pm 10\%$, temperatura $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo diurno de 06:00h a 18:00h y ruido $< 85 \text{ dB}$. Además, el ambiente de estabulación contó con un sistema automatizado de ventilación soportada por filtros para proveer aire limpio y extraer el amoniaco residual de los roedores. El número mínimo y máximo de roedores por jaula fue de 4 y 5, respectivamente. Se proveyó de una dieta estándar para los roedores. Tanto la viruta como los alimentos administrados a los ratones fueron previamente esterilizados por método UV al menos un día previo a su uso.

5.2. Fármacos

Se empleó la macamida semisintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida (MACOMCH-01, de ahora en adelante abreviada como MCH), la cual fue sintetizada por MEDALCHEMY, S.L., San Vicente de Raspeig, Alicante, España (**Anexo 1**). Su estructura se presenta en la **Figura 6**.

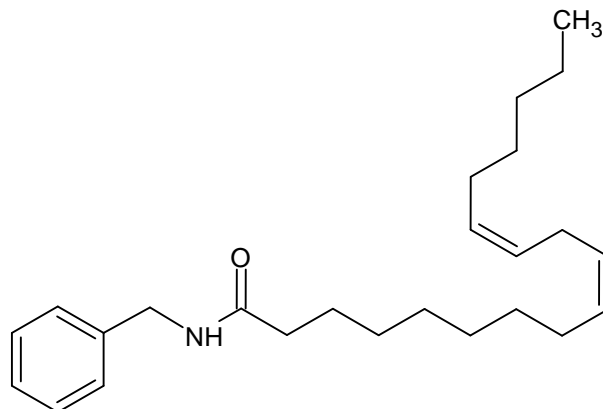


Figura 6. Estructura química de MACOMCH-01 (C₂₅H₃₉NO)

La fluoxetina clorhidrato fue adquirida de Sigma-Aldrich (**Anexo 1**). Todos los fármacos fueron disueltos en solución vehículo compuesto por 5% DMSO, 5% polietilenglicol 600 y 90% solución salina (NaCl 0.9%) y llevados a concentraciones requeridas por el estudio, el cual se detallará más adelante.

5.3. Diseño experimental

El trabajo de investigación se definió como un estudio experimental aleatorizado. Se evaluó el efecto de la administración de MCH en la regulación del comportamiento tipo depresivo y ansioso.

Para la evaluación del efecto antidepresivo se realizó la prueba de nado forzado. En ella se definió la creación de 5 grupos: Grupo vehículo, MCH 3 mg/kg, MCH 10 mg/kg, MCH 30 mg/kg y fluoxetina 20 mg/kg. El grupo vehículo constituyó el grupo control, mientras que los grupos MCH y fluoxetina fueron los experimentales (**Figura 7A**).

Para la evaluación del efecto ansiolítico se realizaron dos pruebas. La primera prueba fue la de caja clara oscura. En ella se definió la creación de 4 grupos: Grupo vehículo, MCH 10 mg/kg, MCH 30 mg/kg y midazolam 2mg/kg. El grupo

vehículo fue el grupo control, mientras que los grupos MCH y midazolam fueron los experimentales (**Figura 7B**). La segunda prueba fue la de campo abierto. En ella se definieron solo dos grupos experimentales: Grupo vehículo (control) y grupo MCH 10 mg/kg (grupo experimental con mejor efecto en la prueba de nado forzado) (**Figura 7C**).

Asimismo, para evaluar el efecto producido por la afección locomotora, se decidió emplear los resultados de la prueba de campo abierto mencionada en el párrafo anterior por lo que el diseño experimental es el mismo (**Figura 7C**).

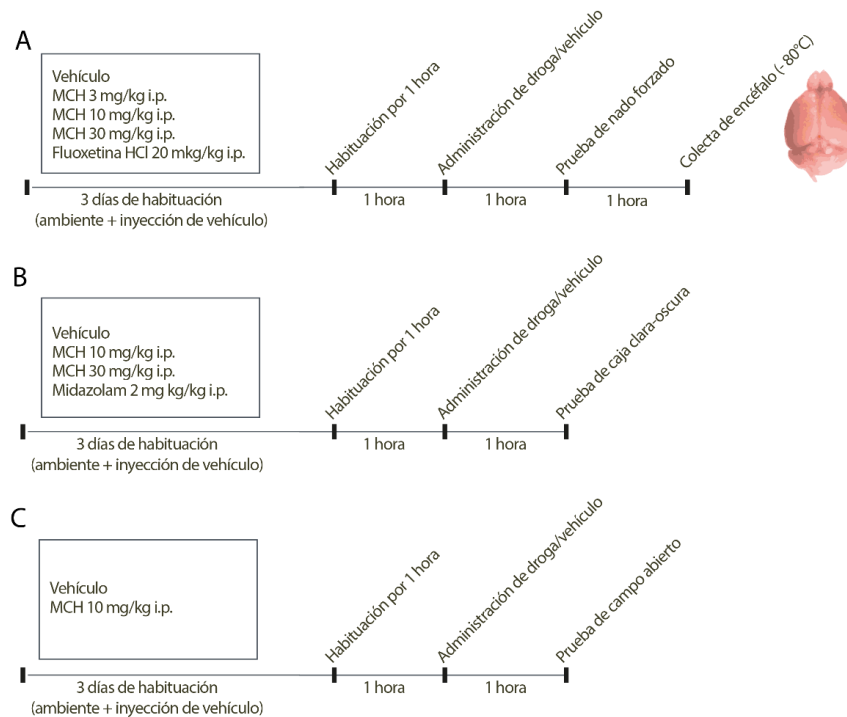


Figura 7. Diseño experimental de los tres experimentos para evaluación del efecto comportamental de MCH. **(A)** Evaluación de efecto antidepressivo en modelo de estrés agudo, **(B)** Evaluación de efecto ansiogénico con prueba de caja clara-oscuro y **(C)** Evaluación de efecto ansiogénico y locomotor con prueba de campo abierto.

Por último, se evaluó el efecto de MCH en la expresión génica relacionada a la vía endocannabinoide y dopaminérgica en el núcleo accumbens. Para ello se emplearon los encéfalos recolectados de los ratones que fueron sometidos a la

prueba de nado forzado. Se compararon los grupos experimentales que recibieron MCH y fluoxetina contra el grupo vehículo (Ver **Figura 8**).

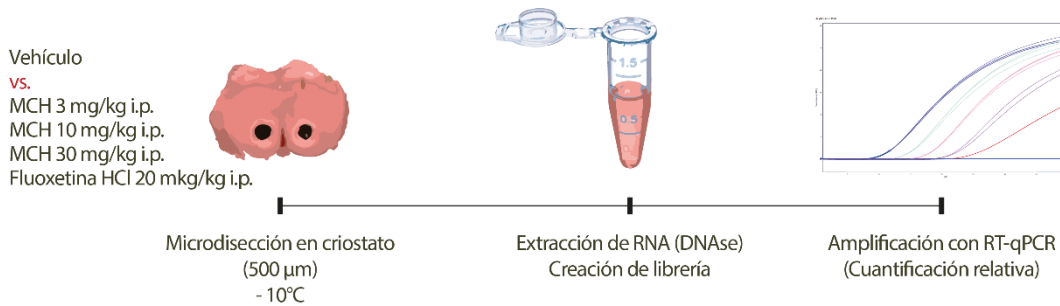


Figura 8. Esquema general del diseño experimental para el estudio del efecto antidepresivo de MCH

El desarrollo de las pruebas comportamentales se llevaron a cabo en el ambientes aislados dentro del Bioterio Automatizado y mientras que el análisis molecular, en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias de la Universidad Andina de Cusco.

5.4. Crianza de ratones

Se programó la reproducción de ratones BALB/c para obtener un número aproximado de 97 crías machos. Estas crías fueron pesadas y permutadas de nido para reducir las variables endógenas propias de cada camada. Luego de ello fueron dejadas al cuidado de la madre sustituta por 3 semanas. En la semana 4, cada camada fue trasladada a cajas separadas de la madre. En cada caja permanecieron entre 4-5 ratones. Se les proporcionó alimento para ratón y agua estéril *ad libitum* hasta los 2 meses de edad.

5.5. Creación de grupos experimentales

Luego de que los ratones hayan alcanzado 2 meses de edad, cada caja fue asignada de manera aleatoria a una de las tres pruebas comportamentales a realizarse (58 ratones para la prueba de nado forzado, 20 para la prueba de caja clara

oscura y 19 para la prueba de campo abierto, ver **Figura 7**). Acto seguido, todos los ratones fueron asignados a un grupo experimental dependiendo de la prueba comportamental (ver detalles en la sección de cada prueba comportamental). A continuación, se designó una identificación única a cada ratón mediante el cardex y pintado de cola. Se realizó el pesado de cada ratón para con ello calcular el volumen de vehículo o droga a administrarse (**Anexo 2**).

5.6. Evaluación comportamental

5.6.1. Habitación

Todos los ratones de los grupos experimentales pasaron por un periodo de habitación de 3 días para acostumbrarlos al ambiente, manipulación y administración intraperitoneal previa prueba comportamental. Este periodo consistió en llevar las cajas con los ratones al área de evaluación comportamental todos los días a la misma hora (11:00h) por una duración de una hora. Después, todos los ratones recibieron la administración intraperitoneal de vehículo cada día después de la hora de habitación (12:00h). Se proporcionó alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron las condiciones de temperatura y humedad similares al área de estabulación. Cada día, durante el periodo de habitación, se realizó una evaluación visual del estado de los ratones y se anotó cualquier observación con respecto al pelaje o presencia de anomalías.

5.6.2. Administración de drogas

El cuarto día se realizó la habitación correspondiente por una hora, pero no se administró vehículo. Las drogas o vehículo se administraron luego de la habitación por una hora en el área de evaluación comportamental. Se administró

la cantidad de droga o vehículo correspondiente a cada ratón dependiendo del peso corporal. El volumen máximo de solución vehículo o droga fue de 0.01 mL por cada gramo de peso corporal de ratón. La droga así como la dosis administrada se detalla en las secciones correspondientes a las pruebas comportamentales (**Anexo 2**). La administración intraperitoneal se realizó en el flanco izquierdo del abdomen del ratón. Luego de la administración intraperitoneal, los ratones fueron retornados a sus jaulas (aún en el área de evaluación comportamental) para su descanso por una hora.

5.6.3. Prueba de nado forzado

Esta prueba se realizó para evaluar el fenotipo depresivo de los ratones y el potencial efecto antidepresivo de MCH. Para ello se formaron cinco grupos experimentales los cuales recibieron solución vehículo (n = 12), MCH 3 mg/kg i.p. (n = 13), MCH 10 mg/kg i.p. (n = 14), MCH 30 mg/kg i.p. (n = 14) y fluoxetina 20 mg/kg i.p. (n = 5). Brevemente, se preparó un cilindro de plexiglass de 25 cm de diámetro y 49 cm de altura y se llenó con agua a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta una altura de 20 cm sobre la base. Se colocó un fondo de color negro detrás del cilindro para que contraste con el color blanco de los ratones. Luego de montado el aparato y la cámara de grabación, se colocó la etiqueta correspondiente a la identificación de cada ratón en un lugar visible. La prueba comportamental inició colocando lentamente al ratón dentro del cilindro, evitando que su cabeza sea sumergida durante el proceso. Se procedió a grabar la actividad del ratón dentro del cilindro por 6 minutos. Luego del periodo de 6 minutos, el ratón fue retirado lentamente del aparato y colocado sobre toallas para que pueda secarse más rápidamente. Finalmente fue retornado a su caja para que descanse por una hora.

Se registró el tiempo de latencia para la primera inmovilidad y la duración acumulada de inmovilidad de los últimos 4 minutos dentro del aparato. El análisis de las variables comportamentales observadas en las grabaciones se realizó mediante el software Ethovision XT versión 15 (Ver **Figura 9**)

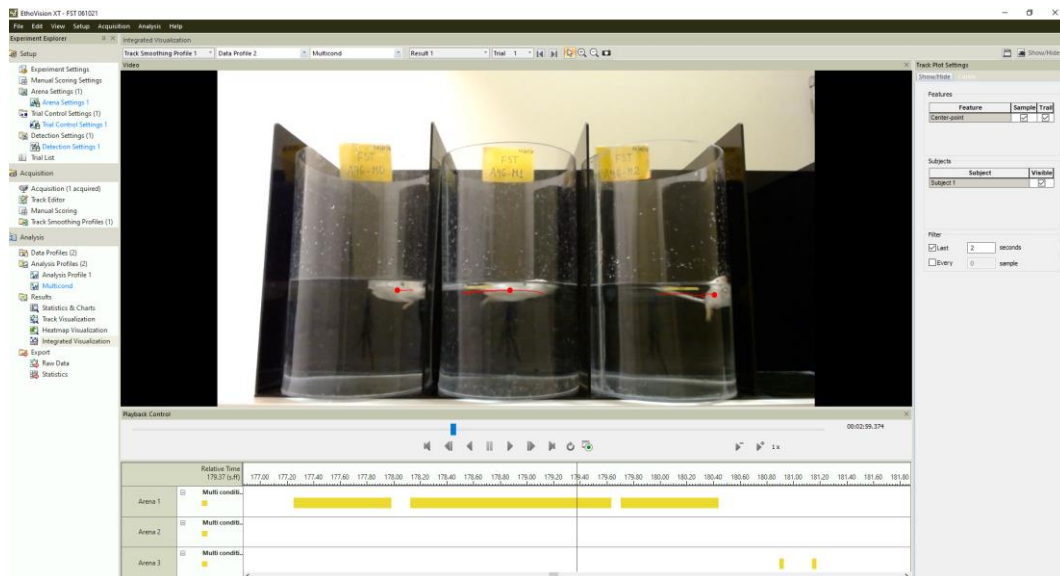


Figura 9. Interfaz del software Ethovision XT versión 15 para el análisis comportamental en la prueba de nado forzado.

5.6.4. Prueba de caja clara-oscuro

Esta prueba se realizó para evaluar el potencial efecto ansiogénico de MCH. Para ello se formaron cuatro grupos experimentales los cuales recibieron solución vehículo (n = 4), MCH 10 mg/kg i.p. (n = 5), MCH 30 mg/kg i.p. (n = 6) y midazolam 2 mg/kg i.p. (n = 5). Brevemente, se acondicionó un aparato bicameral de plexiglass. Una cámara era transparente mientras que la otra era opaca (negro), las cuales estarán intercomunicadas por un pasaje. Las dimensiones del aparato fueron de 20 x 20 x 20 cm por cámara clara y oscura y 4.6 cm para el pasaje intercameral. Luego de montado el aparato y la cámara de grabación, se colocó la

etiqueta correspondiente a la identificación de cada ratón en un lugar visible. La prueba comportamental se inició colocando al ratón dentro de la cámara transparente y se registró su actividad y transiciones entre la caja clara y la oscura por 5 minutos. Luego de este periodo, el ratón es retornado a su caja. Se registró el número de transiciones entre cajas, el tiempo de latencia de entrada a la cámara oscura y la duración acumulada en la cámara transparente. El análisis de las variables comportamentales observadas en las grabaciones se realizó de manera manual usando un registro físico y un cronómetro (Ver **Figura 10**)

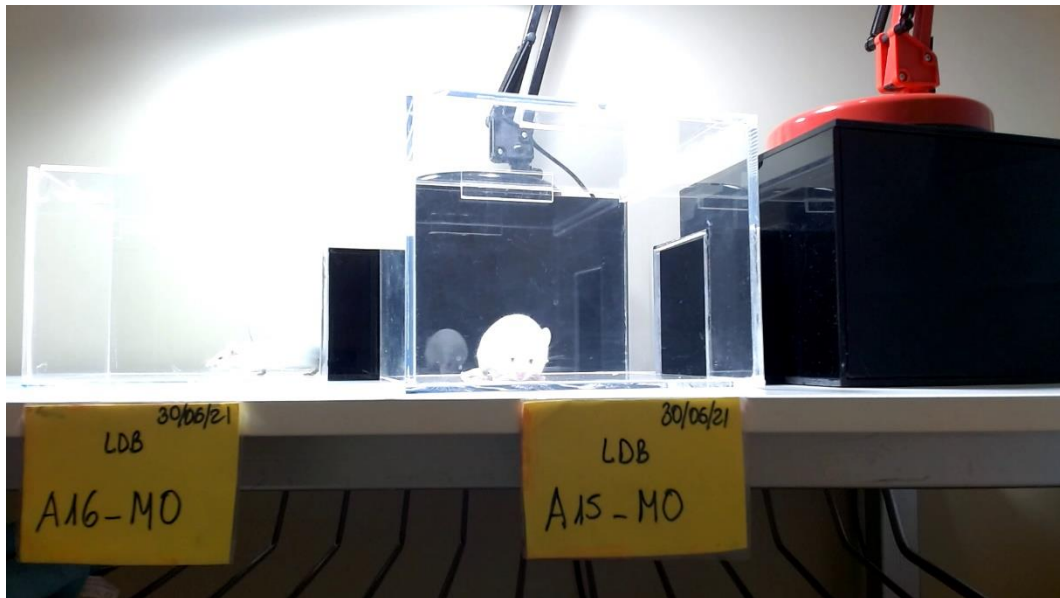


Figura 10. Muestra de registro audiovisual de la prueba de caja clara oscura.

5.6.5. Prueba de campo abierto

Esta prueba se realizó para evaluar tanto el efecto locomotor producto de la administración de la droga, como el efecto ansiolítico. Para ello se formaron dos grupos experimentales los cuales recibieron solución vehículo (n = 10) y MCH 10 mg/kg i.p. (n = 9). Brevemente y luego del acondicionamiento, se colocó al ratón en una plataforma de 40 cm x 40 cm de color gris mate y paredes de 50 cm. La cámara se ubicó a aproximadamente 70 cm de la plataforma hacia arriba. Se inició la grabación y se registró la actividad del ratón por 10 minutos. Luego de la grabación, el ratón es retirado de la plataforma y devuelto a su caja. La plataforma es limpiada con alcohol y papel. Luego del registro de actividad de todos los ratones, los videos fueron analizados usando el software EthoVision XT versión 15 (Ver **Figura 11**). Para la evaluación locomotriz se cuantificó la distancia total recorrida en la plataforma y el tiempo acumulado de inmovilidad. Para la evaluación de efecto ansiolítico se evaluó el número de ingresos a la zona central y el tiempo acumulado de permanencia en la zona central.

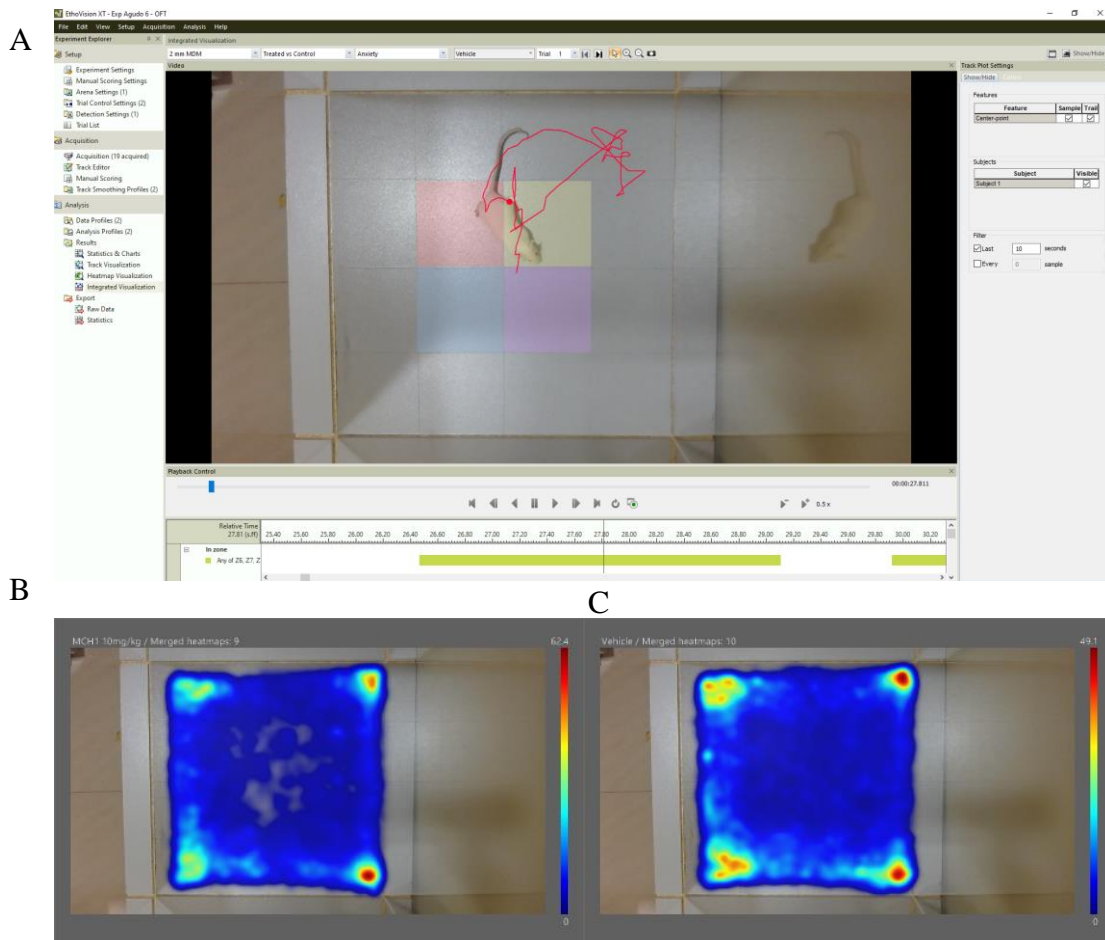


Figura 11. (A) Interfaz del software Ethovision XT versión 15 para el análisis comportamental en la prueba de campo abierto. Mapa de calor promediado de posicionamiento de ratones del grupo MCH 10mg/kg i.p. (B) y grupo vehículo (C).

5.8. Análisis molecular

5.8.1. Diseño experimental del análisis molecular

Para el diseño experimental se definieron 5 grupos experimentales los cuales estaban conformados por encéfalos de ratones que habían sido evaluados en la prueba de nado forzado: Grupo vehículo (n=5), MCH 3 mg/kg (n=5), MCH 10 mg/kg (n = 5), MCH 30 mg/kg (n = 5) y Fluoxetina 20 mg/kg (n = 5).

5.8.2. Muestra

5.8.2.1. Descripción y procesamiento de muestra

Las muestras extraídas fueron microdisecciones de núcleo accumbens (zona central o *core*) de encéfalo de ratón. Las muestras se caracterizaron por ser sólidas, de aproximadamente 1 mg de peso. El procesamiento de las muestras estuvo comprendido desde la eutanasia de los ratones hasta la microdisección del núcleo accumbens.

5.8.2.2. Eutanasia de animales

Luego de una hora de la aplicación de las pruebas comportamentales (aproximadamente a las 13:00h), los animales fueron sacrificados para la obtención de encéfalos enteros. Para ello, todos estos fueron anestesiados con la finalidad de disminuir el sufrimiento. El anestésico empleado fue xilacina, un conocido anestésico de uso veterinario con propiedades sedativas, anestésicas, miorelajantes y analgésicas. La dosis de xilacina administrada fue 50 mg/kg i.p. Luego de la sedación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Acto seguido, se cortó la cabeza usando tijeras quirúrgicas.

5.8.2.3.Extracción y conservación de encéfalos

El procedimiento de extracción de encéfalos tuvo una duración máxima de 3 minutos por encéfalo para evitar degradación de material genético. La cabeza de los ratones fue colocada en una superficie sobre hielo. Usando tijeras quirúrgicas estériles, se abrió el cráneo del ratón. Con ayuda de una espátula estéril se extrajo el encéfalo del ratón, conservando el bulbo olfatorio y el cerebelo con parte del bulbo raquídeo. Acto seguido se colocó de manera vertical sobre una superficie de metal estéril con hielo seco a aproximadamente -80°C . Esto permitió el congelamiento inmediato de los encéfalos (aproximadamente 2 minutos). Luego de que el encéfalo esté completamente congelado, este fue colocado en papel aluminio estéril. Cada papel aluminio estuvo rotulado con la identificación del ratón, el grupo experimental, la fecha de disección y el nombre del experimento. Luego de extraer todos los encéfalos, estos fueron almacenados en un ultracongelador vertical a -80°C (Modelo 6485, Lauda-GFL) hasta su posterior análisis molecular.

5.8.2.4.Cortes en frío de encéfalos

Con la finalidad de realizar micropunches de las regiones subcortiales de interés, se realizaron cortes en frío del encéfalo. Para ello se trasladaron rápidamente las muestras desde el ultracongelador al criostato (CM 1520, Leica) a -10°C . Los encéfalos enteros fueron fijados verticalmente sobre una plataforma circular con ayuda de un medio congelante de tejido (Tissue Freezing Medium, Leica). Los encéfalos fijados fueron dejados en reposo por al menos 10 minutos para el acondicionamiento de la temperatura. Luego de la solidificación del medio congelante, se montó la plataforma con el encéfalo en el criostato y se realizaron cortes de $20\ \mu\text{m}$ desde el bulbo olfatorio. Esto permitió avanzar lenta y

controladamente a través del encéfalo hasta encontrar las marcas anatómicas o *landmarks* que identificaron el inicio del núcleo accumbens. Se definieron como landmarks la desaparición de la fisura rinal, aparición de putamen y comisura anterior (ver **Figura 12**). Una vez llegada a la zona de interés, se configuró el criostato para que realice un corte de 500 μm . Se colocó la hoja de corte sobre el encéfalo y se realizó el corte a ritmo constante y firme para evitar la ruptura del tejido. Este corte fue montado sobre una lámina gelatinizada etiquetada apropiadamente (ID del animal, fecha y grupo experimental). Se llevó un registro manual de los cortes y su ubicación en las láminas correspondientes. Este proceso se repitió hasta colectar todos los cortes de 500 μm que todos los encéfalos. Una vez obtenidos todos los cortes, las láminas fueron colocadas en un portaláminas y guardados a -80°C en el ultracongelador.

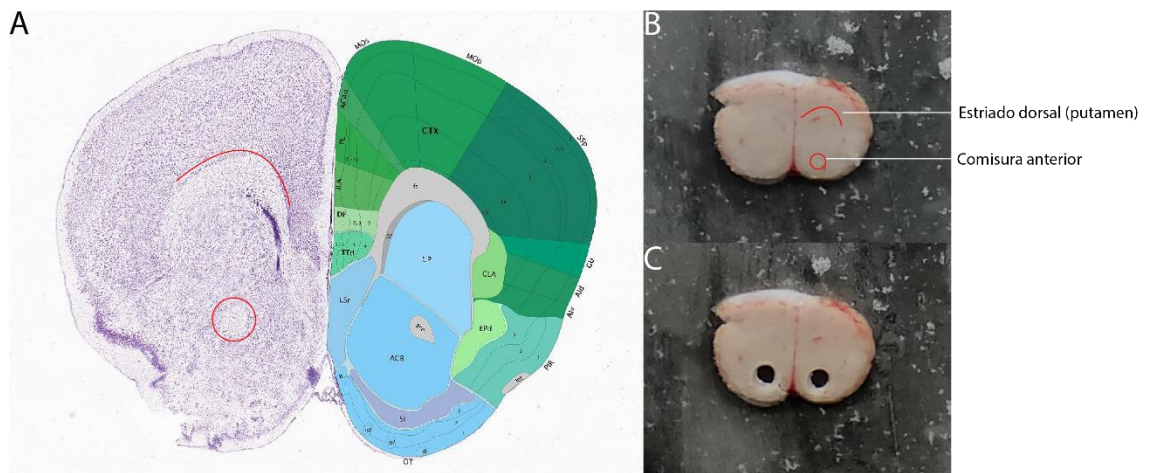


Figura 12. (A) Fotografía de tinción Nissl y representación regional de corte coronal de encéfalo de ratón obtenido del Allen Mouse Brain Atlas (Lein et al., 2007). Fotografías de corte coronal de 500 μm encéfalo de ratón antes (B) y después (C) de la microdissección a -20°C .

5.8.2.5. Microdissección de núcleo accumbens

Con el fin de conservar adecuadamente el material genético durante todo el experimento se trabajó desde la microdissección hasta la transcripción reversa el mismo día. Las microdissecciones se realizaron en el criostato. Brevemente, se colocó la lámina con el tejido cortado en el criostato a -20°C . Asimismo, se colocó un microdisector con punta de 1 mm de diámetro (EMS Aluminum Punch Kit, Electron Microscopy Science) y un tubo de 1.5mL libre de nucleasas previamente rotulado dentro del criostato por 15 minutos para que la temperatura sea la misma que la del tejido. Luego, se identificó la lámina con el código del ratón y el núcleo a disecar (núcleo accumbens). Usando el microdisector, se realizó una disección circular de 1mm de diámetro en núcleo accumbens procurando extraer únicamente el segmento perteneciente a la zona central (excluyendo la corteza) (ver **Figura 12**). Acto seguido se colocó el tejido en el tubo de 1.5mL correspondiente a la muestra y se llevó al área de biología molecular para el procedimiento de extracción de RNA.

5.8.3. Extracción de ácidos nucleicos (RNA)

Para la extracción de RNA de las muestras de microdissecciones se empleó la metodología TRIzol™ con modificaciones. Brevemente, se preparó una caja de poliestireno expandido (tecnopor) con hielo en donde se colocó el tubo de 1.5mL con la muestra diseccionada. Se agregó 200 μL de Mammalian Lysis Buffer (**Anexo 3**) y 2 μL de inhibidor de ribonucleasas (RiboLock RNase inhibitor, Thermo Fischer) y se homogenizó empleando una jeringa de 1mL. Luego se agregó 300 μL de reactivo TRIzol™ (Invitrogen), se agitó fuertemente por 15 segundos y se dejó reposar el tubo a temperatura ambiente por 5 minutos. Acto seguido se agregó 200

μL de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se dejó reposar por 3 minutos. Se centrifugó a 12000RPM, 4°C por 15 minutos y con ayuda de una micropipeta de 20-200 μL , se trasvasó el sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL libre de nucleasas, el cual fue colocado en el tecnopor con hielo. En el nuevo tubo se agregó nuevamente 200 μL de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se centrifugó a 12000RPM, 4°C por 5 minutos. Luego, con ayuda de una micropipeta de 20-200 μL , se trasvasó el sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL libre de nucleasas. Se agregó al tubo 500 μL de isopropanol grado molecular y 3.5 μL de coprecipitante (GlycoBlueTM Blue Coprecipitant, Invitrogen) y se dejó reposar a -20°C por 30 minutos. Luego, se retiró el tubo del refrigerador y se centrifugó a 12000RPM, 4°C por 15 minutos. Se observó la presencia de precipitado de color azul al fondo del tubo y cuidadosamente se eliminó el isopropanol inclinando el tubo, evitando de que el precipitado se desprenda. Se agregó 1000 μL de etanol grado molecular al 75%, se agitó el tubo en un vortex por 15 segundos y luego se centrifugó a 7500 RPM, 4°C por 5 minutos. Nuevamente se eliminó cuidadosamente el solvente evitando de que se desprenda el precipitado y se volvió a agregar 1000 μL de etanol grado molecular al 75%. Se agitó en un vortex por 15 segundos y luego se centrifugó a 7500 RPM, 4°C por 5 minutos. Para el paso final, se eliminó el solvente y se centrifugó usando un spinner para asentar las últimas gotas de etanol. Se eliminaron dichas gotas extrayéndolas con una micropipeta de 1-10 μL y luego se agregó 11 μL de agua tratada con dietilpolicarbonato (de ahora en adelante referida como “agua DEPC”, ver **Anexo 3**). Se agitó el tubo por 15 segundos en el vortex para disolver el precipitado y llevó a un termobloque a 65°C por 5 minutos para eliminar las estructuras secundarias de RNA previa cuantificación. Se volvió a agitar en el

vortex y centrifugar en el spinner. Por último, se colocó el tubo en hielo hasta su cuantificación.

5.8.3.1. Cuantificación de contenido y pureza de RNA

La cuantificación de RNA se realizó empleando el método espectrofotométrico (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Primero, se configuró el equipo a modo lectura de RNA y se usó 1 μL agua DEPC para registrar la línea base. Luego se colocó 1 μL de muestra de RNA en el pedestal y midió la absorbancia en el rango de 200 a 600 nm. Se registró el espectro UV, la cantidad estimada en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y los ratios 280/260 y 230/260 que son indicativos de presencia de impurezas proteicas y minerales, respectivamente (**Anexo 4**). Se definió como una muestra aceptable a toda aquella que mostrara concentraciones superiores a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y con un ratio 280/260 mayor a 1.8.

5.8.3.2. Integridad de RNA

Debido a que la cantidad de RNA extraído de microdisecciones es muy pequeño, no se pudo realizar la prueba de integridad de RNA a cada una de las muestras. En este escenario, se realizaron pruebas de integridad de RNA piloto para confirmar que el método, siendo realizado correctamente, podía conservar la integridad del material genético. Para ello se empleó el método electroforético. Brevemente, se preparó un gel de agarosa a una concentración de 1% con buffer TBE en agua DEPC (**Anexo 3**). En un tubo de 100 μL se mezclaron los 10 μL de RNA extraído y 6 μL de colorante para electroforesis. Luego, se cargaron los 16 μL en los pozos del gel y se encendió la fuente de poder a un voltaje de 80 V. Se dejó migrar el material por aproximadamente 30 minutos, hasta que los colorantes

se hayan separado y hayan migrado dos tercios del gel. Luego se apagó la fuente de poder y se trasladó el gel a la cámara UV del transiluminador. Se evaluó la presencia de bandas correspondientes al RNA 28S, 18S y 5.8S, además de la ausencia de *smear*, indicativo de degradación de RNA. Los resultados de esta prueba se observan en el **Anexo 5**.

5.8.3.3.Tratamiento con DNasa

El procedimiento de limpieza y eliminación de contaminación con DNA genómico se realizó mediante el tratamiento con DNasa (TURBO DNA-free™ kit, Invitrogen). Brevemente, se trasladaron los 10 µL de RNA extraído a un tubo de 100 µL libre de nucleasas. Se agregaron 2 µL de 10X TURBO DNase Buffer , 6 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de la enzima TURBO DNase (2 U/µL) y se llevó a 37°C por media hora. Luego, se agregó 1 µL de TURBO DNase (2 U/µL) adicional, completándose el volumen de 20 µL de reacción y se llevó a 37°C por otra media hora más. Luego de la incubación, se realizó la inactivación de la DNasa agregando 5 µL de resina inactivadora y se incubó a 26°C agitando constantemente con el vortex por 5 minutos. Luego, se centrifugó a 10000RPM, 4°C por 90 segundos y se trasvasó el contenido acuoso a un tubo de 200 µL RNase-free cuidando que no se traslade la resina inactivadora. Se usó 1 µL de la muestra para volver a leer la concentración de RNA mediante el método espectrofotométrico descrito en **5.8.3.1 Cuantificación de RNA**

5.8.3.4.Evaluación de contaminación (DNA genómico)

Antes de realizar la retrotranscripción, fue necesario confirmar que todo el DNA genómico fue removido. Para ello se empleó la técnica de PCR de punto final

usando el termociclador Amplitronyx™ 6 (NYX Technik) y el kit de reactivos DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific). Las muestras obtenidas por microdissección genera una cantidad muy pequeña de RNA, por lo que la confirmación no se pudo realizar en todas las muestras. En su lugar, se realizó la estandarización del método empleando RNA extraído con la misma metodología pero de otras estructuras. Una vez estandarizado el método de limpieza de DNA y comprobado mediante PCR confirmatoria, ya no fue necesaria hacer una confirmación de cada muestra. Brevemente, el protocolo de PCR confirmatoria consistió en colocar en un tubo de 100 µL un volumen suficiente equivalente a 50 ng de RNA, 2 µL de 10X DreamTaq buffer, 2 µL de mezcla de dNTPs 2mM, 2 µL de primer *Faah* For/Rev de 2 µM (ver **5.8.5.2 Oligonucleótidos diseñados para qPCR**), 0.5 µL de DreamTaq Polymerase (5 U/µL) y cantidad suficiente de agua DEPC para completar 20 µL de volumen de reacción. Se llevó el tubo al termociclador y se inició el ciclado de amplificación. El programa de amplificación se detalla en la **Tabla 3**. Al finalizar, la reacción fue analizada mediante electroforesis con gel agarosa al 2% (**Anexo 3**). Junto a la muestra también se corrió agua DEPC (control negativo), DNA genómico (control positivo) y RNA sin tratar con DNasa (control positivo). La ausencia de amplificación en el carril del RNA tratado con DNasa confirmó la ausencia de DNA genómico. Los resultados de esta prueba se observan en el **Anexo 6**.

Tabla 3. Programa de termociclador para PCR de confirmación de ausencia de DNA genómico

Fase	Temperatura (°C)	Duración (min)	# de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1:00	1
Desnaturalización	95	0:30	
Hibridización	65	0:30	40
Extensión	72	1:00	
Extensión final	72	5:00	1

5.8.4. Transcripción reversa

El proceso de transcripción reversa se realizó con un kit comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). La concentración de RNA retrotranscrito por muestra fue de 500 ng de RNA en un volumen final de 20 μ L. Para ello, por cada muestra, se trabajó en dos tubos de 100 μ L, todo en lecho de hielo. En el primer tubo se colocó suficiente volumen de muestra para tener 500 ng de RNA y se agregó agua DEPC en una cantidad suficiente para completar 10 μ L. En el segundo tubo se preparó la Master Mix, la cual estaba compuesta por 2 μ L de RT buffer 10X, 0.8 μ L de mezcla de dNTPs 25X, 2 μ L de Random Primers 10X, 1 μ L de transcriptasa reversa MultiScribeTM (50 U/ μ L) y 4.2 μ L de agua DEPC (se preparó una cantidad equivalente suficiente para todas las muestras a retrotranscribirse en ese día). Luego, se trasvasó 10 μ L de Master Mix (segundo tubo) a los 10 μ L del primer tubo (muestra con 500 ng RNA), completando un volumen final de 20 μ L (concentración final de cDNA de 25 ng/ μ L), se agitó en el vortex y se colocó en el termociclador de punto final. El programa del termociclador para la transcripción reversa se detalla en la **Tabla 4**. Luego de la retrotranscripción, las muestras se retiraron del termociclador y se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis por qPCR.

Tabla 4. Programa de termociclador para transcripción reversa de RNA de un solo ciclo

Fase	Temperatura (°C)	Duración (min)
Activación y annealing	25	10:00
Retrotranscripción	37	120:00
Desactivación de enzima	85	5:00
Conservación	4	∞

5.8.5. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

5.8.5.1. Información de genes blanco para qPCR

Los genes seleccionados para evaluar el efecto de la macamida en el sistema endocannabionide y dopaminérgico de ratón (*Mus musculus*) fueron *Cnr1*, *Cnr2*, *Faah*, *Napepld*, *Drd1*, *Drd2* y *18S*. La información de las secuencias genéticas para cada gen fue extraída de la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los datos extraídos para el diseño de primers se encuentran detallados en el **Anexo 7**.

5.8.5.2. Oligonucleótidos diseñados para qPCR

Los primers fueron diseñados con la finalidad de crear la librería de muestras empleando la metodología de transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET). La **Tabla 5** resume las especificaciones de cada primer diseñado. Los primers fueron sintetizados por la empresa Macrogen. El método de purificación fue MOPC. La secuencia de primers fue diseñada en el laboratorio, por lo que no cuenta con un número de identificación RTPrimerDB. Las especificaciones completas de cada primer se detalla en el **Anexo 8**.

Tabla 5. Secuencia de primers diseñados para el cálculo de eficiencia y creación de librería por metodología FRET

Gen	Secuencia	Localización
<i>Cnr1</i>	For: 5'-TACCTGGCTCTGTTTGG AATG-3'	MN_007726.5
	Rev: 5'-GGCAGAGATGTCATCAGAAGC-3'	MN_007726.5
<i>Cnr2</i>	For: 5'-TTCCTGAAGTTATGGGCACAC-3'	MN_009924.4
	Rev: 5'-GGGACCAGAAAAATTGAGAGC-3'	MN_009924.4
<i>Faah</i>	For: 5'-CCCAGCCAAATAAGTCTCCTC-3'	MN_010173.5
	Rev: 5'-TCACTCACCACAAGGGGTATC-3'	MN_010173.5
<i>Napepld</i>	For: 5'-CAGTCACAACCACTACGACCA-3'	MN_001359964.1
	Rev: 5'-GTCCAGCTCAATCACGTTCTC-3'	MN_001359964.1
<i>Drd1</i>	For: 5'-GTCATAGCCTGGACTGCAAAA-3'	MN_010076.3
	Rev: 5'-CTGCTTCCAAAGAACACCTTG-3'	MN_010076.3
<i>Drd2</i>	For: 5'-CCGCCACTTCTTGACATACAT-3'	MN_010077.3
	Rev: 5'-CCCAAGTTACCACCTCCA ACT-3'	MN_010077.3
<i>18S</i>	For: 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCCTT-3'	NR_003278.3
	Rev: 5'-TCGTTTATGGTCGGA ACTACG-3'	NR_003278.3

Para la cuantificación relativa se emplearon sondas de hidrólisis (sondas TaqMan). Estas sondas fueron sintetizadas y adquiridas de casa comercial Thermo Fisher Scientific, por lo que no se realizó un procedimiento de diseño de secuencia. Cada tubo adquirido contenía dos secuencias (forward y reverse) para detección del gen y el colorante FAM-MGB. Debido a que la casa comercial no revela la secuencia de las sondas de hidrólisis, esta información no pudo ser presentada en el presente informe. Sin embargo, información adicional y complementaria sobre las sondas se detalla en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Información de sondas TaqMan empleadas en el análisis qPCR

Gen	ID de ensayo TaqMan ®	Longitud de amplicón	Secuencia de referencia
<i>Cnr1</i>	Mm00432621_s1	69	MN_007726.3
<i>Cnr2</i>	Mm00438286_m1	91	AK037898.1
<i>Faah</i>	Mm00515684_m1	62	MN_010173.4
<i>Napepld</i>	Mm00724596_m1	85	MN_178728.5
<i>Drd1</i>	Mm01353211_m1	65	MN_010076.3
<i>Drd2</i>	Mm00438541_m1	71	MN_010077.2
<i>18S</i>	Mm03928990_g1	61	NR_003278.3

5.8.5.3.qPCR con sondas intercalantes (SYBR Green®)

Se empleó la metodología SYBR Green (Blastaq™ Green 2X qPCR MasterMix, Abm) para el cálculo de la eficiencia de amplificación y la elaboración de la librería. Cada muestra se analizó por duplicado empleando para ello 50 ng de cDNA. Antes de iniciar el análisis y por recomendación del fabricante se agregó 1 µL de colorante de referencia ROX al tubo de 1.25 mL de Green 2X qPCR MasterMix. Los componentes de la reacción y sus concentraciones se detallan en la **Tabla 7**. Tanto la composición del buffer (a excepción de la concentración de Mg⁺²) como la concentración exacta de la DNA polimerasa y colorante ROX son secreto comercial del fabricante, por lo que no se detallan en el presente informe.

Tabla 7. Componentes de la reacción de amplificación por qPCR con SYBR Green

Reactivo	Concentración	1X - Volumen (µL)
Blastaq™ DNA polimerasa (incluye MM* y ROX)	2X	5
Primer <i>18S</i> (For/Rev)	2 µM	1
H ₂ O DEPC	-	2
cDNA	25 ng/µL	2
Volumen total		10

*MM: Master Mix, el cual incluye dNTPs y buffer con 1.5 mM de Mg⁺²

Asimismo, se añadieron controles negativos sin muestra de cDNA (No template control, NTC) al experimento. Estos controles tenían la misma composición presentada en la **Tabla 7** con la excepción de que no tenían muestra de cDNA y el volumen de agua DEPC era de 4 μ L.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador AriaMX Real-Time qPCR System (Agilent). Se usaron los módulos ópticos FAM/SYBR (para detección de SYBR Green) y ROX (para detección del colorante de referencia ROX). El programa de temperaturas para la amplificación se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Programa de temperaturas para amplificación por qPCR con SYBR Green

Fase	Temperatura (°C)	Duración (min)
Hot Start	95	3:00
Amplificación (40 ciclos)	95	0:10
	60	00:15
Curva de melting* (Resolución: 0.5°C)	95	00:30
	65	00:30
	95	00:30

*Se registró la curva de melting de cada muestra para detectar posible formación de dímeros de primers.

Para la lectura de las muestras y los controles se usaron tubos con tapas incorporadas diseñados y fabricados con polipropileno transparente de paredes delgadas y con propiedades ópticas especialmente diseñadas para análisis qPCR (Axygen low profile 0.1 mL thin wall PCR strip tubes & real time strip caps, Merck).

5.8.5.4.Eficiencia de amplificación para genes *I8S* y *Faah*.

Los datos obtenidos del cálculo de eficiencia de amplificación es empleado en la elaboración de la librería, por lo que fue necesario realizarlo previamente. Se realizó el cálculo de la eficiencia empleando un gen normalizador (18) y un gen de interés (*Faah*). Para ello se utilizó cDNA proveniente de núcleo accumbens y el procedimiento descrito en **5.8.5.3. qPCR con sondas intercalantes (SYBR Green®)**.

La curva de eficiencia fue construida usando 5 niveles de concentración de cDNA (5×10^{-4} , 5×10^{-3} , 5×10^{-2} , 5×10^{-1} y 5×10^0 ng/ μ L) por triplicado. Para el caso del gen *I8S* hubo una excepción. Dado que este gen se expresaba de manera abundante en las muestras, se procedió a diluir todos los niveles de concentración con el factor de dilución 10^{-4} a fin de que estas puedan detectarse adecuadamente.

Empleando el software AriaMX (Agilent), se obtuvieron los siguientes datos: ciclo de cuantificación (Cq) de cada gen, coeficiente de correlación, pendiente de curva y eficiencia de amplificación. Asimismo, con ayuda de la curva de melting, se comprobó que no se formaron dímeros de primers. Para fines de la investigación se determinó que los límites máximos permitidos para el porcentaje de eficiencia de la curva es entre 90 y 110 %. Los datos completos del cálculo de la eficiencia de amplificación para *I8S* y *Faah* se detallan en el **Anexo 9**.

5.8.5.5.Creación de librería

La creación de la librería de muestras tuvo como finalidad estimar el grado de integridad del cDNA retrotranscrito en el paso anterior, asimismo también

igualar, mediante diluciones, las cantidades de RNA presente en cada muestra. Para ello se usó el gen de referencia *18S*.

Como se mencionó anteriormente, el transcrito del gen *18S* es muy abundante en el tejido extraído, por lo que necesitó una dilución previa con la que se pueda trabajar en el rango de linealidad de la curva de eficiencia. Todas las muestras de RNA extraído fueron diluidas con el factor 10^{-4} (se diluyó 1 μL de muestra RNA con 99 μL de agua DEPC, se mezcló y se tomó 1 μL de esta dilución y se volvió a diluir con 99 μL de agua DEPC).

Todas las diluciones fueron tratadas por duplicado siguiendo el mismo procedimiento descrito en **5.8.5.3. qPCR con sondas intercalantes (SYBR Green®)**. El cálculo de Cq se realizó usando el software AriaMX (Agilent), empleando el umbral de cuantificación determinado en la curva de eficiencia. En el hipotético caso de que el RNA hubiera conservado su integridad durante el proceso, se esperaría que todas las muestras (50 ng de RNA) tengan el mismo Cq. Sin embargo, la pérdida de integridad es un fenómeno previsible durante todo el proceso. En el presente estudio se determinó que los Cq del gen *18S* para las muestras de los 5 grupos experimentales estuvieron entre 14.4 y 17.4 (**Anexo 10**).

Para homogenizar el contenido de RNA en todas las muestras se calculó el factor de dilución de cada muestra. Se definió como Cq de referencia el 17.4 (muestra más diluida) y volumen final de dilución 40 μL . El cálculo del factor de dilución se realizó empleando la siguiente fórmula.

$$Fd = (\text{Amp})^{(\text{Cq Ref} - \text{Cq Muestra})}$$

Leyenda:

Fd = Factor de dilución por muestra

Amp = Valor de amplificación (Si % eficiencia = 94.4, Amp = 1.944)

Cq Ref = Cq de referencia (17.4)

Cq Muestra = Cq de cada muestra analizada

Luego de calcular el Fd, se calculó el volumen necesario de RNA por muestra a ser diluido. Para ello se empleó la siguiente fórmula.

$$\text{Vol. original} = \frac{\text{Vol. final}}{\text{Fd}}$$

Leyenda:

Vol. original = Volumen necesario de muestra original de RNA sin diluir

Vol. final = Volumen final al cual se diluirán las muestras.

Fd = Factor de dilución por muestra

Luego del cálculo, se homogenizó cada muestra tomando el volumen de RNA sin diluir, se trasvasó a un vial libre de nucleasas de 100 μL y se completó el volumen con agua DEPC hasta llegar a 40 μL . Luego, nuevamente se volvió a realizar una dilución con el factor 10^{-4} para un nuevo análisis del gen normalizador *18S* (se diluyó 1 μL de muestra RNA con 99 μL de agua DEPC, se mezcló y se tomó 1 μL de esta dilución y se volvió a diluir con 99 μL de agua DEPC).

Se volvió a analizar el gen 18S mediante el procedimiento **5.8.5.3. qPCR con sondas intercalantes (SYBR Green®)** con la finalidad de corroborar que las diluciones, en efecto, habían homogenizado las concentraciones de RNA. Para ello se definieron los siguientes criterios de aceptación:

Diferencia entre Cq de muestra diluida y Cq promedio menor a 1.

Diferencia de Cq entre repeticiones de muestra diluida menor a 1

Una vez que las muestras fueran diluidas y pasaran los criterios de aceptación, la librería había sido creada y los viales fueron nuevamente almacenados a -80°C hasta la posterior cuantificación relativa. Los datos de dilución y creación de librería se detallan en el **Anexo 10**.

5.8.5.6.qPCR con sondas de hidrólisis (TaqMan®)

Para el análisis de expresión génica de *Faah*, *Napepld*, *Cnr1*, *Cnr2*, *Drd1* y *Drd2* se empleó la técnica qPCR con sondas de hidrólisis. Se seleccionó la cuantificación relativa como método de comparación de grupos experimentales. Primero preparó la Master Mix 2X con la DNA polimerasa para la amplificación según lo descrito en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Componentes de Master Mix 2X para qPCR con sondas de hidrólisis		
Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
Buffer	10 X	200
MgCl ₂	25 µM	120
dNTPs	10 mM	40
ROX	50X	40
AmpliTaq	5 U/µL	10
H2O libre de nucleasas	-	590
Volumen total		1000

Acto seguido, se preparó la mezcla de la reacción de amplificación. Para ello se empleó lo descrito en la **Tabla 10**. Cada Sonda TaqMan® 20X contenía los primers For/Rev del gen a analizar y el colorante FAM-MGB. Cada muestra se analizó por duplicado.

Tabla 10. Componentes de la reacción de amplificación por qPCR con sondas TaqMan

Reactivo	Concentración	1X - Volumen (µL)
Master Mix 2X	2 X	5
Sondas TaqMan®	20 X	1
H2O libre de nucleasas	10 mM	2
cDNA	25 ng/µL	2
Volumen total		10

Las muestras por duplicado fueron colocadas en el termociclador de tiempo real y se analizaron usando el módulo óptico FAM. El programa de temperatura del termociclador se detalla en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Programa de termociclador en tiempo real para amplificación por qPCR con sondas TaqMan

Fase	Temperatura (°C)	Duración (min)
Hot Start	50	2:00
	95	10:00
Amplificación (40 ciclos)	95	0:15
	60	1:00

La técnica qPCR con sondas de hidrólisis no produce curva de melting, por lo que ese paso fue excluido del programa de temperaturas. Para cada muestra se analizaron los 6 genes en tubos diferentes, además del gen normalizador (*18S*).

5.8.5.7. Cuantificación relativa

Luego de la qPCR, se extrajeron los datos de C_q obtenidos en cada tubo. El cálculo de C_q se realizó empleando el software AriaMX versión 1.8. El método de

comparación empleado fue el descrito por Livak & Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001). Como se mencionó previamente, se seleccionó el gen *18S* como normalizador debido a que su expresión no varía entre sujetos que recibieron o no tratamiento. En cuanto al control con el cual se comparó las demás muestras, este fue el grupo vehículo. La cuantificación relativa se expresó en cambios en niveles de expresión (*fold change*, en inglés) en relación al control (vehículo). Brevemente, se calculó el Cq promedio de los duplicados por muestra en cada grupo experimental para el normalizador. Luego y por cada repetición, se restó el Cq del gen de interés con el Cq promedio del normalizador (ΔCq). A continuación, se calculó el promedio de todos los ΔCq del grupo control (vehículo). Después, se restó el ΔCq promedio de los controles con el ΔCq de cada muestra en todos los grupos experimentales (incluido el grupo vehículo) para obtener el $\Delta\Delta Cq$. Una vez obtenido este dato se calculó el cambio en nivel de expresión de cada muestra elevando el valor de 2 a la potencia equivalente al valor $\Delta\Delta Cq$. Para estimar la repetitividad del análisis se calculó el error estándar promedio en cada grupo experimental.

5.9. Análisis estadístico

Todos los resultados, desde los provenientes de las pruebas comportamentales hasta el análisis molecular, fueron sujetos a cuatro pruebas estadísticas para determinar si podían ser ajustadas a un modelo de regresión simple. Estas pruebas, ejecutadas sobre los residuales de cada grupo experimental, fueron de linealidad (mediante el gráfico de residuales versus valores ajustados), normalidad (prueba de Shapiro-Wilk), homocedasticidad (prueba de Breuch-

Pagan) e independencia (prueba de Durbin-Watson). Se definió como valor significativo $p = 0.05$.

Todos aquellos resultados que pasaron los cuatro supuestos del modelo de regresión simple fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). De encontrarse una diferencia significativa en alguno de los grupos experimentales, este modelo era sometido a un análisis de comparación *post hoc* (HSD de Tuckey) con la finalidad de identificar al grupo diferente.

Si los resultados fallaban en al menos uno de los cuatro supuestos del modelo de regresión simple, estos eran evaluados por una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis). De encontrarse diferencias significativas en alguno de los grupos experimentales, se procedió a realizar un análisis de comparación *post hoc* no paramétrico (prueba de Dunn con corrección de valor de p usando el método Benjamini-Hochberg).

Todas las pruebas estadísticas y gráficas generadas en el presente estudio fueron realizadas en el software R versión 4.1.2 y RStudio versión 2021.09.1-372. Los gráficos de barras representan el promedio y el error estándar promedio (SEM) de los resultados.

5.10. Consideraciones éticas

El presente proyecto cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con constancia 044-14-20 (**Anexo 11**). Asimismo, también cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Andina del Cusco (CIE-UAC).

VI. RESULTADOS

6.1. Evaluación comportamental

6.1.1. MACOMCH-01 reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado

La estimación del potencial efecto antidepresivo de la macamida se realizó mediante evaluación de la latencia y la duración de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

Con respecto a la latencia a primera inmovilidad, se calcularon los residuales y se sometieron a las pruebas de supuestos de modelo de regresión simple. Si bien los residuales mostraron linealidad (**Anexo 12**), homocedasticidad ($p = 0.5563$) e independencia estadística ($p = 0.1837$), estos no mostraron una distribución normal ($p = 0.0075$), por lo que no se empleó el modelo de regresión simple. Al no poder ajustarse a un modelo de regresión simple, los resultados fueron analizados con una prueba no paramétrica. La prueba de Kruskal-Wallis determinó que no existían diferencias significativas en la latencia a primera inmovilidad de ningún grupo experimental ($p = 0.4027$), pese a que se pudo observar una ligera tendencia al incremento (**Figura 13**).

Los residuales de los resultados de duración de inmovilidad cumplieron los supuestos de linealidad (**Anexo 12**), normalidad ($p = 0.7004$), homocedasticidad ($p = 0.4589$) e independencia ($p = 0.9731$), por lo que fueron ajustados al modelo de regresión simple. Se observó que las tres concentraciones de MCH disminuyeron el tiempo de inmovilidad en comparación con el grupo vehículo. Al aplicarse la

prueba ANOVA se determinó que, en efecto, existía una diferencia significativa en al menos uno de los 5 grupos evaluados ($p = 0.0332$). Al emplearse la prueba HSD de Tuckey se detectó que solamente la dosis intermedia de 10 mg/kg generó una disminución estadísticamente significativa respecto al vehículo ($p = 0.0304$), mientras que las dosis baja y alta (3 y 30 mg/kg , respectivamente) no fueron estadísticamente diferentes del control. Esto puede interpretarse como un potencial efecto antidepresivo de la administración aguda de 10 mg/kg de MACOMCH-01. Los resultados graficados se pueden observar en la **Figura 13**.

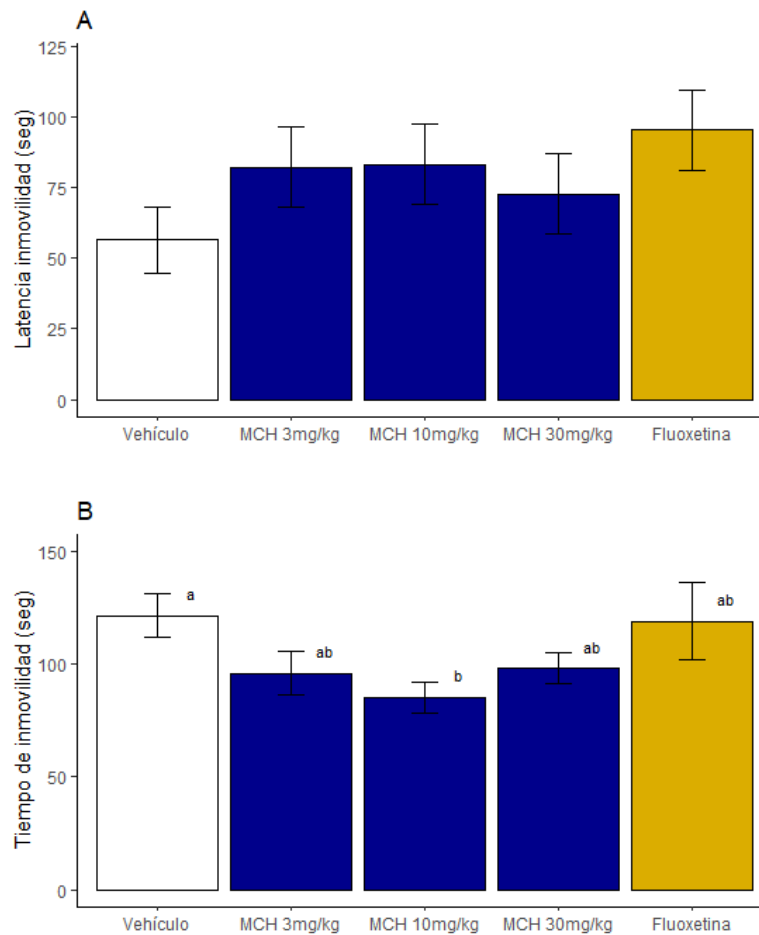


Figura 13. (A) Latencia a primera inmovilidad ($p = 0.4027$) y (B) tiempo acumulado de inmovilidad ($p = 0.0332$) de ratones sometidos a la prueba de nado forzado. Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio.

6.1.2. MACOMCH-01 no muestra propiedades ansiogénicas en la prueba de caja clara oscura

El potencial efecto ansiolítico de MCH fue evaluado a mediante el número de transiciones, latencia a caja oscura y duración en caja clara de la prueba caja clara-oscura.

Los residuales de los resultados de número de transiciones cumplieron los criterios de linealidad (**Anexo 12**), normalidad ($p = 0.8481$), homocedasticidad ($p = 0.5361$) e independencia ($p = 0.2734$), por lo que se ajustaron al modelo de regresión simple. Al aplicar la prueba de ANOVA al modelo de regresión de número de transiciones, se determinó que no existía diferencias significativas en ningún grupo ($p = 0.077$), pese a que se observó una tendencia a incrementarse en el grupo midazolam (**Figura 14**).

Con respecto a la latencia de ingreso a caja oscura, se observó que los residuales cumplieron los supuestos de linealidad (**Anexo 12**), normalidad ($p = 0.434$) e independencia ($p = 0.8473$), pero falló en la prueba de homocedasticidad ($p = 0.008$). Por este motivo, estos resultados no fueron ajustados a un modelo de regresión lineal y fueron evaluados con una prueba no paramétrica. Al aplicarse la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que no existió diferencias significativas en ningún grupo experimental ($p = 0.1109$), pese a observarse una tendencia a disminuir en el grupo que recibió midazolam (**Figura 14**).

Los residuales de la variable duración en caja clara evidenciaron el cumplimiento de los supuestos de linealidad (**Anexo 12**), normalidad ($p = 0.613$), homocedasticidad ($p = 0.1074$) e independencia ($p = 0.2264$), por lo que fueron

ajustados al modelo de regresión lineal. Al aplicar la prueba de ANOVA a la duración en caja clara, se determinó que no existía diferencias significativas en ningún grupo ($p = 0.088$), pese a que se observó una tendencia a incrementarse en el grupo midazolam (**Figura 14**).

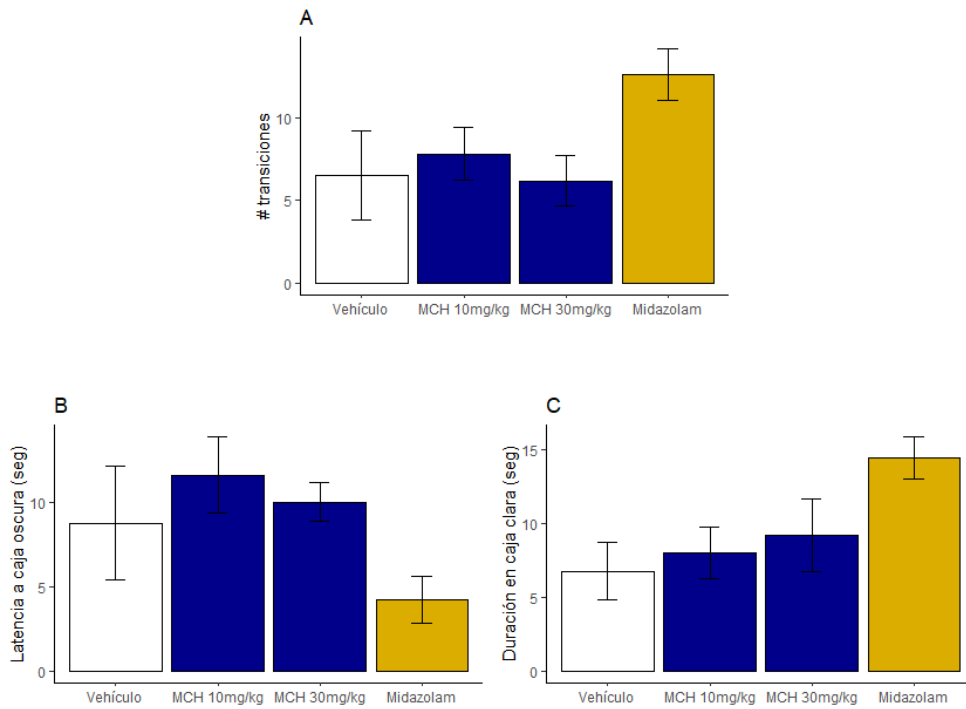


Figura 14. (A) Número total de transiciones entre caja clara-oscura ($p = 0.077$), (B) latencia al primer ingreso a la caja oscura ($p = 0.8473$) y (C) tiempo acumulado de permanencia en la caja clara ($p = 0.088$) de ratones sometidos a la prueba de caja clara oscura. Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio.

6.1.3. MACOMCH-01 incrementa la actividad locomotora pero no muestra propiedades ansiogénicas en la prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto tuvo como finalidad evaluar el efecto de la administración de la macamida en el sistema locomotor y en el comportamiento tipo ansioso del ratón.

El efecto en la locomoción del ratón se evaluó comparando la distancia recorrida y el tiempo de inmovilidad del ratón. El análisis de los resultados evidencian que, tanto la variable distancia recorrida como tiempo de inmovilidad cumplieron los supuestos de linealidad (**Anexo 12**), normalidad ($p_{\text{distancia}} = 0.4266$ y $p_{\text{inmovilidad}} = 0.2013$), homocedasticidad ($p_{\text{distancia}} = 0.5807$ y $p_{\text{inmovilidad}} = 0.0584$) e independencia ($p_{\text{distancia}} = 0.6342$ y $p_{\text{inmovilidad}} = 0.3812$), por lo que fue factible el uso del modelo de regresión simple. La prueba de t de Student detectó una diferencia significativa en la distancia recorrida entre el grupo vehículo y el grupo que recibió 10 mg/kg i.p de macamida ($p = 0.010$). Sin embargo, no se detectó diferencia significativa en el tiempo de inmovilidad de ambos grupos experimentales ($p = 0.6036$). La representación gráfica de los resultados se aprecia en la **Figura 15**.

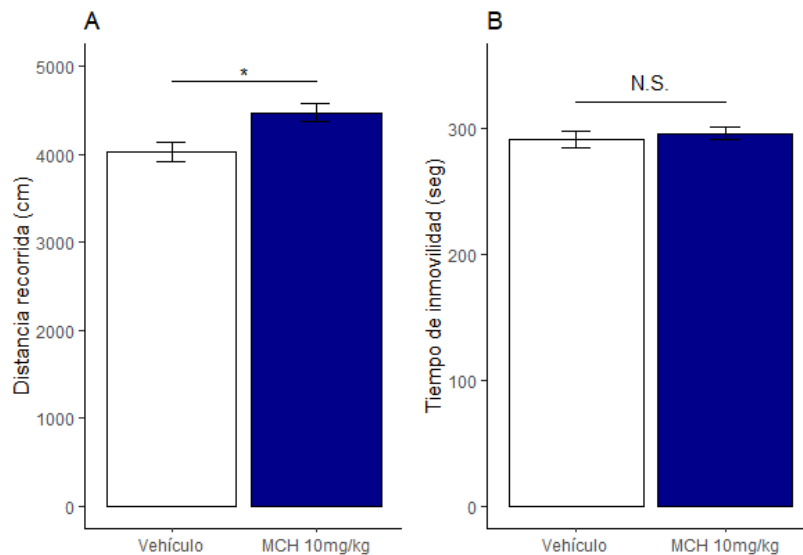


Figura 15. (A) Distancia total recorrida en el campo ($p = 0.010$) y (B) tiempo acumulado de inmovilidad ($p = 0.6036$) de ratones sometidos a la prueba de campo abierto para la evaluación del efecto locomotor de MCH. Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio

El potencial efecto ansiolítico del ratón se evaluó comparando la frecuencia y permanencia del ratón en la zona central del campo abierto. El análisis de los resultados evidencian que, tanto la variable frecuencia en zona central como tiempo en zona central cumplieron los supuestos de linealidad (Anexo 12), normalidad ($p_{\text{frecuencia}} = 0.9319$ y $p_{\text{tiempo}} = 0.9797$), homocedasticidad ($p_{\text{frecuencia}} = 0.2596$ y $p_{\text{tiempo}} = 0.0832$) e independencia ($p_{\text{frecuencia}} = 0.3227$ y $p_{\text{tiempo}} = 0.2914$), por lo que fue factible el uso del modelo de regresión simple. Al compararse las medias de la frecuencia en zona central de ambos grupos experimentales usando la prueba de t de Student, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.9695$). De igual forma, al evaluarse el tiempo de permanencia en zona central tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.2255$). La representación gráfica de los resultados se aprecia en la **Figura 16**.

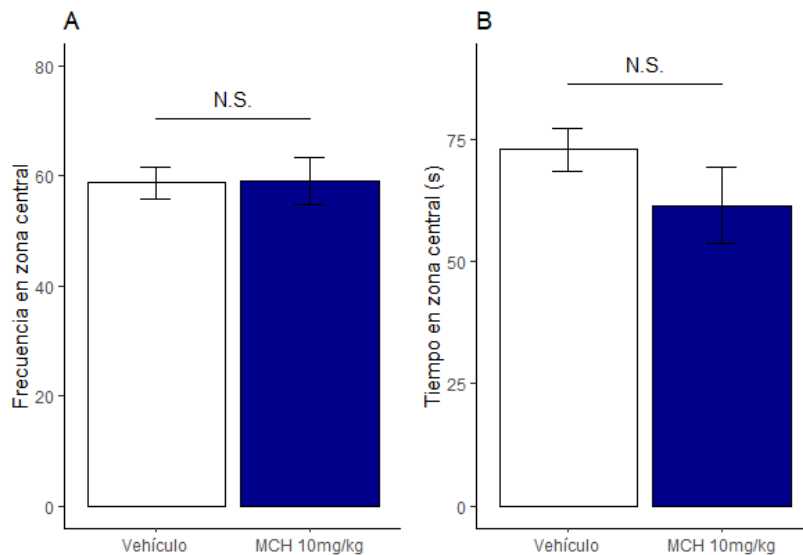


Figura 16. (A) Frecuencia de ingreso al cuadrante central del campo ($p = 0.9695$) y (B) tiempo acumulado de permanencia en la zona central ($p = 0.2255$) de ratones sometidos a la prueba de campo abierto para la evaluación del efecto ansiogénico de MCH. Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio

6.2. Análisis molecular

6.2.1. MACOMCH-01 incrementa el nivel de expresión de *Faah* y *Cnr1* en núcleo accumbens

Al realizarse las pruebas de estandarización del método de análisis molecular, se encontró que los genes *Cnr2* y *Napepld* no se expresaban de manera significativa en el núcleo accumbens, por lo que estos genes fueron excluidos del análisis molecular. Para los demás genes de interés (*Faah*, *Cnr1*, *Drd1* y *Drd2*), junto con el gen normalizador (*18S*), se realizaron las pruebas estadísticas de comprobación de supuestos de modelo de regresión simple. Los resultados, los cuales se muestran en la **Tabla 12** y el **Anexo 12**, evidenciaron que pese a que poseían distribución normal de residuales, estos fallaron en comprobar los demás supuestos, por lo que se optó por aplicar pruebas de comparación no paramétricas.

Tabla 12. Resultados de pruebas estadísticas para comprobación de supuestos del modelo de regresión simple en resultados del análisis molecular

Supuesto del modelo	<i>Faah</i>	<i>Cnr1</i>	<i>Drd1</i>	<i>Drd2</i>
Normalidad	0.1368	0.2379	0.2258	0.0940
Homocedasticidad	0.0089	0.0273	0.0045	0.1104
Independencia	1.193 e-5	0.0162	3.865 e-5	0.0002

La prueba de Kruskal-Wallis aplicada a la expresión de *Faah* en los 5 grupos detectó una diferencia significativa en al menos uno de los grupos ($p = 0.0226$). Luego de aplicarse la prueba *post hoc* de Dunn con corrección de Benjamini-Hochberg, se detectó que en el grupo MCH 30mg/kg existía un incremento significativo ($p = 0.0352$) de 2.9 veces la expresión de *Faah* en comparación con el vehículo. Los grupos MCH 3mg/kg, 10 mg/kg y fluoxetina no presentaron

diferencias significativas con el grupo vehículo o con el grupo MC 30mg/kg (Ver **Tabla 13** y **Figura 17**).

Tabla 13. Cambios de nivel de expresión de *Faah* en grupos experimentales comparados con el grupo control (vehículo).

Cambios de nivel de expresión	MCH 3 mg/kg	MCH 10 mg/kg	MCH 30 mg/kg	Fluoxetina
Fold change	2.35	1.85	2.83	1.67
(valor de p)	(0.1015)	(0.4071)	(0.0352*)	(0.5665)

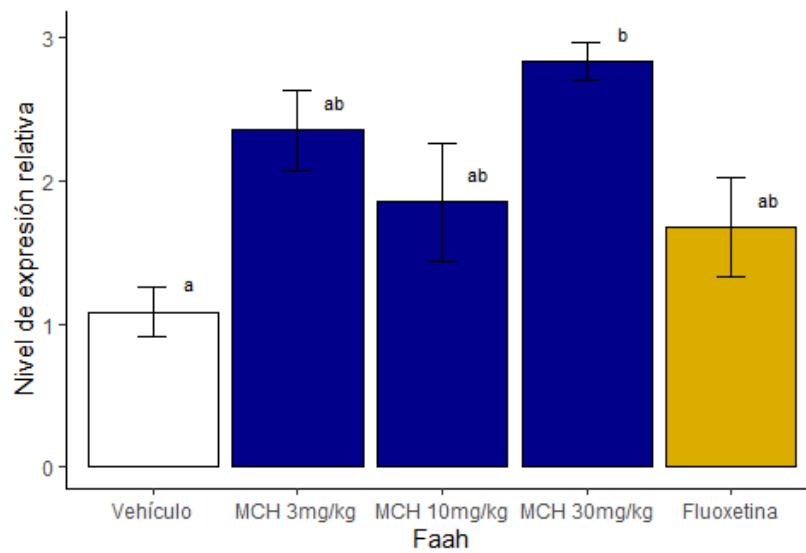


Figura 17. Cambios de nivel de expresión del gen *Faah* en núcleo accumbens de ratones de los grupos MCH y fluoxetina en comparación con el grupo vehículo ($p = 0.0226$). Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio

Para el caso del gen *Cnr1*, la prueba de Kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa en uno de los 5 grupos experimentales ($p = 0.0004$). La prueba de Dunn con corrección Benjamini-Hochberg evidenció que no existió diferencias significativas en la expresión de *Cnr1* entre el grupo vehículo que el grupo que recibió MCH 3mg/kg ($p = 0.8949$). No obstante, se observó que los grupos MCH 10mg/kg, MCH 30mg/kg y fluoxetina sí eran significativamente diferentes al control al expresar el gen *Cnr1* hasta 4.3 veces más (Ver **Tabla 14** y **Figura 18**).

Tabla 14. Cambios de nivel de expresión de *Cnr1* en grupos experimentales comparados con el grupo control (vehículo).

Cambios de nivel de expresión	MCH 3 mg/kg	MCH 10 mg/kg	MCH 30 mg/kg	Fluoxetina
Fold change	1.13	4.28	3.63	4.05
(valor de p)	(0.8949)	(0.0063*)	(0.0191*)	(0.0128*)

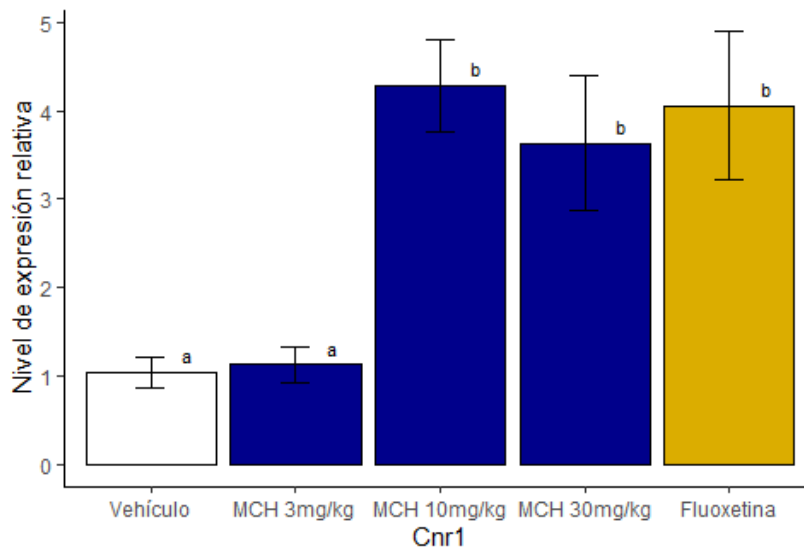


Figura 18. Cambios de nivel de expresión del gen *Cnr1* en núcleo accumbens de ratones de los grupos MCH y fluoxetina en comparación con el grupo vehículo ($p = 0.0004$). Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio

6.2.2. MACOMCH-01 no produce cambios significativos en los niveles de expresión de *Drd1* y *Drd2* en núcleo accumbens

La prueba de Kruskal-Wallis mostró que existía una diferencia significativa en alguno de los 5 grupos experimentales en cuanto a la expresión del gen *Drd1*. Esta diferencia fue detectada empleando el test de Dunn con corrección Benjamini-Hochberg, el cual indicó que existía una diferencia significativa entre el grupo MCH 3 mg/kg y el grupo fluoxetina ($p = 0.0371$). No obstante, no existía una diferencia significativa entre el grupo vehículo y los demás grupos experimentales (Ver **Tabla 15** y **Figura 19**).

Tabla 15. Cambios de nivel de expresión de *Drd1* en grupos experimentales comparados con el grupo control (vehículo).

Cambios de nivel de expresión	MCH 3 mg/kg	MCH 10 mg/kg	MCH 30 mg/kg	Fluoxetina
Fold change	0.59	0.90	1.18	1.90
(valor de p)	(0.4339)	(0.5454)	(0.9586)	(0.3696)

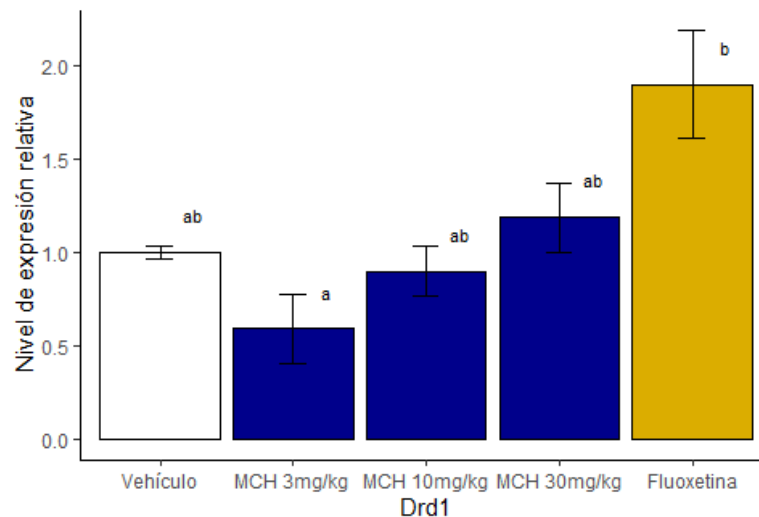


Figura 19. Cambios de nivel de expresión del gen *Drd1* en núcleo accumbens de ratones de los grupos MCH y fluoxetina en comparación con el grupo vehículo ($p = 0.0371$). Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio

Finalmente, la evaluación de la expresión del gen *Drd2* mediante la prueba de Kruskal-Wallis también mostró diferencia significativa en alguno de los grupos ($p = 0.0029$). Al emplearse la prueba de Dunn con corrección Benjamini-Hochberg se detectó que la diferencia significativa estaba entre el grupo MCH 3mg/kg y fluoxetina ($p = 0.0027$) y el grupo MCH 10 mg/kg y grupo fluoxetina ($p = 0.0101$). Sin embargo, no se detectó una diferencia significativa entre el grupo vehículo y los demás grupos experimentales (Ver **Tabla 16** y **Figura 20**).

Tabla 16. Cambios de nivel de expresión de *Drd2* en grupos experimentales comparados con el grupo control (vehículo).

Cambios de nivel de expresión	MCH 3 mg/kg	MCH 10 mg/kg	MCH 30 mg/kg	Fluoxetina
Fold change	0.47	0.60	0.89	1.53
(valor de p)	(0.1307)	(0.2387)	(0.7356)	(0.2707)

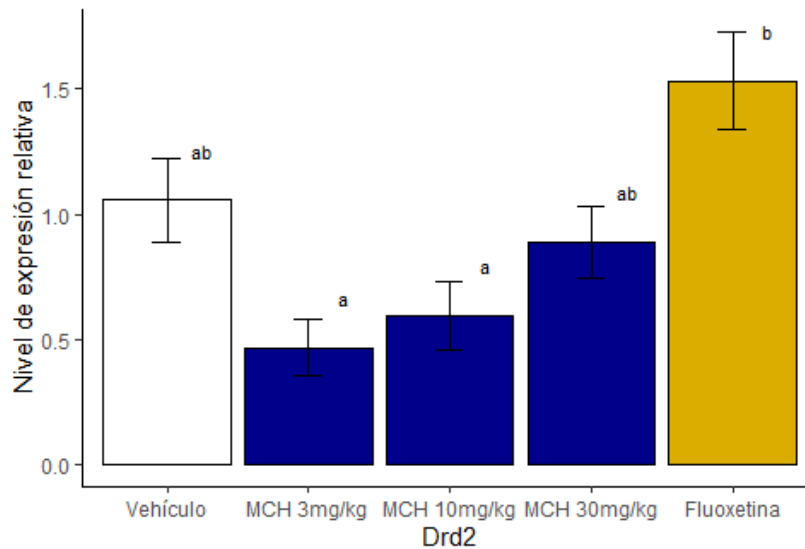


Figura 20. Cambios de nivel de expresión del gen *Drd2* en núcleo accumbens de ratones de los grupos MCH y fluoxetina en comparación con el grupo vehículo ($p = 0.0101$). Los resultados están expresados en media \pm error estándar medio

VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian que la administración intraperitoneal de 10 mg/kg de (9Z,12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida o N-bencilinoleamida (MACOMCH-01) reduce el comportamiento tipo depresivo en modelo murino de estrés agudo, sin afectar el estado ansioso o locomotor.

En efecto, el grupo de ratones que recibió la dosis intermedia de 10 mg/kg i.p. de MACOMCH-01 redujo significativamente el tiempo acumulado de inmovilidad en la prueba de nado forzado, mientras que los grupos que recibieron las dosis baja y alta de 3 y 30 mg/kg i.p., respectivamente, mostraron una tendencia a la reducción, aunque esta no fue significativa. La reducción en la duración de inmovilidad de la dosis intermedia puede interpretarse como la reducción del comportamiento tipo depresivo a través de la disminución del tiempo en que el ratón permanece en estado de desesperanza frente al estrés inescapable (Yankelevitch-Yahav, Franko, Huly, & Doron, 2015). Este resultado concuerda con lo evidenciado por otros inhibidores de FAAH, los cuales en diversas pruebas comportamentales también redujeron el tiempo de inmovilidad en ratones expuestos no solo a estrés agudo (Ebrahimi-Ghiri, Shahini, Khakpai, & Zarrindast, 2019; Griebel et al., 2018; Navarria et al., 2014; Sartim, Moreira, & Joca, 2017), sino también a modelos de estrés crónico (Alteba et al., 2020; Bortolato et al., 2007; Carnevali et al., 2015; Jiang et al., 2019), e incluso en modelos genéticos (Vinod et al., 2012) y farmacológicos (Ebrahimi-Ghiri, Khakpai, & Zarrindast, 2021). Con respecto al posible mecanismo de acción relacionado al efecto antidepresivo, estudios *in-vitro* determinaron que MACOMCH-01 tiene la capacidad de inhibir a la enzima FAAH

(Alasmari et al., 2019; Wu et al., 2013). Otros fármacos inhibidores de FAAH como URB597 y SSR411298 ya han demostrado, *in-vivo*, tener la capacidad de incrementar los niveles de anandamida en encéfalo y poseer efectos antidepresivos en modelos de estrés (Bortolato et al., 2007; Griebel et al., 2018). Asimismo, el uso concomitante de antagonistas de receptores CB1 abole el efecto antidepresivo producido por los inhibidores FAAH (Adamczyk, Gołda, McCreary, Filip, & Przegaliński, 2008; Gobbi et al., 2005), evidenciando que tal efecto es mediado por la señalización endocannabinoide. Dado lo anterior es posible hipotetizar que MACOMCH-01 produce un efecto antidepresivo mediante el incremento significativo de la biodisponibilidad de endocannabinoides en el encéfalo debido a su capacidad inhibitoria de FAAH. Esta hipótesis podría ser explorada en futuros estudios mediante la cuantificación de anandamida en encéfalo y su relación con el efecto antidepresivo ya demostrado en la presente investigación. Asimismo, es posible evaluar si MACOMCH-01 actúa exclusivamente a través de la vía endocannabinode mediante el uso de antagonistas CB1. Es importante resaltar que pese a que la dosis intermedia tuvo un efecto en el comportamiento tipo depresivo en los ratones, la dosis más baja y alta no tuvieron el mismo efecto. Este fenómeno otorga a la curva dosis-respuesta de MACOMCH-01 una forma de “U” característica de los fármacos endocannabinoides (Linares et al., 2019). En efecto, otros agonistas directos de receptores CB1 como cannabidiol (Zanelati, Biojone, Moreira, Guimaraes, & Joca, 2010) e incluso inhibidores FAAH como AA-5HT (Kirkedal, Wegener, Moreira, Joca, & Liebenberg, 2017) reducen significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado solo en la dosis intermedia, siendo no significativo en las dosis más altas y más bajas. Frente

a este fenómeno, Kirkedal et al. (2017) hipotetizaron que a dosis bajas, los inhibidores FAAH no incrementaban considerablemente los niveles de anandamida como para tener un efecto comportamental. A dosis moderadas, esta inhibición lograba incrementar la biodisponibilidad de anandamida lo suficiente como para activar los receptores CB1 produciendo un efecto antidepresivo. Sin embargo, a dosis altas, era la misma anandamida que activaba los receptores TRPV1, asociados a la aparición de síntomas tipo depresivos, reduciendo el efecto y produciendo la curva dosis-respuesta en forma de “U”. La administración de MACOMCH-01 también produjo una tendencia a incrementar la latencia para el primer periodo de inmovilidad en la prueba de nado forzado. Esto puede ser interpretado como un mayor tiempo del ratón para entrar en el periodo de desesperanza, por ende, un efecto tipo antidepresivo (Castagne, Porsolt, & Moser, 2009). No obstante, este incremento no fue estadísticamente significativo.

Con respecto al estudio de los potenciales efectos secundarios de MACOMCH-01, una afección significativa en la locomoción del ratón constituye no solo un potencial efecto adverso, sino también un sesgo en la evaluación del efecto antidepresivo. Un incremento en la movilidad del roedor puede expresarse en una disminución de la inmovilidad en la prueba de nado forzado e interpretación errada de efecto antidepresivo. Dado lo anterior, la evaluación del efecto locomotor producto de la administración de MACOMCH-01 es imprescindible. Existe evidencia de que el uso de agonistas cannabinoides en roedores pueden producir alteraciones en el movimiento (Gamage et al., 2020). Asimismo, se ha descrito que este efecto en la locomoción podría ser dosis dependiente. Se ha observado que, dosis altas de agonistas CB1 producen un efecto hipolocomotor, mientras que a

dosis bajas el efecto es el contrario (Drews, Schneider, & Koch, 2005; Polissidis et al., 2013). Otro estudio determinó que el tetrahidrocannabinol tenía un efecto trifásico en el que la actividad locomotora, la cual disminuye, se incrementa y vuelve a disminuir a medida que la dosis va aumentándose (Sanudo-Pena, Romero, Seale, Fernandez-Ruiz, & Walker, 2000). Para evaluar este potencial efecto dosis-dependiente se empleó la prueba de campo abierto. En dicha prueba se observó que no existía una diferencia significativa en el tiempo de inmovilidad entre grupo control y grupo MACOMCH-01. No obstante, al evaluarse la distancia total recorrida durante los 10 minutos de evaluación, el grupo MACOMCH-01 10mg/kg presentó un incremento significativo con respecto al control. Al mantenerse inalterada la inmovilidad del ratón durante la prueba de campo abierto se concluyó que era evidencia suficiente para descartar el posible sesgo locomotor en la evaluación antidepressiva mediante la prueba de nado forzado. Con respecto al incremento en la distancia recorrida, estos resultados concuerdan con otros estudios que evidencian que, no solo la inhibición de FAAH sino también la de monoacilglicerol lipasa, enzima con similar función, incrementan dicho parámetro (Bedse et al., 2018). Sin embargo, existen también otros estudios que muestran que el uso de inhibidores FAAH no solo no tuvieron efecto alguno en la locomoción (El-Alfy et al., 2019) sino que incluso la redujeron (Sufian, Amin, & Ali, 2021). Estos antecedentes, a priori contradictorios, pueden ser explicados a través de los estudios realizados en agonistas cannabinoides y el efecto locomotor que estos ejercen dependiendo de la concentración de administración. Es probable que, al igual que los agonistas cannabinoides, los inhibidores FAAH influyan en la locomoción de manera dosis-dependiente. Esto indica que la locomoción es un

aspecto complejo que necesita ser estudiado a profundidad en futuras investigaciones.

El efecto ansiogénico se evaluó a través de la prueba de caja clara oscura y prueba de campo abierto. En la prueba de caja clara oscura no se encontró ninguna diferencia significativa en el número de cruces entre cajas, latencia para entrar a la caja oscura o permanencia en la caja clara. Estos hallazgos indican que los ratones que recibiendo la macamida no sufrieron alteraciones en el comportamiento de exploración y escape de lugares riesgosos. De igual forma, en la prueba de campo abierto no se observó diferencias significativas en el número de ingresos al campo central o su permanencia en el mismo. Ambas pruebas descartaron posibles efectos ansiogénicos en ratones que recibieron la administración de MACOMCH-01. En la actualidad se han realizado diversos estudios que intentan relacionar el efecto de la activación de receptores endocannabinoides con la conducta ansiosa (García-Gutiérrez, Navarrete, Gasparyan, & Manzanares, 2021). Es interesante observar que muchos de estos resultados pueden llegar a contradecirse. Se ha reportado que la activación de los receptores endocannabinoides podría tener efectos ansiolíticos (Lucas Luz et al., 2020; Papagianni & Stevenson, 2019; Patel & Hillard, 2006), mientras que otros estudios apuntan a que este efecto es ansiogénico (Bhattacharyya et al., 2017; Moreira et al., 2009). Este escenario de aparente contradicción podría ser explicado en relación a qué región cerebral está siendo modulada por la activación de receptores endocannabinoide. Se ha observado que la activación en amígdala basolateral (Bhattacharyya et al., 2017; Ganon-Elazar & Akirav, 2009) produce el efecto ansiogénico, mientras que la activación de la señalización por vía hipocampal tendría efectos ansiolíticos (Campos et al., 2013).

Con respecto al uso de inhibidores FAAH, estos han evidenciado efecto ansiolítico mediante acción en amígdala cerebral (Gunduz-Cinar, Hill, McEwen, & Holmes, 2013) y ansiogénico cuando es administrado en hipocampo ventral (Roohbakhsh, Keshavarz, Hasanein, Rezvani, & Moghaddam, 2009). Sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios que evidencien el efecto de los inhibidores FAAH en el sistema endocannabinoide del núcleo accumbens. El efecto de MACOMCH-01 como inhibidor FAAH en el núcleo accumbens constituye un antecedente novedoso y será discutido más adelante.

Como se ha visto anteriormente, el efecto de inhibidores FAAH en modelos de depresión ya ha sido ampliamente estudiado. No obstante, su influencia en el circuito mesolímbico, más específicamente en el núcleo accumbens, aún requiere más estudios. Por los antecedentes *in vitro* se sabe que MACOMCH-01 inhibe la actividad de FAAH. Sobre cómo MACOMCH-01 esté produciendo un potencial efecto antidepresivo en el modelo agudo a través del circuito mesolímbico puede ser explicado con la siguiente hipótesis. El núcleo accumbens, conformado principalmente por neuronas GABAérgicas (MSN-D1 y -D2) recibe proyecciones neuronas dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral. Estas terminales dopaminérgicas, a su vez, son controladas por terminaciones glutamatérgicas provenientes del hipocampo y corteza prefrontal, las cuales al ser activadas incrementan la liberación de dopamina (Julian et al., 2003; Riegel & Lupica, 2004). Son estas terminaciones glutamatérgicas las que expresan los receptores CB1 y modulan la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Covey et al., 2017; Julian et al., 2003). En los modelos de estrés agudo se ha descrito que existe un incremento de liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Garcia-Keller et

al., 2013; Holly, DeBold, & Miczek, 2015; Laplante, Dufresne, Ouboudinar, Ochoa-Sanchez, & Sullivan, 2013). La inhibición de FAAH por MACOMCH-01 incrementaría la biodisponibilidad de anandamida, la cual actuaría en los receptores CB1 en las terminaciones glutamatérgicas, reduciendo su potencial excitatorio postsináptico glutamatérgico y, como consecuencia, modulando la liberación exacerbada de dopamina en el modelo agudo. Esta hipótesis es reforzada por la evidencia de que la administración de inhibidores de monoacilglicerol lipasa (otra enzima que hidroliza endocannabinoides), incrementa la biodisponibilidad de 2-AG y disminuye la liberación de dopamina (Mateo et al., 2017). Asimismo, se ha descrito que las neuronas dopaminérgicas presentan receptores CB2, los cuales al ser activados por la anandamida también disminuyen la neurotransmisión dopaminérgica (Zhang et al., 2017). Dados todos los antecedentes mencionados, una forma de evaluar indirectamente los cambios neurobiológicos producto de la administración de MACOMCH-01 en el modelo de estrés agudo es mediante las variaciones en la expresión temprana de genes relacionados a la neurotransmisión dopaminérgica y endocannabinoide.

Es importante resaltar que todos los análisis por qPCR evalúan la expresión de mRNA presente en los núcleos celulares, por lo que los resultados de los análisis de los genes *Faah*, *Napepld*, *Cnr1*, *Cnr2*, *Drd1* y *Drd2* corresponden al total de mRNA encontrado en las células del núcleo accumbens, el cual está conformado por MSN-D1, MSN-D2 e interneuronas colinérgicas. Al realizarse el análisis molecular, se observó que los genes *Napepld* y *Cnr2* no se expresaron lo suficiente como para ser detectados y cuantificados. A la fecha existen pocos estudios que evalúen la expresión del gen *Napepld* en núcleo accumbens, entre los cuales

destacan uno realizado en un modelo de exposición crónica intermitente a alcohol en ratas Wistar (Henricks et al., 2016) y otro que solo evalúa la expresión proteica de NAPE-PLD en núcleo accumbens de monos Vervet (Kucera et al., 2018). Una posible causa de que la expresión de mRNA *Napepld* no haya podido ser detectada puede ser debido a que esta proteína, por ende el gen, solo se expresa a demanda frente a situaciones de exceso de neurotransmisión, por lo que es de esperarse que su síntesis esté sujeta a momentos puntuales y no de manera constante ni ubicua. Con respecto a la expresión de *Cnr2* en núcleo accumbens, si bien existen estudios que la analizan junto con la expresión de *Cnr1* (Gasparyan, Navarrete, Rodríguez-Arias, Miñarro, & Manzanares, 2021) este gen se expresa predominantemente en el sistema periférico cumpliendo una función inmunológica (Atwood & Mackie, 2010; Gong et al., 2006), por lo que otros estudios optan por analizar su expresión en otras regiones periféricas tales como bazo y médula ósea (Llorente-Berzal et al., 2013). Esta limitante en la detección de expresión de *Napepld* y *Cnr2* no constituye un impedimento al alcance de los objetivos del presente estudio. Aun así, los bajos niveles de expresión de los genes mencionados es una limitación que puede ser abordada en futuros estudios mediante la disección de otras regiones cerebrales y una mayor cantidad de tejido.

La administración de MACOMCH-01 y fluoxetina produjeron una tendencia al incremento del nivel de expresión del gen *Faah* en núcleo accumbens, siendo esta tendencia significativa a una dosis de 30mg/kg de MACOMCH-01. Se ha descrito que el gen *Faah* es regulado por la acción de receptores glucocorticoides y estrogénicos (Waleh, Cravattb, Apte-Deshpandea, Teraoa, & Kilduf, 2002) no obstante, el mecanismo por el cual la administración de inhibidores FAAH podría

regular la expresión de *Faah* aún no ha sido estudiado. Es plausible proponer que este incremento en expresión de *Faah* se deba a un mecanismo de adaptación temprana producto del bloqueo funcional de la enzima FAAH, sin embargo, esta hipótesis deberá ser evaluada en futuros estudios. Con respecto a la relación entre los cambios de expresión de *Faah* y el estrés o uso de antidepresivos, a la fecha no se han publicado estudios que evidencien un incremento o disminución de la expresión del gen en el núcleo accumbens bajo exposición a modelos de estrés agudo. No obstante, existen algunos estudios que evidencian que el modelo de restricción aguda no produce cambios rápidos en la actividad de la enzima FAAH en núcleo accumbens (Rademacher et al., 2008). En modelos de estrés crónico se ha observado que tanto la expresión de mRNA *Faah* (Marco et al., 2014), como la expresión proteica (Romano-López et al., 2016) y su actividad enzimática (Alteba et al., 2020) se ven significativamente reducidas. Asimismo, se ha observado que el uso del antidepresivo imipramina tiende a incrementar la actividad de FAAH en esta región cerebral (Hill et al., 2008). Si bien los modelos de estrés crónico pueden producir efectos distintos a los obtenidos en los modelos agudos y no es recomendable compararlos directamente, se puede observar que, en general, el estrés tiende a reducir la actividad de FAAH en núcleo accumbens, mientras que el uso de antidepresivos la incrementa. Esto último coincide con el incremento de mRNA *Faah* observado en los grupos experimentales que recibieron tratamiento, tanto de macamida como de fluoxetina.

Se observó también que el nivel de expresión del gen *Cnr1* se incrementó sustancialmente con la administración de MACOMCH-01 a dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg, además de la administración de fluoxetina. Actualmente no se han

publicado estudios que evidencien que el uso de inhibidores FAAH afecten directamente la expresión de *Cnr1* en núcleo accumbens luego de la exposición a estrés agudo. Sin embargo, evidencia *in-vitro* sugiere que la activación de receptores dopaminérgicos D2 y receptores cannabinoides CB1 por sus respectivos ligandos incrementan la expresión de mRNA *Cnr1* a través de una vía común que involucra la subunidad $G_{i/o}$ y el incremento de la fosforilación de ERK1/2 (Chiang, Lo, & Chen, 2013). Considerando que se ha descrito que la exposición a estrés agudo incrementa la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Garcia-Keller et al., 2013; Holly et al., 2015; Laplante et al., 2013), así como la fosforilación de ERK1/2 (Contesse et al., 2021) es posible especular que el estrés agudo por sí solo esté incrementando la expresión de mRNA *Cnr1* mediante la activación de D2R. Adicionalmente a esto, los inhibidores FAAH como MACOMCH-01 incrementan la biodisponibilidad de anandamida, la cual promovería la activación de los receptores CB1. Esta activación conjunta de D2R y CB1 podría ser la responsable del incremento de mRNA de *Cnr1* en los grupos que recibieron MACOMCH-01 en comparación de los controles estresados. Esta hipótesis aditiva del efecto de D2R y CB1 está respaldada por los resultados obtenidos por Chiang et al. (2013) que observaron que la activación de ambas vías incrementaría más la expresión de *Cnr1* en comparación a si se hubieran activado la vía D2R o CB1R independientemente.

Finalmente, se observó que la administración de MACOMCH-01 no modificó significativamente la expresión de los genes *Drd1* y *Drd2* con respecto al vehículo. No obstante, se observó una tendencia a disminuir con la dosis de 3mg/kg y desde allí aumentar la expresión hasta alcanzar valores similares al vehículo con la dosis de 30mg/kg. Si bien se ha descrito que la expresión génica de *Drd1* y *Drd2*

es afectada por modelos de estrés crónico (Köhler et al., 2019; Wearick-Silva et al., 2019) a la fecha no hay evidencia de que esta sea afectada por modelos de estrés agudo o si la administración aguda de inhibidores FAAH modifican esta expresión en el núcleo accumbens. Futuros estudios serán necesarios para comprobar si esta invariabilidad en la expresión génica se mantiene en modelos de estrés crónico. Por otro lado, se encontró un incremento significativo en la expresión de *Drd1* y *Drd2* en el grupo fluoxetina comparado con los grupos MACOMCH-01 de dosis más bajas. Actualmente no se dispone de información con respecto al efecto de fluoxetina en un modelo de estrés agudo. No obstante se ha reportado que la administración crónica de fluoxetina y sertralina, otro inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, incrementan la expresión del gen *Drd1* (Dziedzicka-Wasylewska, Willner, & Papp, 1997; Huzarska, Zieliński, & Herman, 2006) en núcleo accumbens y en hipocampo (Kobayashi, Haneda, Higuchi, Suhara, & Suzuki, 2012) aunque el mecanismo de tal incremento de expresión aún no está descrito.

Nuestros resultados en el presente estudio posicionan a MACOMCH-01 como un fármaco con potencial efecto antidepresivo sin efectos secundarios ansiogénicos o que afecten la locomoción. No obstante, es importante resaltar que estos resultados han sido estudiados en un modelo agudo. Los modelos agudos son empleados para obtener datos iniciales que sirvan como cribado rápido de potenciales fármacos antidepresivos (Krishnan & Nestler, 2011). La principal limitación de estos estudios recae en que no replica la dimensión crónica del trastorno depresivo. Asimismo, otra limitante del modelo crónico de nado forzado es que, al ser este modelo y herramienta a ser puesto a prueba no permite diseñar

un experimento con la inclusión de un grupo control libre de estrés que serviría como línea base para las pruebas comportamentales y moleculares. Una limitación del estudio también reside en que se asume que el mecanismo de acción de la macamida es a través de la inhibición de FAAH e incremento de biodisponibilidad de endocannabinoides gracias a estudios *in-vitro* previos. No obstante, en un sistema complejo como lo es un animal vivo, la macamida podría estar actuando no solamente por vía endocannabinoides sino por vías inesperadas. Una forma de poder comprobar esta hipótesis sería mediante el uso de antagonistas de receptores endocannabinoides, los cuales se constituirían como controles negativos del efecto terapéutico de las macamida. Otra limitación importante involucra el nivel de inferencia que se puede obtener a partir de los experimentos moleculares. Los cambios en expresión génica permiten observar los cambios tempranos producto de intervenciones experimentales, no obstante, no necesariamente se correlacionan directa o linealmente con los cambios neurobiológicos responsables de las alteraciones comportamentales. Los cambios neurobiológicos como los morfológicos y electrofisiológicos se suceden a los cambios genéticos, por lo que es necesario comprobar la existencia de esta relación teórica entre ambos aspectos.

VIII. CONCLUSIONES

- La administración intraperitoneal de MACOMCH-01 presenta una curva dosis-respuesta en forma de “U” para el efecto antidepresivo, siendo significativa solamente en la dosis intermedia de 10 mg/kg. No se evidenció afección ansiogénica o locomotriz importante.
- La administración intraperitoneal de MACOMCH-01 incrementa la expresión de genes asociados a la vía endocannabinoides, mas no dopaminérgica, en el núcleo accumbens de ratones expuestos a estrés agudo.

IX. RECOMENDACIONES

Dadas las limitaciones expuestas en el último párrafo de la sección Discusión, las siguientes recomendaciones son propuestas con la finalidad de abordarlas mediante futuros estudios.

- Comprobar el efecto antidepresivo de la macamida MACOMCH-01 en modelos agudos que permitan la inclusión de controles sin estrés para la descripción de línea base comportamental (por ejemplo, modelos de restricción aguda de movimiento o inyección de lipopolisacáridos).
- Comprobar el efecto antidepresivo de la macamida en MACOMCH-01 en modelos de estrés crónico que repliquen el aspecto crónico de la etiología de la depresión clínica. De estos modelos, los más empleados son el de estrés crónico ligero y el de derrota social.
- Contrastar los efectos de la macamida en la vía endocannabinoide con antagonistas endocannabinoides (como por ejemplo rimonabant) para comprobar que la vía de acción del fármaco es, en efecto, la vía cannabinoide.
- Fortalecer la evidencia presentada en el estudio mediante la aplicación de técnicas que permitan evaluar directamente los cambios neurobiológicos asociados al incremento de expresión de genes endocannabinoides y dopaminérgicos. Entre estas técnicas estarían la cuantificación protéica por western blot e inmunohistoquímica, estudio electrofisiológico y de complejidad dendrítica.

- Finalmente, estudiar el impacto generados por las alteraciones en núcleo accumbens en otras regiones cerebrales comunicantes con el circuito mesolímbico, tales como el hipocampo, área tegmental central, amígdala o corteza prefrontal medial.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk, P., Gołda, A., McCreary, A. C., Filip, M., & Przegaliński, E. (2008). Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol*, *59*(2), 217-228.
- Alasmari, M., Bhlke, M., Kelley, C., Maher, T., & Pino-Figueroa, A. (2019). Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) by Macamides. *Mol Neurobiol*, *56*(3), 1770-1781. doi:10.1007/s12035-018-1115-8
- Alteba, S., Mizrachi Zer-Aviv, T., Tenenhaus, A., Ben David, G., Adelman, J., Hillard, C. J., . . . Akirav, I. (2020). Antidepressant-like effects of URB597 and JZL184 in male and female rats exposed to early life stress. *Eur Neuropsychopharmacol*, *39*, 70-86. doi:10.1016/j.euroneuro.2020.08.005
- Anisman, H., & Matheson, K. (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(4-5), 525-546. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.007
- Aso, E., Ozaita, A., Serra, M. A., & Maldonado, R. (2011). Genes differentially expressed in CB1 knockout mice: involvement in the depressive-like phenotype. *Eur Neuropsychopharmacol*, *21*(1), 11-22. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.06.007
- Asociación Americana de Psiquiatría, Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM 5.* (2014). American Psychiatric Association.
- Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*, *160*(3), 467-479. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x
- Bambico, F. R., & Gobbi, G. (2008). The cannabinoid CB1 receptor and the endocannabinoid anandamide: possible antidepressant targets. *Expert Opin Ther Targets*, *12*(11), 1347-1366. doi:10.1517/14728222.12.11.1347
- Basavarajappa, B. S. (2007a). Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, *14*(3), 237-246. doi:10.2174/092986607780090829
- Basavarajappa, B. S. (2007b). Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr Neuropharmacol*, *5*(2), 81-97. doi:10.2174/157015907780866910
- Bedse, G., Bluett, R. J., Patrick, T. A., Romness, N. K., Gaulden, A. D., Kingsley, P. J., . . . Patel, S. (2018). Therapeutic endocannabinoid augmentation for mood and anxiety disorders: comparative profiling of FAAH, MAGL and dual inhibitors. *Transl Psychiatry*, *8*(1), 92. doi:10.1038/s41398-018-0141-7

- Belleau, E. L., Treadway, M. T., & Pizzagalli, D. A. (2019). The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry*, 85(6), 443-453. doi:10.1016/j.biopsych.2018.09.031
- Bennett, M. R. (2011). The prefrontal-limbic network in depression: Modulation by hypothalamus, basal ganglia and midbrain. *Prog Neurobiol*, 93(4), 468-487. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.006
- Bhattacharyya, S., Egerton, A., Kim, E., Rosso, L., Riano Barros, D., Hammers, A., . . . McGuire, P. (2017). Acute induction of anxiety in humans by delta-9-tetrahydrocannabinol related to amygdalar cannabinoid-1 (CB1) receptors. *Sci Rep*, 7(1), 15025. doi:10.1038/s41598-017-14203-4
- Bogathy, E., Kostyalik, D., Petschner, P., Vas, S., & Bagdy, G. (2019). Blockade of Serotonin 2C Receptors with SB-242084 Moderates Reduced Locomotor Activity and Rearing by Cannabinoid 1 Receptor Antagonist AM-251. *Pharmacology*, 103(3-4), 151-158. doi:10.1159/000495939
- Boku, S., Nakagawa, S., Toda, H., & Hishimoto, A. (2018). Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72(1), 3-12. doi:10.1111/pcn.12604
- Bortolato, M., Mangieri, R. A., Fu, J., Kim, J. H., Arguello, O., Duranti, A., . . . Piomelli, D. (2007). Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. *Biol Psychiatry*, 62(10), 1103-1110. doi:10.1016/j.biopsych.2006.12.001
- Bourin, M., & Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology* 463, 55-65. doi:10.1016/s0014-2999(03)01274-3
- Brooks, N. A., Wilcox, G., Walker, K. Z., Ashton, J. F., Cox, M. B., & Stojanovska, L. (2008). Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content. *Menopause*, 15(6), 1157-1162. doi:10.1097/gme.0b013e3181732953
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*, 16(12), 3934-3942. doi:10.1523/jneurosci.16-12-03934.1996
- Campos, A. C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., Díaz-Alonso, J., . . . Guimarães, F. S. (2013). The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(6), 1407-1419. doi:10.1017/S1461145712001502

- Carnevali, L., Vacondio, F., Rossi, S., Callegari, S., Macchi, E., Spadoni, G., . . . Sgoifo, A. (2015). Antidepressant-like activity and cardioprotective effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB694 in socially stressed Wistar Kyoto rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 25(11), 2157-2169. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.07.015
- Carrozzino, D., Patierno, C., Fava, G. A., & Guidi, J. (2020). The Hamilton Rating Scales for Depression: A Critical Review of Clinimetric Properties of Different Versions. *Psychother Psychosom*, 89(3), 133-150. doi:10.1159/000506879
- Castagne, V., Porsolt, R. D., & Moser, P. (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur J Pharmacol*, 616(1-3), 128-133. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.018
- Chen, D. J., Gao, M., Gao, F. F., Su, Q. X., & Wu, J. (2017). Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin*, 38(3), 312-316. doi:10.1038/aps.2016.149
- Chiang, Y. C., Lo, Y. N., & Chen, J. C. (2013). Crosstalk between dopamine D₂ receptors and cannabinoid CB₁ receptors regulates CNR1 promoter activity via ERK1/2 signaling. *J Neurochem*, 127(2), 163-176. doi:10.1111/jnc.12399
- Chouinard, F. C. a. G. (2019). The Monoamine Hypothesis of Depression Revisited: Could It Mechanistically Novel Antidepressant Strategies? *Neurobiology of Depression*, Pages 63-73. doi:10.1016/B978-0-12-813333-0.00007-X
- Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H., & Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 370(9600), 1706-1713. doi:10.1016/S0140-6736(07)61721-8
- Contesse, T., Broussot, L., Fofu, H., Vanhoutte, P., Fernandez, S. P., & Barik, J. (2021). Dopamine and glutamate receptors control social stress-induced striatal ERK1/2 activation. *Neuropharmacology*, 190, 108534. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108534
- Covey, D. P., Mateo, Y., Sulzer, D., Cheer, J. F., & Lovinger, D. M. (2017). Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. *Neuropharmacology*, 124, 52-61. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.04.033
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 13, 167-170. doi:10.1016/0091-3057(80)90067-2

- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 23. doi:10.1016/s0165-6147(02)02017-5
- Cutipé Cárdenas, Y. L., Mendoza Vilca, M. A. M., Uribe Obando, R. T., Hinojosa Mendoza, M. A., Bromley Coloma, C. A., Maldonado Ruiz, H., . . . Ramírez Freyre, L. I. (2018). *Plan Nacional de Fortalecimiento de Servicios de Salud Mental Comunitaria* Ministerio de Salud Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública - Dirección de Salud Mental - Lima: ministerio de Salud: Ministerio de Salud
- Dessauer, C. W., Chen-Goodspeed, M., & Chen, J. (2002). Mechanism of G α i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 277(32), 28823-28829. doi:10.1074/jbc.M203962200
- Dong, B., Shilpa, B. M., Shah, R., Goyal, A., Xie, S., Bakalian, M. J., . . . Vinod, K. Y. (2020). Dual pharmacological inhibitor of endocannabinoid degrading enzymes reduces depressive-like behavior in female rats. *J Psychiatr Res*, 120, 103-112. doi:10.1016/j.jpsychires.2019.10.010
- Drews, E., Schneider, M., & Koch, M. (2005). Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 80(1), 145-150. doi:10.1016/j.pbb.2004.10.023
- Dziedzicka-Wasylewska, P., Willner, P., & Papp, M. (1997). Changes in dopamine receptor mRNA expression following chronic mild stress and chronic antidepressant treatment. *Behav Pharmacol* 8, 607-618. doi:10.1097/00008877-199711000-00017
- Ebrahimi-Ghiri, M., Khakpai, F., & Zarrindast, M. R. (2021). URB597 abrogates anxiogenic and depressive behaviors in the methamphetamine-withdrawal mice: Role of the cannabinoid receptor type 1, cannabinoid receptor type 2, and transient receptor potential vanilloid 1 channels. *J Psychopharmacol*, 35(7), 875-884. doi:10.1177/0269881120965934
- Ebrahimi-Ghiri, M., Shahini, F., Khakpai, F., & Zarrindast, M. R. (2019). Antinociceptive and antidepressive efficacies of the combined ineffective doses of S-ketamine and URB597. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 392(11), 1393-1400. doi:10.1007/s00210-019-01676-5
- El-Alfy, A. T., Abourashed, E. A., Patel, C., Mazhari, N., An, H., & Jeon, A. (2019). Phenolic compounds from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) inhibit the endocannabinoid-modulating enzyme fatty acid amide hydrolase. *J Pharm Pharmacol*, 71(12), 1879-1889. doi:10.1111/jphp.13174
- Escalante Palomino, M., & Uribe Obando, R. M. (2008). *Guia de practica clinica de depression*. Retrieved from http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1084_DGSP261.pdf

- Fisher, I. J., Jenkins, M. L., Tall, G. G., Burke, J. E., & Smrcka, A. V. (2020). Activation of Phospholipase C β by G $\beta\gamma$ and G α . *Structure*, 28(7), 810-819.e815. doi:10.1016/j.str.2020.04.012
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., . . . Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol*, 88(6), 3010-3020. doi:10.1152/jn.00361.2002
- Flores-Hernandez, J., Hernandez, S., Snyder, G. L., Yan, Z., Fienberg, A. A., Moss, S. J., . . . Surmeier, D. J. (2000). D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol*, 83(5), 2996-3004. doi:10.1152/jn.2000.83.5.2996
- Fox, M. E., & Lobo, M. K. (2019). The molecular and cellular mechanisms of depression: a focus on reward circuitry. *Mol Psychiatry*, 24(12), 1798-1815. doi:10.1038/s41380-019-0415-3
- Fuentes Paredes, F. M., Mendoza Yanavilca, R. A., Rosales Fernández, A. L., & Cisneros Tarmeño, R. A. (2008). GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATÓNGUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATÓN. In C. N. d. P. B. I. N. d. Salud (Ed.), (pp. 54). Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú No: 2008 - 06854.
- Gamage, T. F., Barrus, D. G., Kevin, R. C., Finlay, D. B., Lefever, T. W., Patel, P. R., . . . Thomas, B. F. (2020). In vitro and in vivo pharmacological evaluation of the synthetic cannabinoid receptor agonist EG-018. *Pharmacol Biochem Behav*, 193, 172918. doi:10.1016/j.pbb.2020.172918
- Gamaledin, I., Wertheim, C., Zhu, A. Z., Coen, K. M., Vemuri, K., Makryannis, A., . . . Le Foll, B. (2012). Cannabinoid receptor stimulation increases motivation for nicotine and nicotine seeking. *Addict Biol*, 17(1), 47-61. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00314.x
- Ganon-Elazar, E., & Akirav, I. (2009). Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. *J Neurosci*, 29(36), 11078-11088. doi:10.1523/JNEUROSCI.1223-09.2009
- Garcia-Batista, Z. E., Guerra-Pena, K., Cano-Vindel, A., Herrera-Martinez, S. X., & Medrano, L. A. (2018). Validity and reliability of the Beck Depression Inventory (BDI-II) in general and hospital population of Dominican Republic. *PLoS One*, 13(6), e0199750. doi:10.1371/journal.pone.0199750
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Gasparyan, A., & Manzanares, J. (2021). Therapeutic potential of the cannabinoid receptor 2 in neuropsychiatry.

Exploration of Neuroprotective Therapy, 1, 55–71.
doi:10.37349/ent.2021.00006

- Garcia-Keller, C., Martinez, S. A., Esparza, M. A., Bollati, F., Kalivas, P. W., & Cancela, L. M. (2013). Cross-sensitization between cocaine and acute restraint stress is associated with sensitized dopamine but not glutamate release in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*, 37(6), 982-995. doi:10.1111/ejn.12121
- Gasparyan, A., Navarrete, F., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., & Manzanares, J. (2021). Cannabidiol Modulates Behavioural and Gene Expression Alterations Induced by Spontaneous Cocaine Withdrawal. *Neurotherapeutics*, 18(1), 615-623. doi:10.1007/s13311-020-00976-6
- Gauthier, G., Mucha, L., Shi, S., & Guerin, A. (2019). Economic burden of relapse/recurrence in patients with major depressive disorder. *J Drug Assess*, 8(1), 97-103. doi:10.1080/21556660.2019.1612410
- Gerald Gartlehner et al. (2008). Comparative Benefits and Harms of Second-Generation Antidepressants: Background Paper for the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*, 149, 734-750. doi:10.7326/0003-4819-149-10-200811180-00008
- Gerfen, C. H., Miyachi, S., Paletzki, R., & Brown, P. (2002). D1 Dopamine Receptor Supersensitivity in the Dopamine-Depleted Striatum Results from a Switch in the Regulation of ERK1/2/MAP Kinase. *The Journal of Neuroscience*, 22, 5042-5054. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-12-05042.2002
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*, 34, 441-466. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113641
- Gobbi, G., Bambico, F. R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., . . . Piomelli, D. (2005). Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51), 18620-18625. doi:10.1073/pnas.0509591102
- Goldsmith, Z. G., & Dhanasekaran, D. N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26(22), 3122-3142. doi:10.1038/sj.onc.1210407
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*, 1071(1), 10-23. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.035
- Gorzalka, B. B., & Hill, M. N. (2011). Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. *Prog*

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 35(7), 1575-1585.
doi:10.1016/j.pnpbp.2010.11.021

- Griebel, G., Stemmelin, J., Lopez-Grancha, M., Fauchey, V., Slowinski, F., Pichat, P., . . . Bergis, O. E. (2018). The selective reversible FAAH inhibitor, SSR411298, restores the development of maladaptive behaviors to acute and chronic stress in rodents. *Sci Rep*, 8(1), 2416. doi:10.1038/s41598-018-20895-z
- Gunduz-Cinar, O., Hill, M. N., McEwen, B. S., & Holmes, A. (2013). Amygdala FAAH and anandamide: mediating protection and recovery from stress. *Trends Pharmacol Sci*, 34(11), 637-644. doi:10.1016/j.tips.2013.08.008
- 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. doi:10.1037/h0071444
- Hao, Y., Ge, H., Sun, M., & Gao, Y. (2019). Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *Int J Mol Sci*, 20(19). doi:10.3390/ijms20194827
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2007). Ca(2+)-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol*, 17(3), 360-365. doi:10.1016/j.conb.2007.03.012
- Henricks, A. M., Berger, A. L., Lugo, J. M., Baxter-Potter, L. N., Bieniasz, K. V., Craft, R. M., & McLaughlin, R. J. (2016). Sex differences in alcohol consumption and alterations in nucleus accumbens endocannabinoid mRNA in alcohol-dependent rats. *Neuroscience*, 335, 195-206. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.08.032
- Hill, M. N., Carrier, E. J., McLaughlin, R. J., Morrish, A. C., Meier, S. E., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2008). Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem*, 106(6), 2322-2336. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05567.x
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2009). Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. *JAMA*, 301(11), 1165-1166. doi:10.1001/jama.2009.369
- Ho, S. C., Chong, H. Y., Chaiyakunapruk, N., Tangiisuran, B., & Jacob, S. A. (2016). Clinical and economic impact of non-adherence to antidepressants in major depressive disorder: A systematic review. *J Affect Disord*, 193, 1-10. doi:10.1016/j.jad.2015.12.029
- Holly, E. N., DeBold, J. F., & Miczek, K. A. (2015). Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area.

- Psychopharmacology (Berl)*, 232(24), 4469-4479. doi:10.1007/s00213-015-4082-z
- Holly, E. N., & Miczek, K. A. (2016). Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(2), 163-186. doi:10.1007/s00213-015-4151-3
- Huang, W. J., Chen, W. W., & Zhang, X. (2016). Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). *Mol Med Rep*, 14(4), 2899-2903. doi:10.3892/mmr.2016.5585
- Huzarska, M., Zieliński, M., & Herman, Z. S. (2006). Repeated treatment with antidepressants enhances dopamine D1 receptor gene expression in the rat brain. *Eur J Pharmacol*, 532(3), 208-213. doi:10.1016/j.ejphar.2005.09.069
- Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Signaling and Bias. *Cannabis Cannabinoid Res*, 2(1), 48-60. doi:10.1089/can.2016.0037
- International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics. (2022). *ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics*. Retrieved from <https://icd.who.int/browse11/1-m/en>
- Jacob, K. S. (2012). Depression: a major public health problem in need of a multi-sectoral response. *Indian J Med Res* 136, 537-539.
- Janero, D. R., & Makriyannis, A. (2009). Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opin Emerg Drugs*, 14(1), 43-65. doi:10.1517/14728210902736568
- Jiang, H. X., Ke, B. W., Liu, J., Ma, G., Hai, K. R., Gong, D. Y., . . . Zhou, C. (2019). Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase Improves Depressive-Like Behaviors Independent of Its Peripheral Antinociceptive Effects in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Anesth Analg*, 129(2), 587-597. doi:10.1213/ANE.0000000000003563
- Jin, X. H., Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2007). Discovery and characterization of a Ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*, 282(6), 3614-3623. doi:10.1074/jbc.M606369200
- Julian, M. D., Martin, A. B., Cuellar, B., De Fonseca, F. R., Navarro, R., Moratalla, M., & Garcia-Segura, L. M. (2003). Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal gangli. *Neuroscience* 119(1), 309-318. doi:10.1016/S0306-4522(03)00070-8

- Kirkedal, C., Wegener, G., Moreira, F., Joca, S. R. L., & Liebenberg, N. (2017). A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. *Acta Neuropsychiatr*, 29(6), 324-329. doi:10.1017/neu.2016.68
- Klok, M. D., Alt, S. R., Irurzun Lafitte, A. J., Turner, J. D., Lakke, E. A., Huitinga, I., . . . Derijk, R. H. (2011). Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA and its splice variants in postmortem brain regions of patients with major depressive disorder. *J Psychiatr Res*, 45(7), 871-878. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.12.002
- Kobayashi, K., Haneda, E., Higuchi, M., Suhara, T., & Suzuki, H. (2012). Chronic Fluoxetine Selectively Upregulates Dopamine D1-Like Receptors in the Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37, 1500-1558. doi:10.1038/npp.2011.335
- Köhler, J. C., Gröger, N., Lesse, A., Guara Ciurana, S., Rether, K., Fegert, J., . . . Braun, K. (2019). Early-Life Adversity Induces Epigenetically Regulated Changes in Hippocampal Dopaminergic Molecular Pathways. *Mol Neurobiol*, 56(5), 3616-3625. doi:10.1007/s12035-018-1199-1
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*, 1916, 99-103. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2011). Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci*, 7, 121-147. doi:10.1007/7854_2010_108
- Kucera, R., Bouskila, J., Elkrief, L., Fink-Jensen, A., Palmour, R., Bouchard, J. F., & Pfitto, M. (2018). Expression and localization of CB1R, NAPE-PLD, and FAAH in the vervet monkey nucleus accumbens. *Sci Rep*, 8(1), 8689. doi:10.1038/s41598-018-26826-2
- Laplante, F., Dufresne, M. M., Ouboudinar, J., Ochoa-Sanchez, R., & Sullivan, R. M. (2013). Reduction in cholinergic interneuron density in the nucleus accumbens attenuates local extracellular dopamine release in response to stress or amphetamine. *Synapse*, 67(1), 21-29. doi:10.1002/syn.21612
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., . . . Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168-176. doi:10.1038/nature05453
- Leo, L. M., & Abood, M. E. (2021). CB1 Cannabinoid Receptor Signaling and Biased Signaling. *Molecules*, 26(17). doi:10.3390/molecules26175413
- Linares, I. M., Zuardi, A. W., Pereira, L. C., Queiroz, R. H., Mechoulam, R., Guimaraes, F. S., & Crippa, J. A. (2019). Cannabidiol presents an inverted

U-shaped dose-response curve in a simulated public speaking test. *Braz J Psychiatry*, 41(1), 9-14. doi:10.1590/1516-4446-2017-0015

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Llorente-Berzal, A., Assis, M. A., Rubino, T., Zamberletti, E., Marco, E. M., Parolaro, D., . . . Viveros, M. P. (2013). Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure. *Pharmacol Res*, 74, 23-33. doi:10.1016/j.phrs.2013.05.001
- Lopez-Duran, N. L., Kovacs, M., & George, C. J. (2009). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 34(9), 1272-1283. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.03.016
- Lu, J., Cheng, Y., Xie, X., Woodson, K., Bonifacio, J., Disney, E., . . . Wang, J. (2021). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Medium Spiny Neurons in the Posterior Dorsomedial Striatum. *eNeuro*, 8(1). doi:10.1523/ENEURO.0348-20.2020
- Lucas Luz, W., Santos-Silva, M., Cardoso, P. B., Assad, N., Moraes, E., Grisolia, A. B. A., . . . Herculano, A. M. (2020). Putative Activation of the CB1 Cannabinoid Receptors Prevents Anxiety-Like Behavior, Oxidative Stress, and GABA Decrease in the Brain of Zebrafish Submitted to Acute Restraint Stress. *Front Behav Neurosci*, 14, 598812. doi:10.3389/fnbeh.2020.598812
- Lucki, I., Dalvi, A., & Mayorga, A. J. (2001). Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 155(3), 315-322. doi:10.1007/s002130100694
- Maccarrone, M. (2017). Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci*, 10, 166. doi:10.3389/fnmol.2017.00166
- Marco, E. M., Echeverry-Alzate, V., López-Moreno, J. A., Giné, E., Peñasco, S., & Viveros, M. P. (2014). Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. *Behav Pharmacol*, 25(5-6), 547-556. doi:10.1097/FBP.0000000000000068
- Martel, J. C., & Gatti McArthur, S. (2020). Dopamine Receptor Subtypes, Physiology and Pharmacology: New Ligands and Concepts in Schizophrenia. *Front Pharmacol*, 11, 1003. doi:10.3389/fphar.2020.01003
- Masi, G., & Brovedani, P. (2011). The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs*, 25(11), 913-931. doi:10.2165/11595900-000000000-00000

- Mateo, Y., Johnson, K. A., Covey, D. P., Atwood, B. K., Wang, H. L., Zhang, S., . . . Lovinger, D. M. (2017). Endocannabinoid Actions on Cortical Terminals Orchestrate Local Modulation of Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Neuron*, 96(5), 1112-1126 e1115. doi:10.1016/j.neuron.2017.11.012
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal*, 11(1), 34. doi:10.1186/1478-811X-11-34
- Menard, C., Hodes, G. E., & Russo, S. J. (2016). Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience*, 321, 138-162. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.053
- Moreira, F. A., Grieb, M., & Lutz, B. (2009). Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23(1), 133-144. doi:10.1016/j.beem.2008.09.003
- Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; , 392, 1789–1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7
- Navarria, A., Tamburella, A., Iannotti, F. A., Micale, V., Camillieri, G., Gozzo, L., . . . Di Marzo, V. (2014). The dual blocker of FAAH/TRPV1 N-arachidonoylserotonin reverses the behavioral despair induced by stress in rats and modulates the HPA-axis. *Pharmacol Res*, 87, 151-159. doi:10.1016/j.phrs.2014.04.014
- Neve, K. A., Seamans, J. K., & Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine Receptor Signaling. *JOURNAL OF RECEPTORS AND SIGNAL TRANSDUCTION* 24, 165-205. doi:10.1081/LRST-200029981
- Obando, R. U., Alosilla, L. A., Riquelme, E. B., Paredes, P. C., & Freyre, L. I. R. (2008). *Guia de Practica Clinica en Salud Mental y Psiquiatria*. Retrieved from bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1756.pdf
- Orio, L., Edwards, S., George, O., Parsons, L. H., & Koob, G. F. (2009). A role for the endocannabinoid system in the increased motivation for cocaine in extended-access conditions. *J Neurosci*, 29(15), 4846-4857. doi:10.1523/JNEUROSCI.0563-09.2009
- Papagianni, E. P., & Stevenson, C. W. (2019). Cannabinoid Regulation of Fear and Anxiety: an Update. *Curr Psychiatry Rep*, 21(6), 38. doi:10.1007/s11920-019-1026-z
- Patel, S., & Hillard, C. J. (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an

- anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(1), 304-311. doi:10.1124/jpet.106.101287
- Peleg, S., Varon, D., Ivanina, T., Dessauer, C. W., & Dascal, N. (2002). G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron*, 33, 87-99. doi:10.1016/s0896-6273(01)00567-0
- Penninx, B. W. J. H., Lamers, F., & Milaneschi, Y. (2018). Clinical heterogeneity in major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 28, S59-S60. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.12.090
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T. R., . . . Putman, D. (2006). Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev*, 12(1), 21-38. doi:10.1111/j.1527-3458.2006.00021.x
- Polissidis, A., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Antoniou, K. (2013). The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(2), 393-403. doi:10.1017/S1461145712000156
- Porsolt, R. D. (2000). Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci*, 11(1), 53-58. doi:10.1515/revneuro.2000.11.1.53
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732. doi:10.1038/266730a0
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1997). Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8866-8871. doi:10.1073/pnas.94.16.8866
- Quilty, L. C., Robinson, J. J., Rolland, J. P., Fruyt, F. D., Rouillon, F., & Bagby, R. M. (2013). The structure of the Montgomery-Asberg depression rating scale over the course of treatment for depression. *Int J Methods Psychiatr Res*, 22(3), 175-184. doi:10.1002/mpr.1388
- Rademacher, D. J., Meier, S. E., Shi, L., Ho, W. S., Jarrhian, A., & Hillard, C. J. (2008). Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*, 54(1), 108-116. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.06.012
- Rafiei, D., & Kolla, N. J. (2021). Elevated Brain Fatty Acid Amide Hydrolase Induces Depressive-Like Phenotypes in Rodent Models: A Review. *Int J Mol Sci*, 22(3). doi:10.3390/ijms22031047

- Realini, N., Vigano, D., Guidali, C., Zamberletti, E., Rubino, T., & Parolaro, D. (2011). Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology*, *60*(2-3), 235-243. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.09.003
- Ren, S. Y., Wang, Z. Z., Zhang, Y., & Chen, N. H. (2020). Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases-focusing on FAAH/MAGL inhibitors. *Acta Pharmacol Sin*, *41*(10), 1263-1271. doi:10.1038/s41401-020-0385-7
- Riegel, A. C., & Lupica, C. R. (2004). Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, *24*(49), 11070-11078. doi:10.1523/JNEUROSCI.3695-04.2004
- Romano-López, A., Méndez-Díaz, M., García, F. G., Regalado-Santiago, C., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2016). Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. *Dev Neurobiol*, *76*(8), 819-831. doi:10.1002/dneu.22361
- Roohbakhsh, A., Keshavarz, S., Hasanein, P., Rezvani, M. E., & Moghaddam, A. H. (2009). Role of endocannabinoid system in the ventral hippocampus of rats in the modulation of anxiety-like behaviours. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, *105*(5), 333-338. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00449.x
- Rubio, J., Caldas, M., Davila, S., Gasco, M., & Gonzales, G. F. (2006). Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complement Altern Med*, *6*, 23. doi:10.1186/1472-6882-6-23
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*, *14*(9), 609-625. doi:10.1038/nrn3381
- Sanudo-Pena, M. C., Romero, J., Seale, G., Fernandez-Ruiz, J., & Walker, J. M. (2000). Activational role of cannabinoids on movement. *European Journal of Pharmacology*, *391* 269–227. doi:10.1016/s0014-2999(00)00044-3
- Sartim, A. G., Moreira, F. A., & Joca, S. R. L. (2017). Involvement of CB1 and TRPV1 receptors located in the ventral medial prefrontal cortex in the modulation of stress coping behavior. *Neuroscience*, *340*, 126-134. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.031
- Segev, A., Rubin, A. S., Abush, H., Richter-Levin, G., & Akirav, I. (2014). Cannabinoid receptor activation prevents the effects of chronic mild stress on emotional learning and LTP in a rat model of depression. *Neuropsychopharmacology*, *39*(4), 919-933. doi:10.1038/npp.2013.292

- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*(96), e52434. doi:10.3791/52434
- Serrano, A., & Parsons, L. H. (2011). Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther*, 132(3), 215-241. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.06.005
- Sesack, S. R., & Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 27-47. doi:10.1038/npp.2009.93
- Smith, R. J., Lobo, M. K., Spencer, S., & Kalivas, P. W. (2013). Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways). *Curr Opin Neurobiol*, 23(4), 546-552. doi:10.1016/j.conb.2013.01.026
- Soares-Cunha, C., de Vasconcelos, N. A. P., Coimbra, B., Domingues, A. V., Silva, J. M., Loureiro-Campos, E., . . . Rodrigues, A. J. (2020). Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol Psychiatry*, 25(12), 3241-3255. doi:10.1038/s41380-019-0484-3
- Stetler, C., & Miller, G. E. (2011). Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*, 73(2), 114-126. doi:10.1097/PSY.0b013e31820ad12b
- Stojanovska, L., Law, C., Lai, B., Chung, T., Nelson, K., Day, S., . . . Haines, C. (2015). Maca reduces blood pressure and depression, in a pilot study in postmenopausal women. *Climacteric*, 18(1), 69-78. doi:10.3109/13697137.2014.929649
- Sufian, M. S., Amin, M. R., & Ali, D. W. (2021). Early suppression of the endocannabinoid degrading enzymes FAAH and MAGL alters locomotor development in zebrafish. *J Exp Biol*, 224(16). doi:10.1242/jeb.242635
- Tai, S., Nikas, S. P., Shukla, V. G., Vemuri, K., Makriyannis, A., & Jarbe, T. U. (2015). Cannabinoid withdrawal in mice: inverse agonist vs neutral antagonist. *Psychopharmacology (Berl)*, 232(15), 2751-2761. doi:10.1007/s00213-015-3907-0
- Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G., & Sprang, S. R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science*, 278(5345), 1907-1916. doi:10.1126/science.278.5345.1907
- Touhara, K. K., & MacKinnon, R. (2018). Molecular basis of signaling specificity between GIRK channels and GPCRs. *Structural Biology and Molecular Biophysics*. Retrieved from <https://elifesciences.org/articles/42908>

- Valverde, O., & Torrens, M. (2012). CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. *Neuroscience*, *204*, 193-206. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.09.031
- Vieira, G., Cavalli, J., Goncalves, E. C. D., Braga, S. F. P., Ferreira, R. S., Santos, A. R. S., . . . Dutra, R. C. (2020). Antidepressant-Like Effect of Terpeneol in an Inflammatory Model of Depression: Involvement of the Cannabinoid System and D2 Dopamine Receptor. *Biomolecules*, *10*(5). doi:10.3390/biom10050792
- Vinod, K. Y., Xie, S., Psychoyos, D., Hungund, B. L., Cooper, T. B., & Tejani-Butt, S. M. (2012). Dysfunction in fatty acid amide hydrolase is associated with depressive-like behavior in Wistar Kyoto rats. *PLoS One*, *7*(5), e36743. doi:10.1371/journal.pone.0036743
- Waleh, N. S., Cravatt, B. F., Apte-Deshpande, A., Terao, A., & Kilduff, T. S. (2002). Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* *291*, 203–210. doi:10.1016/s0378-1119(02)00598-x
- Wearick-Silva, L. E., Orso, R., Martins, L. A., Creutzberg, K. C., Centeno-Silva, A., Xavier, L. L., . . . Mestriner, R. G. (2019). Dual influences of early life stress induced by limited bedding on walking adaptability and Bdnf/TrkB and Drd1/Drd2 gene expression in different mouse brain regions. *Behav Brain Res*, *359*, 66-72. doi:10.1016/j.bbr.2018.10.025
- Williams, L. M. (2016). Precision psychiatry: a neural circuit taxonomy for depression and anxiety. *The Lancet Psychiatry*, *3*, 472-480. doi:10.1016/S2215-0366(15)00579-9
- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*, *13*(3), 169-188. doi:10.1097/00008877-200205000-00001
- World Health Organization: The global burden of disease: 2004 update.* . (2004).
- Wu, H., Kelley, C. J., Pino-Figueroa, A., Vu, H. D., & Maher, T. J. (2013). Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorg Med Chem*, *21*(17), 5188-5197. doi:10.1016/j.bmc.2013.06.034
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*(97). doi:10.3791/52587
- Ye, L., Cao, Z., Wang, W., & Zhou, N. (2019). New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol*, *12*(3), 239-248. doi:10.2174/1874467212666190215112036
- Yu, N., Tucker, K. R., Levitan, E. S., Shepard, P. D., & Canavier, C. C. (2014). Implications of cellular models of dopamine neurons for schizophrenia.

Prog Mol Biol Transl Sci, 123, 53-82. doi:10.1016/B978-0-12-397897-4.00011-5

- Zanelati, T. V., Biojone, C., Moreira, F. A., Guimaraes, F. S., & Joca, S. R. (2010). Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol*, 159(1), 122-128. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00521.x
- Zhang, H. Y., Gao, M., Liu, Q. R., Bi, G. H., Li, X., Yang, H. J., . . . Xi, Z. X. (2014). Cannabinoid CB₂ receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(46), E5007-5015. doi:10.1073/pnas.1413210111
- Zhang, H. Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G. H., Yang, H. J., Liu, Q. R., . . . Xi, Z. X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB. *Addict Biol*, 22(3), 752-765. doi:10.1111/adb.12367
- Zhang, J. C., Wu, J., Fujita, Y., Yao, W., Ren, Q., Yang, C., . . . Hashimoto, K. (2014). Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*, 18(4). doi:10.1093/ijnp/pyu077
- Zhen, X., Uryu, K., Wang, H. Y., & Friedman, E. (1998). D₁ dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol*, 54(3), 453-458. doi:10.1124/mol.54.3.453

XI. ANEXOS

Anexo 1. Certificados de análisis de drogas

MACOMCH-01



Medalchemistry

Ancha de Castelar 46-48, entr. A
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante), Spain.
Tel & Fax: +34 965 909 701
www.medalchemistry.com

Product Name: (9Z,12Z)-N-benzylheptadeca-9,12-dienamide (MACA1) (for investigational use)

Reference: MACA1

Formula: C₂₅H₃₈NO

Molecular weight: 369.58

Lot No.: RA-MAC-05

Storage: 5 °C under nitrogen

Manufacture date: November 2019

Analysis No.: N/A

Analysis date: November 2019

Retest date: To be determined

Version: 00

Certificate of Analysis

Test	Result
Description (Physical examination)	off-white powder
Identification A (IR)	Concordant with the structure
Identification C (H NMR)	Concordant with the structure
Purity (CG)	>99%
Residual solvents (GC)	Acetone= 33 ppm

Date: 08 November 2019

Signed: Raquel Aizmanisa

Anexo 1. Certificados de análisis de drogas (continuación)

Fluoxetina HCl

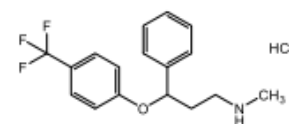


www.sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

FLUOXETINE HYDROCHLORIDE

Product no.: PHR1394-1G
Lot no.: LRAC3045
Description of CRM: White powder
Expiry date: 31 October 2023
Storage: Room Temperature/Protect from Light
Certificate version: LRAC3045.2 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopoeia Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigmaaldrich.com for the most current version.)
Chemical formula: C₁₇H₁₈F₃NO · HCl
Molecular mass: 345.8
CAS No.: 56296-78-7



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty U , $U=k \cdot u$ ($k=$) (Mass Balance/basis)
Fluoxetine HCl	100.0 % U _{CRM} = ± 0.2 %, k = 2.0 (as is basis)

Metrological traceability: Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

Measurement method: Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

Intended use: Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.


Minimum sample size: 20 mg

Instructions for handling and correct use: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.


Health and safety information: All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

Accreditation: Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

Certificate issue date: 30 November 2020



[Andy Ommen; Quality Control]



[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;
Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; www.sigmaaldrich.com
Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Anexo 2. Peso de ratones y dosis de drogas administradas

Administración de dosis de macamida (i.p) en ratones BALB/c machos

Inyecciones: Jhordy Alfaro
Responsable: Carlos Medina
Fecha: 31/10/2021

Preparación de drogas: Carlos Medina

Hora de Inicio habituación: _____

T°/H% sala: _____

Tiempo de habituación: 60 min

Hora de Inicio inyecciones: _____

Jaula	ID	Cepa	Sexo	Peso (g) 28/10/21	Grupo	Dosis (mg/kg)	Volumen a administrar (mL)	Grupo de evaluación	Hora de administración	Hora de evaluación	Hora de sacrificio
A46	A46-M0	BALB/c	M	39	MCH 3mg/kg	3	0.39	1	12h00-12h01	13h00-13h06	14h00
	A46-M1	BALB/c	M	41	MCH 10mg/kg	10	0.41	1			
	A46-M2	BALB/c	M	38	MCH 30mg/kg	30	0.38	1			
	A46-M3	BALB/c	M	38	Vehículo		0.38	2	12h08-12h09	13h08-13h14	14h08
	A46-M4	BALB/c	M	37	MCH 10mg/kg	10	0.37	2			
	A47-M1	BALB/c	M	33	MCH 3mg/kg	3	0.33	2			
	A47-M2	BALB/c	M	36	MCH 10mg/kg	10	0.36	3	12h16-12h17	13h16-13h22	14h16
	A47-M3	BALB/c	M	42	MCH 30mg/kg	30	0.42	3			
	A47-M4	BALB/c	M	34	Vehículo		0.34	3			
	A48-M0	BALB/c	M	31	MCH 3mg/kg	3	0.31	4	12h24-12h25	13h24-13h30	14h24
	A48-M1	BALB/c	M	32	MCH 10mg/kg	10	0.32	4			
	A48-M2	BALB/c	M	34	MCH 30mg/kg	30	0.34	4			
	A48-M3	BALB/c	M	38	Vehículo		0.38	5	12h32-12h33	13h32-13h38	14h32
	A48-M4	BALB/c	M	36	MCH 30mg/kg	30	0.36	5			
	A53-M0	BALB/c	M	38	MCH 3mg/kg	3	0.38	5			
	A53-M1	BALB/c	M	35	MCH 10mg/kg	10	0.35	6	12h40-12h41	13h40-13h46	14h40
	A53-M2	BALB/c	M	39	MCH 30mg/kg	30	0.39	6			
	A53-M3	BALB/c	M	37	Vehículo		0.37	6			
	A53-M4	BALB/c	M	33	Vehículo		0.33	7	12h48-12h49	13h48-13h54	14h48
	A54-M1	BALB/c	M	36	MCH 3mg/kg	3	0.36	7			
	A54-M2	BALB/c	M	33	MCH 10mg/kg	10	0.33	7			
	A54-M3	BALB/c	M	39	MCH 30mg/kg	30	0.39	8	12h52-12h53	13h52-13h58	14h52
	A54-M4	BALB/c	M	35	Vehículo		0.35	8			
	A55-M1	BALB/c	M	37	MCH 3mg/kg	3	0.37	8			
	A55-M2	BALB/c	M	34	MCH 10mg/kg	10	0.34	9	13h00-13h01	14h00-14h06	15h00
	A55-M3	BALB/c	M	33	MCH 30mg/kg	30	0.33	9			
	A55-M4	BALB/c	M	33	Vehículo		0.33	9			
	A57-M0	BALB/c	M	39	MCH 3mg/kg	3	0.39	10	13h08-13h09	14h08-14h14	15h08
	A57-M1	BALB/c	M	33	MCH 10mg/kg	10	0.33	10			
	A57-M2	BALB/c	M	32	MCH 30mg/kg	30	0.32	10			
	A57-M3	BALB/c	M	27	Vehículo		0.27	11	13h16-13h17	14h16-14h22	15h16
	A57-M4	BALB/c	M	34	MCH 3mg/kg	3	0.34	11			
	A58-M1	BALB/c	M	Murió				11			
	A58-M2	BALB/c	M	38	MCH 3mg/kg	3	0.38	12	13h24-13h25	14h24-14h30	15h24
	A58-M3	BALB/c	M	33	MCH 30mg/kg	30	0.33	12			
	A58-M4	BALB/c	M	38	Vehículo		0.38	12			
A3	A03-M0	BALB/c	M	25	Vehículo		0.25	13	8h00-8h02	9h00-9h06	10h06
A8	A08-M0	BALB/c	M	36	MCH 3mg/kg	3	0.36	13			10h06
A1	A01-M0	BALB/c	M	39	MCH 10mg/kg	10	0.39	13			10h09
A2	A02-M0	BALB/c	M	47	MCH 30mg/kg	30	0.47	13	8h08-8h10	9h08-9h14	10h09
A3	A03-M1	BALB/c	M	25	Vehículo		0.25	14			10h14
A8	A08-M1	BALB/c	M	35	MCH 3mg/kg	3	0.35	14			10h14
A1	A01-M1	BALB/c	M	41	MCH 10mg/kg	10	0.41	14	8h16-8h18	9h16-9h22	10h17
A2	A02-M1	BALB/c	M	35	MCH 30mg/kg	30	0.35	14			10h17
A3	A03-M2	BALB/c	M	34	Vehículo		0.34	15			10h22
A8	A08-M2	BALB/c	M	40	MCH 3mg/kg	3	0.40	15	8h24-8h26	9h24-9h30	10h22
A1	A01-M2	BALB/c	M	45	MCH 10mg/kg	10	0.45	15			10h22
A2	A02-M2	BALB/c	M	38	MCH 30mg/kg	30	0.38	15			10h25
A3	A03-M3	BALB/c	M	31	Vehículo		0.31	16	8h32-8h34	9h32-9h38	10h30
A8	A08-M3	BALB/c	M	40	MCH 3mg/kg	3	0.40	16			10h30
A1	A01-M3	BALB/c	M	41	MCH 10mg/kg	10	0.41	16			10h33
A2	A02-M3	BALB/c	M	41	MCH 30mg/kg	30	0.41	16	8h32-8h34	9h32-9h38	10h33
A3	A03-M4	BALB/c	M	39	Vehículo		0.39	17			10h38
A8	A08-M4	BALB/c	M	40	MCH 3mg/kg	3	0.40	17			10h38
A1	A01-M4	BALB/c	M	42	MCH 10mg/kg	10	0.42	17	9h12-9h14	10h12-10h18	10h41
A2	A02-M4	BALB/c	M	40	MCH 30mg/kg	30	0.40	17			10h41
A4	A04-M0	BALB/c	M	33	Fluoxetina		0.33	18			11h18
A4	A04-M1	BALB/c	M	35	Fluoxetina		0.35	18	9h20-9h22	10h20-10h26	11h18
A4	A04-M2	BALB/c	M	39	Fluoxetina		0.39	19			11h26
A4	A04-M3	BALB/c	M	37	Fluoxetina		0.37	19			11h26
A4	A04-M4	BALB/c	M	32	Fluoxetina		0.32	20	9h28	10h28-10h34	11h34

Anexo 2. Peso de ratones y dosis de drogas administradas (continuación)

Grupo 2 Orden de administración de MCH1 y evaluación LDB
 Fecha: 6/30/2021 Responsal Grace Pardo

Orden	ID animal	Dosis equivalente (mL)	Hora de dosis	Hora de evaluación	Hora de colecta de encéfalos	Almacenamiento
1	A16-M0	0.31	8h00-	8h30-	9h35	Veh-Machos
	A15-M0	0.39	8h01	8h35	9h35	10mg-Machos
2	A17-M1	0.36	8h05-	8h36-	9h41	30mg-Machos
	A14-M0	0.30	8h06	8h41	9h41	Midazolam-Machos
3	A16-M1	0.36	8h11-	8h42-	9h47	Veh-Machos
	A15-M1	0.37	8h12	8h47	9h47	10mg-Machos
4	A17-M2	0.25	8h17-	8h48-	9h53	30mg-Machos
	A14-M1	0.30	8h18	8h53	9h53	Midazolam-Machos
5	A16-M2	0.33	8h23-	8h54-	9h59	Veh-Machos
	A15-M2	0.40	8h24	8h59	9h59	10mg-Machos
6	A17-M3	0.44	8h29-	9h00-	10h05	30mg-Machos
	A14-M2	0.29	8h30	9h05	10h05	Midazolam-Machos
7	A16-M3	0.31	8h35-	9h06-	10h11	Veh-Machos
	A15-M3	0.34	8h36	9h11	10h11	10mg-Machos
8	A15-M4	0.37	8h41-	9h12-	10h17	10mg-Machos
	A17-M0	0.38	8h42	9h17	10h17	30mg-Machos
9	A17-M4	0.37	8h47-	9h18-	10h23	30mg-Machos
	A14-M3	0.31	8h48	9h23	10h23	Midazolam-Machos
10	A17-M5	0.37	8h53-	9h23-	10h29	30mg-Machos
	A14-M4	0.33	8h54	9h28	10h29	Midazolam-Machos

Administración de dosis de macamida (i.p) en ratones BALB/c machos

Inyecciones: Jhordy Alfaro Preparación de drogas: Carlos Medina
 Responsable: Carlos Medina
 Fecha: 05/12/2021 Hora de Inicio habituación: _____ T*/H% sala: _____
 Tiempo de habituación: 60 min Hora de Inicio inyecciones: _____

Jaula	ID	Cepa	Sexo	Peso (g) 28/10/21	Grupo	Dosis (mg/kg)	Volumen a administrar (mL)	Grupo de evaluación	Hora de adm.	Hora de evaluación
	C1M0	BALB/c	M	35	Vehículo		0.35	1	11:37	12:37
	C1M1	BALB/c	M	38	Vehículo		0.38	1	12:03	13:03
	M1M1	BALB/c	M	30	MCH 10mg/kg	10	0.3	1	12:15	13:15
	C1M2	BALB/c	M	38	Vehículo		0.38	1	12:27	13:27
	M1M2	BALB/c	M	32	MCH 10mg/kg	10	0.32	1	12:39	13:39
	C1M3	BALB/c	M	38	Vehículo		0.38	1	12:51	13:51
	M1M3	BALB/c	M	31	MCH 10mg/kg	10	0.31	1	13:03	14:03
	C1M4	BALB/c	M	36	Vehículo		0.36	1	13:15	14:15
	M1M4	BALB/c	M	33	MCH 10mg/kg	10	0.33	1	13:27	14:27

*Los pertenecientes al segundo grupo solo recibirán vehículo

Administración de dosis de macamida (i.p) en ratones BALB/c machos

Inyecciones: Jhordy Alfaro Preparación de drogas: Carlos Medina
 Responsable: Carlos Medina
 Fecha: 06/12/2021 Hora de Inicio habituación: _____ T*/H% sala: _____
 Tiempo de habituación: 60 min Hora de Inicio inyecciones: _____

Jaula	ID	Cepa	Sexo	Peso (g) 28/10/21	Grupo	Dosis (mg/kg)	Volumen a administrar (mL)	Grupo de evaluación	Hora de administración	Hora de evaluación
	M1M0	BALB/c	M	40	MCH 10mg/kg	10	0.4	1	11:30	12:30
	C2M0	BALB/c	M	30	Vehículo		0.30	2	11:42	12:42
	M2M0	BALB/c	M	33	MCH 10mg/kg	10	0.33	2	11:54	12:54
	C2M1	BALB/c	M	27	Vehículo		0.27	2	12:06	13:06
	M2M1	BALB/c	M	37	MCH 10mg/kg	10	0.37	2	12:18	13:18
	C2M2	BALB/c	M	32	Vehículo		0.32	2	12:30	13:30
	M2M2	BALB/c	M	33	MCH 10mg/kg	10	0.33	2	12:42	13:42
	C2M3	BALB/c	M	34	Vehículo		0.34	2	12:54	13:54
	M2M3	BALB/c	M	35	MCH 10mg/kg	10	0.35	2	13:06	14:06
	C2M4	BALB/c	M	34	Vehículo		0.34	2	13:18	14:18

*Los pertenecientes al primer grupo solo recibirán vehículo

Anexo 3. Composición de reactivos usados en biología molecular

Mammalian Lysis Buffer (Buffer para lisado de células)

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
TRIS-HCl 1M pH 8	25 mM	25 μL
NaCl 5N	100 mM	20 μL
Tx-100	0.1 %	10 μL
SDS 10%	0.1 %	10 μL
EDTA 0.5M pH 8	1 mM	2 μL
2-mercaptoetanol	5%	50 μL
Agua DEPC	-	883 μL
Volumen total	-	1000 μL

Agua DEPC (libre de nucleasas)

Reactivo	Concentración final	Volumen (mL)
H ₂ O	-	999 mL
Dietilpolicarbonato (DEPC)	0.1 %	1 mL
Volumen total	-	1000 mL

Buffer TBE 1X

Reactivo	Concentración final	Cantidad
TRIS base	0.1 M	5.4 g
Ácido Bórico	0.1 M	2.75 g
EDTA 0.5 M pH 8	0.02 M	2mL
Agua DEPC	-	498 mL
Volumen total	-	500 mL

Gel de agarosa

Reactivo	1 %	2 %
Agarosa libre de nucleasas	0.4 g	0.8 g
TBE	40 mL	40 mL
Bromuro de etidio	5 μL	5 μL
Volumen total	40 mL	40 mL

Anexo 4. Registro de medición de RNA pre y post tratamiento con DNAsa

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	A01M0 NAc (-)	Lab. Investigación	18/08/2021 11:00:35 a.m.	170.9	ng/ul	4.272	2.263	1.89	0.83	RNA	40.00
2	H2O	Lab. Investigación	18/08/2021 11:05:33 a.m.	0.7	ng/ul	0.017	0.001	11.64	0.23	RNA	40.00
3	A03M0 NAc (-)	Lab. Investigación	18/08/2021 10:59:19 a.m.	217.9	ng/ul	5.446	2.832	1.92	1.06	RNA	40.00
4	A03M0 NAc (+)	Lab. Investigación	18/08/2021 12:46:59 p.m.	603.6	ng/ul	15.090	8.606	1.75	0.87	RNA	40.00
5	A03M0 NAc (+)	Lab. Investigación	18/08/2021 12:47:56 p.m.	78.9	ng/ul	1.972	1.073	1.84	0.78	RNA	40.00
6	A03M0 NAc (+)	Lab. Investigación	18/08/2021 12:48:48 p.m.	83.3	ng/ul	2.082	1.147	1.82	0.79	RNA	40.00
7	A03M0 NAc (+)	Lab. Investigación	18/08/2021 12:49:44 p.m.	79.9	ng/ul	1.997	1.092	1.83	0.78	RNA	40.00
8	A01M0 NAc (+)	Lab. Investigación	18/08/2021 12:50:33 p.m.	673.2	ng/ul	16.830	10.722	1.57	0.54	RNA	40.00
9	A01M0 NAc (+)	Lab. Investigación	18/08/2021 12:51:15 p.m.	82.1	ng/ul	2.053	1.153	1.78	0.65	RNA	40.00
10	H2O	Lab. Investigación	19/08/2021 01:04:31 p.m.	-81.5	ng/ul	-2.036	0.667	-3.05	15.85	RNA	40.00
11	H2O	Lab. Investigación	19/08/2021 01:05:52 p.m.	-62.3	ng/ul	-1.558	-0.150	10.39	9.70	RNA	40.00
12	H2O	Lab. Investigación	19/08/2021 01:07:12 p.m.	0.8	ng/ul	0.019	0.014	1.35	0.67	RNA	40.00
13	A03M1 NAc (-)	Lab. Investigación	19/08/2021 01:22:26 p.m.	187.2	ng/ul	4.679	2.600	1.80	0.29	RNA	40.00
14	A03M4 NAc (-)	Lab. Investigación	19/08/2021 01:23:34 p.m.	190.4	ng/ul	4.761	2.563	1.86	0.31	RNA	40.00
15	A01M3 NAc (-)	Lab. Investigación	19/08/2021 01:24:44 p.m.	181.7	ng/ul	4.543	2.449	1.85	0.28	RNA	40.00
16	A01M4 NAc (-)	Lab. Investigación	19/08/2021 01:25:41 p.m.	179.9	ng/ul	4.497	2.467	1.82	0.27	RNA	40.00
17	A03M4 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:12:05 p.m.	714.4	ng/ul	17.860	12.073	1.48	0.51	RNA	40.00
18	A03M1 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:10:58 p.m.	126.2	ng/ul	3.155	1.841	1.71	0.28	RNA	40.00
19	A03M4 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:12:55 p.m.	114.7	ng/ul	2.868	1.681	1.71	0.31	RNA	40.00
20	A01M3 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:14:00 p.m.	79.5	ng/ul	1.988	1.150	1.73	0.21	RNA	40.00
21	A01M3 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:14:53 p.m.	96.9	ng/ul	2.423	1.409	1.72	0.24	RNA	40.00
22	A01M3 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:15:47 p.m.	80.4	ng/ul	2.010	1.134	1.77	0.21	RNA	40.00
23	A01M4 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:16:48 p.m.	91.2	ng/ul	2.281	1.375	1.66	0.21	RNA	40.00
24	A08M1 NAc (-)	Lab. Investigación	24/08/2021 01:07:28 p.m.	221.8	ng/ul	5.545	2.941	1.89	0.88	RNA	40.00
25	A01M4 NAc (+)	Lab. Investigación	19/08/2021 03:17:38 p.m.	276.3	ng/ul	6.908	4.599	1.50	0.34	RNA	40.00
26	H2O	Lab. Investigación	24/08/2021 01:03:22 p.m.	1.0	ng/ul	0.025	0.008	3.13	1.43	RNA	40.00
27	A08M3 NAc (-)	Lab. Investigación	24/08/2021 01:08:43 p.m.	226.4	ng/ul	5.661	3.046	1.86	0.35	RNA	40.00
28	A08M4 NAc (-)	Lab. Investigación	24/08/2021 01:10:36 p.m.	220.7	ng/ul	5.518	2.992	1.84	0.37	RNA	40.00
29	A04M0 NAc (-)	Lab. Investigación	24/08/2021 01:11:43 p.m.	220.0	ng/ul	5.501	2.943	1.87	0.83	RNA	40.00
30	H2O	Lab. Investigación	24/08/2021 03:11:59 p.m.	0.8	ng/ul	0.019	0.026	0.73	0.22	RNA	40.00
31	A08M1 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:13:03 p.m.	93.2	ng/ul	2.329	1.299	1.79	0.60	RNA	40.00
32	A08M3 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:14:07 p.m.	111.4	ng/ul	2.784	1.638	1.70	0.25	RNA	40.00
33	A08M3 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:13:50 p.m.	220.8	ng/ul	5.521	3.491	1.58	0.33	RNA	40.00
34	A08M4 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:14:56 p.m.	121.9	ng/ul	3.048	1.823	1.67	0.26	RNA	40.00
35	A04M0 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:15:59 p.m.	74.8	ng/ul	1.870	1.042	1.79	0.61	RNA	40.00
36	A04M0 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:15:43 p.m.	72.7	ng/ul	1.817	0.977	1.86	0.63	RNA	40.00
37	A08M3 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:17:04 p.m.	438.3	ng/ul	10.958	7.055	1.55	0.41	RNA	40.00
38	A02M1 NAc (-)	Lab. Investigación	25/08/2021 02:14:07 p.m.	186.2	ng/ul	4.656	2.504	1.86	0.60	RNA	40.00
39	A08M3 NAc (+)	Lab. Investigación	24/08/2021 03:17:13 p.m.	289.2	ng/ul	7.230	4.744	1.52	0.36	RNA	40.00
40	H2O	Lab. Investigación	25/08/2021 02:09:48 p.m.	0.9	ng/ul	0.024	0.035	0.67	0.60	RNA	40.00

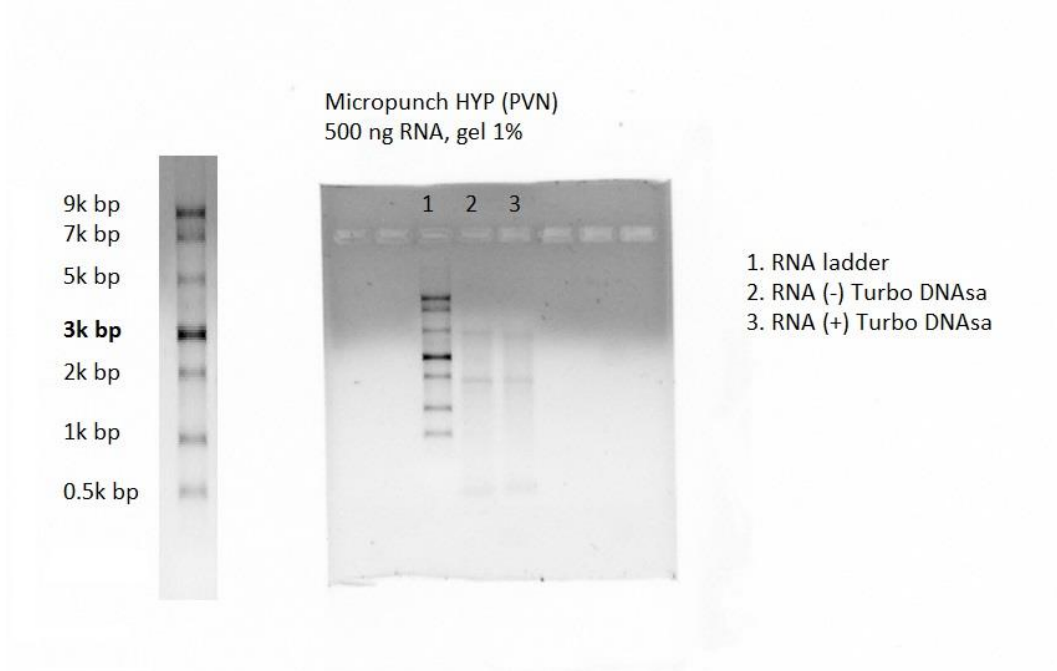
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
41	A02M3 NAc (-)	Lab. Investigación	25/08/2021 02:15:00 p.m.	219.9	ng/ul	5.497	2.939	1.87	0.66	RNA	40.00
42	A04M4 NAc (-)	Lab. Investigación	25/08/2021 02:17:44 p.m.	21.3	ng/ul	5.283	2.793	1.89	0.38	RNA	40.00
43	A02M4 NAc (-)	Lab. Investigación	25/08/2021 02:16:02 p.m.	247.5	ng/ul	6.188	3.248	1.91	0.48	RNA	40.00
44	A04M2 NAc (-)	Lab. Investigación	25/08/2021 02:16:51 p.m.	210.8	ng/ul	5.269	2.776	1.90	0.45	RNA	40.00
45	A02M1 NAc (+)	Lab. Investigación	25/08/2021 04:09:08 p.m.	73.7	ng/ul	1.842	1.055	1.75	0.49	RNA	40.00
46	H2O	Lab. Investigación	25/08/2021 04:08:03 p.m.	0.3	ng/ul	0.008	0.010	0.76	-7.37	RNA	40.00
47	A02M3 NAc (+)	Lab. Investigación	25/08/2021 04:09:59 p.m.	81.0	ng/ul	2.024	1.148	1.76	0.51	RNA	40.00
48	A02M4 NAc (+)	Lab. Investigación	25/08/2021 04:12:02 p.m.	92.6	ng/ul	2.315	1.278	1.81	0.40	RNA	40.00
49	A02M4 NAc (+)	Lab. Investigación	25/08/2021 04:10:50 p.m.	108.4	ng/ul	2.710	1.904	1.42	0.42	RNA	40.00
50	A04M2 NAc (+)	Lab. Investigación	25/08/2021 04:12:57 p.m.	84.5	ng/ul	2.113	1.174	1.80	0.38	RNA	40.00
51	A04M4 NAc (+)	Lab. Investigación	25/08/2021 04:13:56 p.m.	82.3	ng/ul	2.059	1.136	1.81	0.34	RNA	40.00
52	H2O	Lab. Investigación	03/09/2021 02:24:24 p.m.	1.2	ng/ul	0.031	0.018	1.68	0.44	RNA	40.00
53	H2O	Lab. Investigación	03/09/2021 02:23:52 p.m.	0.6	ng/ul	0.016	0.001	25.17	0.49	RNA	40.00
54	A01M1 NAc (-)	Lab. Investigación	03/09/2021 02:26:21 p.m.	223.8	ng/ul	5.596	2.978	1.88	1.36	RNA	40.00
55	A01M2 NAc (-)	Lab. Investigación	03/09/2021 02:27:21 p.m.	248.0	ng/ul	6.199	3.313	1.87	0.39	RNA	40.00
56	A03M2 NAc (-)	Lab. Investigación	03/09/2021 02:28:26 p.m.	230.8	ng/ul	5.770	3.048	1.89	0.42	RNA	40.00
57	A03M3 NAc (-)	Lab. Investigación	03/09/2021 02:29:20 p.m.	205.0	ng/ul	5.124	2.753	1.86	0.37	RNA	40.00
58	H2O	Lab. Investigación	03/09/2021 04:11:30 p.m.	-4.5	ng/ul	-0.112	-0.071	1.57	0.60	RNA	40.00
59	A03M3 NAc (-)	Lab. Investigación	03/09/2021 02:29:33 p.m.	201.8	ng/ul	5.044	2.723	1.85	0.36	RNA	40.00
60	H2O	Lab. Investigación	03/09/2021 04:12:32 p.m.	1.1	ng/ul	0.028	0.003	10.09	0.58	RNA	40.00
61	A03M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:13:31 p.m.	411.8	ng/ul	10.295	6.766	1.52	0.47	RNA	40.00
62	A03M3 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:15:39 p.m.	80.3	ng/ul	2.007	1.119	1.79	0.32	RNA	40.00
63	A01M1 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:17:06 p.m.	86.5	ng/ul	2.163	1.161	1.86	0.92	RNA	40.00
64	A03M3 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:15:53 p.m.	83.3	ng/ul	2.082	1.163	1.79	0.31	RNA	40.00
65	A01M1 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:17:15 p.m.	93.2	ng/ul	2.330	1.291	1.80	0.86	RNA	40.00
66	A01M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:18:02 p.m.	108.4	ng/ul	2.711	1.527	1.78	0.31	RNA	40.00
67	A01M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:18:30 p.m.	104.7	ng/ul	2.617	1.471	1.78	0.28	RNA	40.00
68	A01M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:18:10 p.m.	123.6	ng/ul	3.091	1.791	1.73	0.33	RNA	40.00
69	A01M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:18:19 p.m.	131.3	ng/ul	3.284	1.936	1.70	0.33	RNA	40.00
70	A03M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:19:33 p.m.	92.8	ng/ul	2.320	1.285	1.81	0.37	RNA	40.00
71	A03M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:19:41 p.m.	95.9	ng/ul	2.397	1.349	1.78	0.36	RNA	40.00
72	A03M3 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:20:46 p.m.	78.0	ng/ul	1.950	1.098	1.78	0.31	RNA	40.00
73	A03M3 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:20:56 p.m.	80.8	ng/ul	2.020	1.127	1.79	0.31	RNA	40.00
74	A01M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:22:30 p.m.	100.0	ng/ul	2.501	1.392	1.80	0.29	RNA	40.00
75	A01M1 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:21:41 p.m.	86.5	ng/ul	2.162	1.162	1.86	0.99	RNA	40.00
76	A01M1 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:21:50 p.m.	91.0	ng/ul	2.275	1.227	1.85	0.99	RNA	40.00
77	A08M0 NAc (-)	Lab. Investigación	04/09/2021 02:35:09 p.m.	214.9	ng/ul	5.372	2.824	1.90	1.35	RNA	40.00
78	A01M2 NAc (+)	Lab. Investigación	03/09/2021 04:22:40 p.m.	101.7	ng/ul	2.542	1.409	1.80	0.28	RNA	40.00
79	H2O	Lab. Investigación	04/09/2021 02:21:59 p.m.	1.3	ng/ul	0.032	0.011	2.86	0.56	RNA	40.00
80	A08M0 NAc (-)	Lab. Investigación	04/09/2021 02:35:19 p.m.	219.4	ng/ul	5.485	2.886	1.90	1.34	RNA	40.00

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
81	H2O	Lab. Investigación	04/09/2021 04:05:54 p.m.	0.0	ng/ul	0.001	-0.014	-0.04	-0.10	RNA	40.00
82	A04M3 NAc (-)	Lab. Investigación	04/09/2021 02:36:11 p.m.	187.1	ng/ul	4.677	2.489	1.88	1.01	RNA	40.00
83	A04M3 NAc (-)	Lab. Investigación	04/09/2021 02:36:20 p.m.	188.7	ng/ul	4.717	2.541	1.86	1.00	RNA	40.00
84	A08M0 NAc (+)	Lab. Investigación	04/09/2021 04:08:56 p.m.	71.1	ng/ul	1.776	0.979	1.81	0.78	RNA	40.00
85	A04M3 NAc (+)	Lab. Investigación	04/09/2021 04:09:50 p.m.	80.2	ng/ul	2.004	1.100	1.82	0.98	RNA	40.00
86	A08M0 NAc (+)	Lab. Investigación	04/09/2021 04:09:04 p.m.	72.7	ng/ul	1.819	1.010	1.80	0.77	RNA	40.00
87	A04M3 NAc (+)	Lab. Investigación	04/09/2021 04:09:58 p.m.	84.5	ng/ul	2.113	1.182	1.79	0.99	RNA	40.00

Method Information

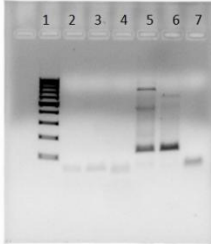
Parameter	Value
Workbook File	C:\Users\Lab. Investigación\Desktop\Carlos\Agudo - NAc - Machos 1\2021_08_18_Nucleic Acid.twbk
Application	Nucleic Acid
Data range	220nm 350nm
Analysis wavelength	260 nm

Anexo 5. Resultados de integridad de RNA en proceso de extracción



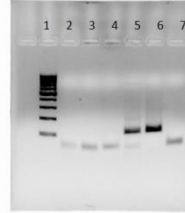
Anexo 6. Geles de la prueba de contaminación por gDNA (PCR de confirmación)

Prueba PCR confirmatoria
Muestra: A01M0
Grupo: Macamida 10 mg/kg i.p.
Cantidad: 500 ng RNA



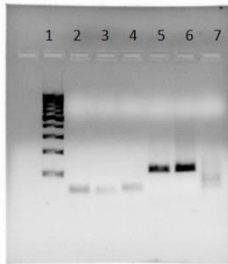
1. DNA Ladder
2. A01M0 RNA (+) - PFC
3. A01M0 RNA (+) - HYP
4. A01M0 RNA (+) - HIPP
5. RNA (-)
6. cDNA
7. H2O

Prueba PCR confirmatoria
Muestra: A01M3
Grupo: Macamida 10 mg/kg i.p.
Cantidad: 500 ng RNA



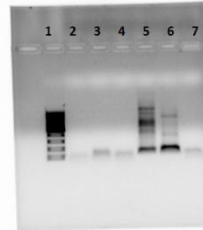
1. DNA ladder
2. A01M3 RNA (+) - PFC
3. A01M3 RNA (+) - HYP
4. A01M3 RNA (+) - HIPP
5. RNA (-)
6. cDNA
7. H2O

Prueba PCR confirmatoria
Muestra: A01M4
Grupo: Macamida 10 mg/kg i.p.
Cantidad: 500 ng RNA



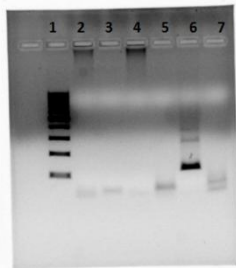
1. DNA ladder
2. A01M4 RNA (+) - PFC
3. A01M4 RNA (+) - HYP
4. A01M4 RNA (+) - HIPP
5. RNA (-)
6. cDNA
7. H2O

Prueba PCR confirmatoria
Muestra: A03M0
Grupo: Vehículo
Cantidad: 500 ng RNA



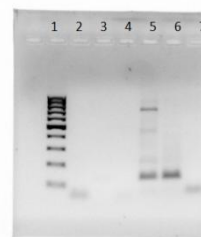
1. DNA ladder
2. A03M0 RNA (+) - PFC
3. A03M0 RNA (+) - HYP
4. A03M0 RNA (+) - HIPP
5. RNA (-)
6. cDNA
7. H2O

Prueba PCR confirmatoria
Muestra: A03M1
Grupo: Vehículo
Cantidad: 500 ng RNA



1. DNA ladder
2. A03M1 RNA (+) - PFC
3. A03M1 RNA (+) - HYP
4. A03M1 RNA (+) - HIPP
5. RNA (-)
6. cDNA
7. H2O

Prueba PCR confirmatoria
Muestra: A03M4
Grupo: Vehículo
Cantidad: 500 ng RNA




1. DNA ladder
2. A03M4 RNA (+) - PFC
3. A03M4 RNA (+) - HYP
4. A03M4 RNA (+) - HIPP
5. RNA (-)
6. cDNA
7. H2O

Anexo 7. Información de genes blanco para qPCR

Gene symbol (mRNA)	Sequence accession number	Version	Location of amplicon	What splice variants are targeted	Amplicon length	Sequence	BLAST e-value	Secondary structure analysis of primers				Location of each primer by exon	
								Tm (°C)	GC content (%)	Min ΔG homodimer (kcal)	Min ΔG monomer (kcal)		Min ΔG heterodimer (kcal)
<i>Cnr1</i>	NM_00726	5	GRCh38, chr4 33946639 - 33946758	transcript variant 1	120	For: 5'-TACCTGGCTCTGTTGGAAATG-3' Rev: 5'-GGCAGAGATGTCATCAGAAAGC-3'	0.005	54.2	47.62	-4.8	0	-6.3	Exon 2
<i>Cnr2</i>	MIN_009924	4	GRCh38, chr4 135646785 - 135646920	transcript variant 1	136	For: 5'-TTCCCTGAAAGTTATGGGCACAC-3' Rev: 5'-GGGACACAGAAAAATTGAGAGC-3'	0.005	55.1	52.38	-7.5	-0.3	-6.3	Exon 2
<i>Fach</i>	MIN_010173	5	GRCh38, chr4 115854711 - 115854830	transcript variant 1	120	For: 5'-CCCAGCAATAAAGTCTCTC-3' Rev: 5'-TCACCTCACCAAGGGGTATC-3'	0.005	55.3	52.38	-6.1	-0.8	-4	Exon 15
<i>Nopap1d</i>	MIN_0013599641		GRCh38, chr5 21880701 - 21880845	transcript variant 1	145	For: 5'-CAGTCAACACCCTACGACCA-3' Rev: 5'-GTCCAGCTCAATCAGTTC-3'	0.005	54.3	52.38	-2.8	0	-4	Exon 15
<i>Drd1</i>	MIN_010076	3	GRCh38, chr13 54205363 - 54205470	transcript variant 1	108	For: 5'-GTAATAGCCCTGGACTGCAAAA-3' Rev: 5'-CTGCTTCCAAGAACACCTTG-3'	0.005	55.4	52.38	-4.6	0	-3.9	Exon 3
<i>Drd2</i>	MIN_010077	3	GRCh38, chr9 48919133 - 48919247	NA	115	For: 5'-CCGCCACTTCTTGACATACAT-3' Rev: 5'-CCCAAGTTACCACTCCCACT-3'	0.005	56.2	52.38	-3.3	0	-3.9	Exon 3
							0.005	54	47.62	-3.2	-0.1	-6.2	Exon 2
							0.005	54.8	47.62	-5.2	-0.2	-6.2	Exon 2
							0.005	54.7	47.62	-2.5	0	-4.4	Exon 8
							0.005	55.8	52.38	-3.6	-0.3	-4.4	Exon 8

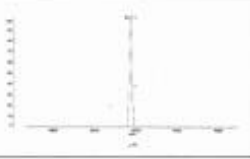
Anexo 8. Información de genes blanco para qPCR



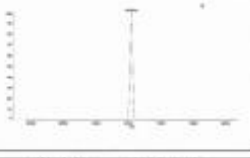
Juan Iglesias
 Urb. Ingenier a, Larapa Grande A-7
 Urb. San Jeronimo
 084

HO00056571
 Order Date : 2020-12-03
 Packing date :
 Page : 1/13


Oligo	Mm.Cnr1 - For - NM_007726.5 <i>120bp 3'UTR</i>					
SEQ	5' - TACCTGGCTCTGTTTGAATG - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
48	6443.2	6437.1	6.6	30	0.05	59.4
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification		
300		MOPC				




Oligo	Mm.Cnr1 - Rev - NM_007726.5					
SEQ	5' - GGCAGAGATGTCATCAGAAGC - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
52	6504.2	6538.9	7.4	30	0.05	61.3
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification		
300		MOPC				




Oligo	Mm.Cnr2 - For - NM_009924.4 <i>136bp 3'UTR</i>					
SEQ	5' - TTCCTGAAGTTATGGGCACAC - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
48	6421.2	6457.9	6.8	30	0.05	59.4
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification		
300		MOPC				



Oligo	Mm.Cnr2 - Rev - NM_009924.4					
SEQ	5' - GGGACCAGAAAATTGAGAGC - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
48	6537.2	6535.6	7.9	30	0.05	59.4
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification		
300		MOPC				





2020-12-04 13:48:03/01 lgo-수령명/votjd0215/김태성

Anexo 8. Información de genes blanco para qPCR (continuación)



Juan Iglesias
 Urb. Ingenier a, Larapa Grande A - 7
 Urb. San Jeronimo
 084

HO00056571

Order Date : 2020 - 12 - 03

Packing date :

Page :3/13

Oligo	Mm.Drd1 - For - NM_010076.3					
SEQ	5' - GTCATAGCCTGGACTGCAAAA - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
48	6439.2	6375.9	7.2	30	0.05	59.4
vol. for 100pmol/ul	Purification		Modification			
300	MOPC					
Oligo	Mm.Drd1 - Rev - NM_010076.3					
SEQ	5' - CTGCTTCCAAAGAACACCTTG - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
48	6350.2	6385	6.8	30	0.05	59.4
vol. for 100pmol/ul	Purification		Modification			
300	MOPC					
Oligo	Mm.Drd2 - For - NM_010077.3					
SEQ	5' - CCGCCACTTCTTGACATACAT - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
48	6301.2	6348.9	6.5	30	0.05	59.4
vol. for 100pmol/ul	Purification		Modification			
300	MOPC					
Oligo	Mm.Drd2 - Rev - NM_010077.3					
SEQ	5' - CCCAAGTTACCACCTCCAAC - 3' (21mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
52	6255.2	6250.5	6.5	30	0.05	61.3
vol. for 100pmol/ul	Purification		Modification			
300	MOPC					



Anexo 8. Información de genes blanco para qPCR (continuación)



Juan Iglesias
 Urb. Ingenieros, Larapa Grande A - 7
 Urb. San Jeronimo
 084

HO00056571

Order Date : 2020 - 12 - 03

Packing date :

Page : 6/13

Oligo	Mm.Faah - For - NM_010173.5						<i>120 bp 3'UTR</i>
SEQ	5' - CCCAGCCAAATAAGTCTCCTC - 3' (21mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
52	6295.2	6289.4	6.6	30	0.05	61.3	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
300		MOPC					
Oligo	Mm.Faah - Rev - NM_010173.5						
SEQ	5' - TCACTCACCACAAGGGGTATC - 3' (21mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
52	6375.2	6380.2	6.9	30	0.05	61.3	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
300		MOPC					
Oligo	Mm.NAPEPLD - For - NM_001359964.1						
SEQ	5' - CAGTCACAACCACTACGACCA - 3' (21mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
52	6313.2	6321.9	6.9	30	0.05	61.3	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
300		MOPC					
Oligo	Mm.NAPEPLD - Rev - NM_001359964.1						
SEQ	5' - GTCCAGCTCAATCACGTTCTC - 3' (21mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
52	6317.2	6334.1	6.4	30	0.05	61.3	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
300		MOPC					



Anexo 8. Información de genes blanco para qPCR (continuación)



Juan Iglesias
 Urb. Ingenieros, Larapa Grande A-7
 Urb. San Jeronimo
 084

HO00056571
 Order Date : 2020 - 12 - 03
 Packing date :
 Page : 13/13

Oligo	Mm.18SrRNA - For - NR_003278.3						
SEQ	5' - GCCGCTAGAGGTGAAATCTT - 3' (21mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
48	6461.2	6454.2	7	30	0.05	59.4	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
300		MOPC					
Oligo	Mm.18SrRNA - Rev - NR_003278.3						
SEQ	5' - TCGTTTATGGTCGGAAGTACG - 3' (21mer)						
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)	
	calculated	measured	OD	nmol			
48	6452.2	6439.2	6.8	30	0.05	59.4	
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification			
300		MOPC					



Anexo 9. Curva de eficiencia de 18S y Faah

4. Result Curva eficiencia 18S - NAc Vehiculo 1 Report

Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt

Includes: Consolidated Plots, Tabular Results

Instrument Name: New_Instrument
Firmware Version: 3.1.1812.0301
Software Version: Agilent Aria Software v1.8
Last Modified Date: 14 Sep 2021 12:26:27

Instrument Type: AriaMx
Serial Number: MY17165286
Run By: Guest
Run Start Date: 13 Sep 2021 15:37:57
Elapsed Time: 0 : 55 : 48

Report Generated: 15 Dec 2021

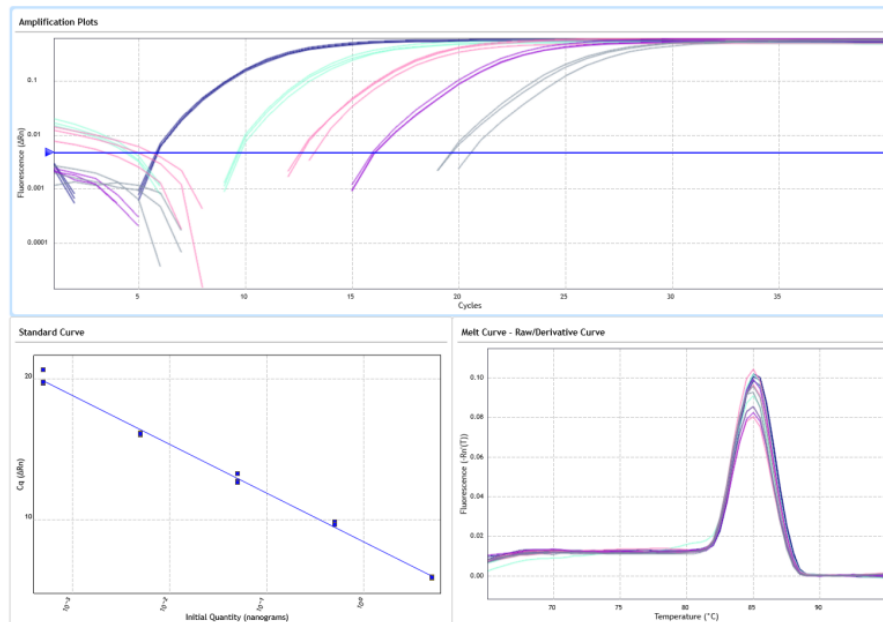
Report

Confidential

Instrument Name: New_Instrument
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: 4. Result Curva eficiencia 18S - NAc Vehiculo 1
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt
Run Date: 13 Sep 2021 15:37:57

Graphical Displays



Anexo 9. Curva de eficiencia de 18S y Faah (continuación)

Instrument Name: New_Instrument
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: 4. Result Curva eficiencia 18S - NAc Vehiculo 1
Experiment Type: Quantitative PCR - DNA Binding Dye Including Standard Melt
Run Date: 13 Sep 2021 15:37:57

Tabular Results (1 of 1)

Well	Well Type	Well Name	Dye	Target	Replicate	Threshold (ΔRn)	Cq (ΔRn)	R ² (ΔRn)	Slope (ΔRn)	Efficiency (%)	Tm Product 1 (-Rn(T))
A4	Standard	18S	SYBR	SYBR	2	0.005	5.91	0.996	-3.463	94.4	85.00
A5	Standard	18S	SYBR	SYBR	2	0.005	5.83	0.996	-3.463	94.4	85.00
A6	Standard	18S	SYBR	SYBR	2	0.005	5.89	0.996	-3.463	94.4	85.00
A7	Standard	18S	SYBR	SYBR	3	0.005	9.71	0.996	-3.463	94.4	85.00
A8	Standard	18S	SYBR	SYBR	3	0.005	9.81	0.996	-3.463	94.4	85.00
B1	Standard	18S	SYBR	SYBR	3	0.005	9.66	0.996	-3.463	94.4	85.00
B2	Standard	18S	SYBR	SYBR	4	0.005	12.71	0.996	-3.463	94.4	85.00
B3	Standard	18S	SYBR	SYBR	4	0.005	13.28	0.996	-3.463	94.4	85.00
B4	Standard	18S	SYBR	SYBR	4	0.005	12.61	0.996	-3.463	94.4	85.00
B5	Standard	18S	SYBR	SYBR	5	0.005	15.99	0.996	-3.463	94.4	85.00
B6	Standard	18S	SYBR	SYBR	5	0.005	16.15	0.996	-3.463	94.4	85.00
B7	Standard	18S	SYBR	SYBR	5	0.005	16.12	0.996	-3.463	94.4	85.00
B8	Standard	18S	SYBR	SYBR	6	0.005	20.62	0.996	-3.463	94.4	85.00
C1	Standard	18S	SYBR	SYBR	6	0.005	19.68	0.996	-3.463	94.4	85.00
C2	Standard	18S	SYBR	SYBR	6	0.005	19.75	0.996	-3.463	94.4	85.00

Anexo 9. Curva de eficiencia de 18S y Faah (continuación)

5. TaqMan Efficiency curve - Faah_Mm Report

Quantitative PCR - Fluorescence Probe

Includes: Consolidated Plots, Tabular Results

Instrument Name: New_Instrument
Firmware Version: 3.1.1812.0301
Software Version: Agilent Aria Software v1.8
Last Modified Date: 22 Sep 2021 15:58:42

Instrument Type: AriaMx
Serial Number: MY17165286
Run By: Guest
Run Start Date: 22 Sep 2021 14:27:17
Elapsed Time: 1 : 31 : 14

Report Generated: 15 Dec 2021

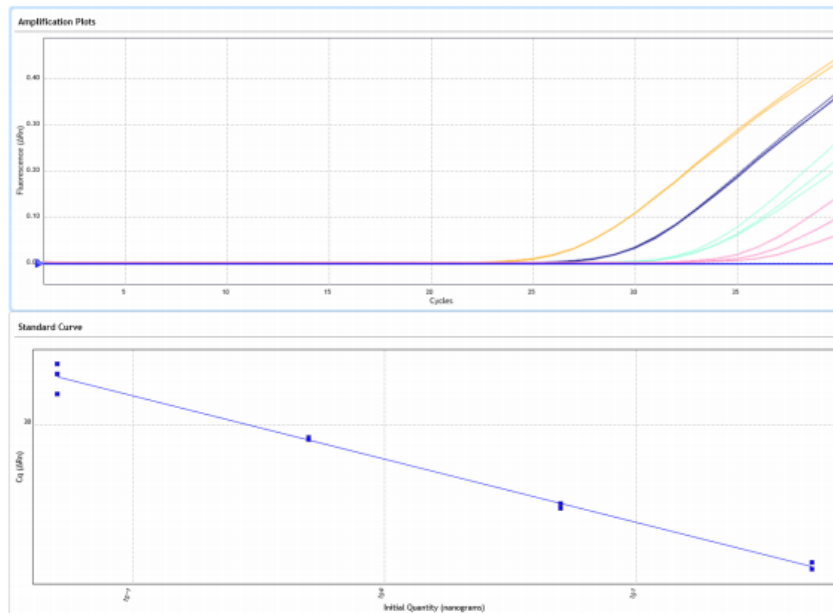
Report

Confidential

Instrument Name: New_Instrument
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: 5. TaqMan Efficiency curve - Faah_Mm
Experiment Type: Quantitative PCR - Fluorescence Probe
Run Date: 22 Sep 2021 14:27:17

Graphical Displays



Anexo 9. Curva de eficiencia de 18S y Faah (continuación)

Instrument Name: New_Instrument
Instrument Type: AriaMx

Experiment Name: 5. TaqMan Efficiency curve - Faah_Mm
Experiment Type: Quantitative PCR - Fluorescence Probe
Run Date: 22 Sep 2021 14:27:17

Tabular Results (1 of 1)

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (ΔRn)	R ² (ΔRn)	Slope (ΔRn)	Efficiency (%)	Tm Product 1 (-Rn(T))
A2	Standard	FAM	FAM	1	22.84	0.990	-3.132	108.6	No Tm
A3	Standard	FAM	FAM	1	23.19	0.990	-3.132	108.6	No Tm
A4	Standard	FAM	FAM	2	25.87	0.990	-3.132	108.6	No Tm
A5	Standard	FAM	FAM	2	26.08	0.990	-3.132	108.6	No Tm
A6	Standard	FAM	FAM	2	26.09	0.990	-3.132	108.6	No Tm
A7	Standard	FAM	FAM	3	29.34	0.990	-3.132	108.6	No Tm
A8	Standard	FAM	FAM	3	29.36	0.990	-3.132	108.6	No Tm
B1	Standard	FAM	FAM	3	29.26	0.990	-3.132	108.6	No Tm
B2	Standard	FAM	FAM	4	31.52	0.990	-3.132	108.6	No Tm
B3	Standard	FAM	FAM	4	32.99	0.990	-3.132	108.6	No Tm
B4	Standard	FAM	FAM	4	32.49	0.990	-3.132	108.6	No Tm

Anexo 10. Cálculos para la creación de librería

ID	GRUPO	SEXO	Micropunch - Núcleo Accumbens (500 um)		OBS	Volumen cDNA (25ng/ul)	c.s.p. # genes	Curva eficiencia - 18S (threshold 6.005)			
			Antes de disección	Después de disección				r ²	slope	efficiency	amplification value
A03M0	VEH	M			El corte era muy anterior	53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A03M1	VEH	M				87	14	0.996	-3.463	94.4	1.944
A03M2	VEH	M				59	9	0.996	-3.463	94.4	1.944
A03M3	VEH	M				51	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A03M4	VEH	M				79	13	0.996	-3.463	94.4	1.944
A08M0	3mg/kg	M				47	7	0.996	-3.463	94.4	1.944
A08M1	3mg/kg	M				63	10	0.996	-3.463	94.4	1.944
A08M3	3mg/kg	M				77	12	0.996	-3.463	94.4	1.944
A08M4	3mg/kg	M				85	14	0.996	-3.463	94.4	1.944
A01M0	10mg/kg	M				53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A01M1	10mg/kg	M				55	9	0.996	-3.463	94.4	1.944
A01M2	10mg/kg	M				65	10	0.996	-3.463	94.4	1.944
A01M3	10mg/kg	M				53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A01M4	10mg/kg	M				63	10	0.996	-3.463	94.4	1.944
A02M1	30mg/kg	M				51	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A02M3	30mg/kg	M				53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A02M4	30mg/kg	M				65	10	0.996	-3.463	94.4	1.944
A04M0	FLU	M				53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A04M2	FLU	M				59	9	0.996	-3.463	94.4	1.944
A04M3	FLU	M				53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944
A04M4	FLU	M				53	8	0.996	-3.463	94.4	1.944

Anexo 10. Cálculos para la creación de librería (continuación)

ID	GRUPO	Prueba 18S en cDNA 10 ⁻⁴ (threshold 0.005)				Diluciones						Muestras diluidas #1 (160921)					
		Cq 1	Cq 2	Mean	sd	Cq de referencia	ΔCq	Factor de dilución	Vol final de dilución (ul)	Vol original a diluir (ul)	Vol H2O a completar (ul)	Cq 1	Cq 2	Dif. Cq muestra (<0.5)	Mean	ΔCq (<1.0)	Conclusión
A03M0	VEH	16.55	15.97	16.26	0.41	17.355	1.10	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.83	16.89	0.06	16.86	0.84	ACEPTADO
A03M1	VEH	16.08	16.66	16.37	0.41	17.355	0.98	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.99	17	0.01	16.995	0.705	ACEPTADO
A03M2	VEH	14.92	14.94	14.93	0.01	17.355	2.425	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	18.69	18.82	0.13	18.755	-0.41	ACEPTADO
A03M3	VEH	17.01	16.74	16.88	0.19	17.355	0.48	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17	17.59	0.59	17.295	0.405	ACEPTADO
A03M4	VEH	15.83	15.71	15.77	0.08	17.355	1.585	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.87	16.97	0.1	16.92	0.78	ACEPTADO
A08M0	3mg/kg	15.35	15.85	15.60	0.35	17.355	1.755	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.72	17.87	0.15	17.795	-0.095	ACEPTADO
A08M1	3mg/kg	15.89	15.94	15.92	0.04	17.355	1.44	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.95	17.52	0.57	17.235	0.465	ACEPTADO
A08M3	3mg/kg	15.71	15.81	15.76	0.07	17.355	1.595	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.97	17.54	0.57	17.255	0.445	ACEPTADO
A08M4	3mg/kg	17.1	17.61	17.36	0.36	17.355	0	#NUM!	40	#NUM!	#NUM!	18.62	18.07	-0.55	18.345	0	ACEPTADO
A02M0	10mg/kg	15.12	15.01	15.07	0.08	17.355	2.29	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.69	17.89	0.2	17.79	-0.09	ACEPTADO
A02M1	10mg/kg	15.29	16.28	15.79	0.70	17.355	1.57	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.94	17.66	0.72	17.3	0.4	ACEPTADO PERO MEJORAR PIPETEO
A02M2	10mg/kg	16.67	16.98	16.83	0.22	17.355	0.53	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.78	17.75	0.97	17.265	0.435	ACEPTADO PERO MEJORAR PIPETEO
A02M3	10mg/kg	14.93	15.09	15.31	0.54	17.355	2.045	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	16.85	17.77	0.92	17.31	0.39	ACEPTADO PERO MEJORAR PIPETEO
A02M4	10mg/kg	14.6	14.29	14.45	0.22	17.355	2.91	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	18.51	18.75	0.24	18.63	-0.93	ACEPTADO PERO LEJANO
A02M1	30mg/kg	14.87	15.02	14.95	0.11	17.355	2.41	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	18.48	18.68	0.2	18.58	-0.88	ACEPTADO PERO LEJANO
A02M3	30mg/kg	14.71	15.01	14.86	0.21	17.355	2.495	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.95	17.77	-0.18	17.86	0.485	ACEPTADO
A02M4	30mg/kg	14.81	14.9	14.86	0.06	17.355	2.5	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.78	17	-0.78	17.39	0.955	ACEPTADO
A04M0	FLU	15.57	14.86	15.22	0.50	17.355	2.14	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.52	18.17	0.65	17.845	-0.145	ACEPTADO PERO MEJORAR PIPETEO
A04M2	FLU	15.8	15.71	15.76	0.06	17.355	1.6	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.74	18.34	0.6	18.04	-0.34	ACEPTADO PERO MEJORAR PIPETEO
A04M3	FLU	14.72	14.76	14.74	0.03	17.355	2.615	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.75	17.95	0.2	17.85	0.495	ACEPTADO
A04M4	FLU	15.17	15.21	15.19	0.03	17.355	2.165	0.00	40	#DIV/0!	#DIV/0!	17.67	18.89	1.22	18.28	-0.58	ACEPTADO PERO MEJORAR PIPETEO

Anexo 11. Constancia de aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación de la UPCH



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de
INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (DUICT)

CONSTANCIA 044 - 14 - 20

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Efecto de la inhibición de la amida hidrolasa de ácidos grasos por una nueva macamida sintética MACOMCH-01 en el comportamiento tipo depresivo a través de la modulación de la señalización dopaminérgica mesolímbica de ratones CD1".

Código de inscripción : 203458

Investigadores : Medina Saldivar, Carlos

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, recibido en fecha 10 de noviembre del 2020.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el 09 noviembre del 2021.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 10 de noviembre del 2020.



Dr. Manuel Gasco Tantachuco

Presidente

Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

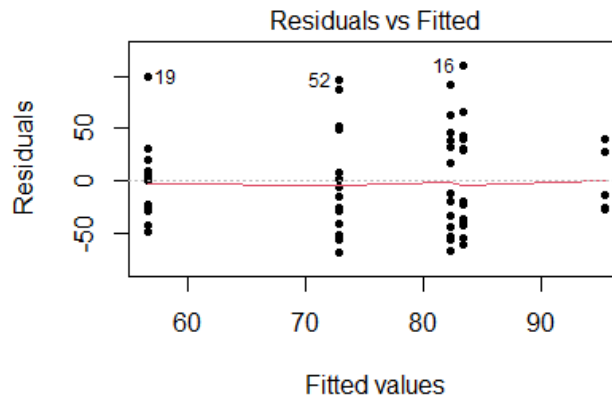
lf

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102
Apartado postal 4314
(511) 319-0000 anexo 201352
duict@oficinas-upch.pe
www.cayetano.edu.pe

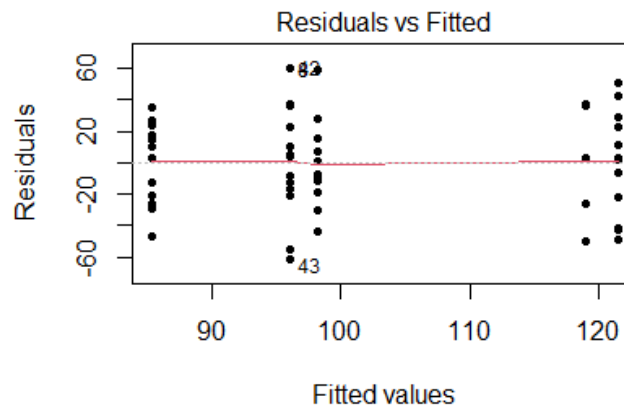
Anexo 12. Gráficas de linealidad de resultados comportamentales y moleculares

Prueba de nado forzado

Los residuales de latencia de inmovilidad no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.



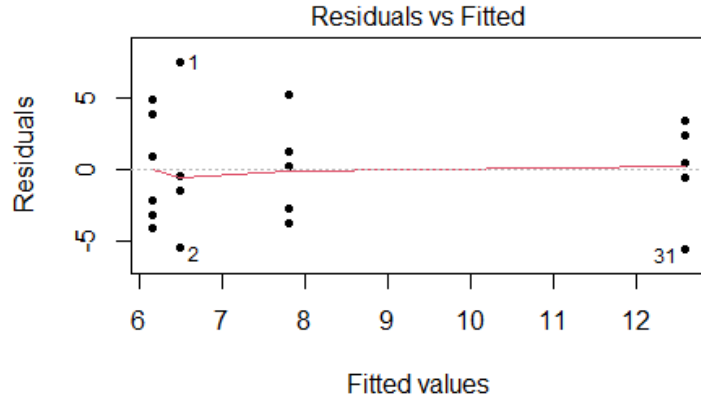
Los residuales de duración de inmovilidad no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.



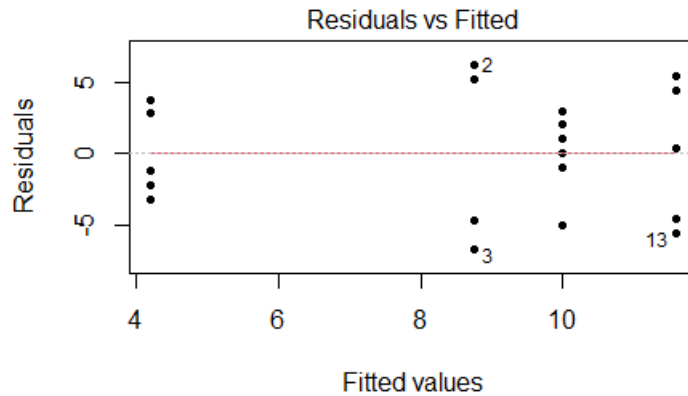
Anexo 12. Gráficas de linealidad de resultados comportamentales y moleculares (continuación)

Prueba de caja clara oscura

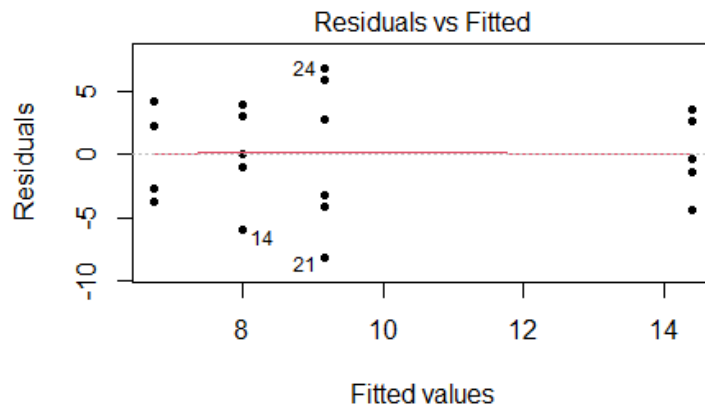
Los residuales de número de transiciones no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.



Los residuales de latencia caja oscura no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.



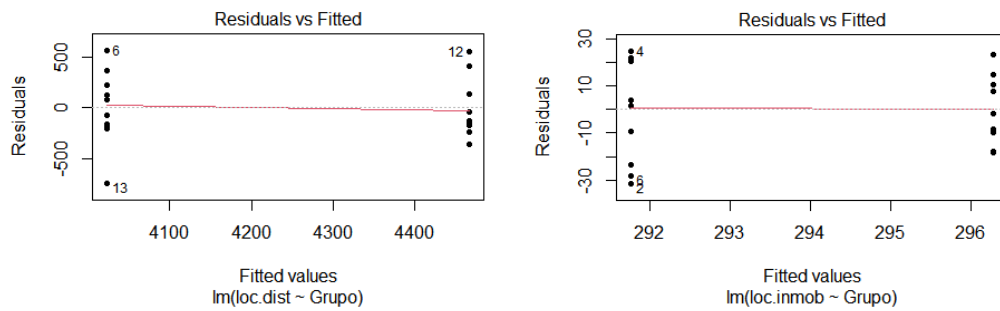
Los residuales de duración en caja clara no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.



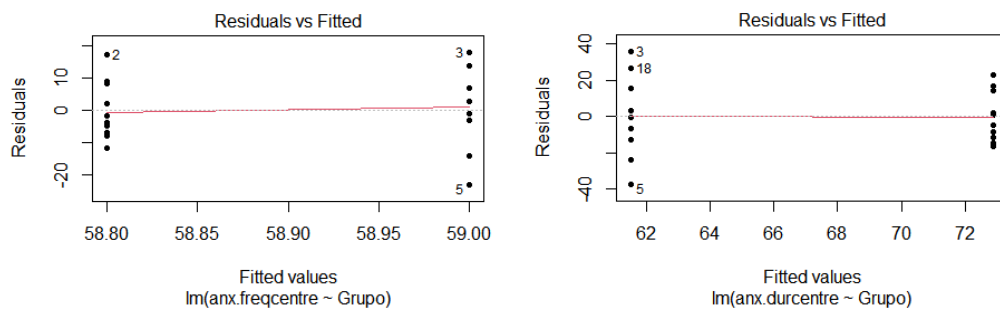
Anexo 12. Gráficas de linealidad de resultados comportamentales y moleculares (continuación)

Prueba de campo abierto

Los residuales de distancia recorrida y duración de inmovilidad no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.



Los residuales de frecuencia y tiempo de permanencia en zona central no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.

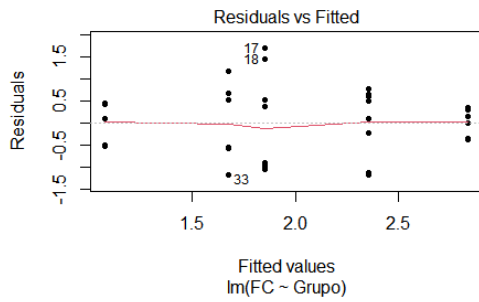


Anexo 12. Gráficas de linealidad de resultados comportamentales y moleculares (continuación)

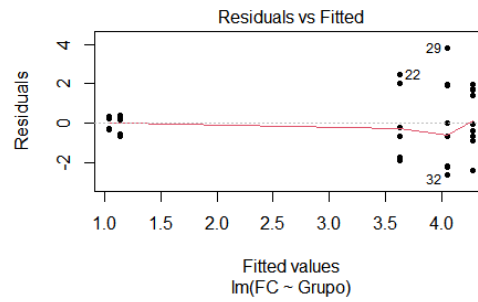
Prueba de moleculares

Los residuales de cambio de niveles de expresión de los genes *Faah*, *Cnr1*, *Drd1* y *Drd2* no mostraron un patrón definido (línea roja horizontal), por lo que se comprobó supuesto de linealidad.

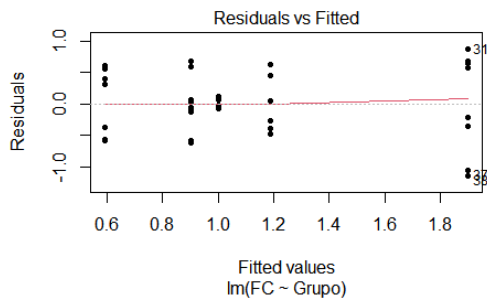
Faah



Cnr1



Drd1



Drd2

