

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 836 905**

51 Int. Cl.:

A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/515 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015** **PCT/US2015/023667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015** **WO15153658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015** **E 15774070 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020** **EP 3125902**

54 Título: **Uso de moduladores negativos de los receptores gaba que contienen subunidades alfa5 como antidepresivos de acción rápida**

30 Prioridad:

31.03.2014 US 201461972446 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
(100.0%)
620 West Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, MD 21201, US**

72 Inventor/es:

**THOMPSON, SCOTT;
KVARTA, MARK, D. y
VAN DYKE, ADAM**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 836 905 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de moduladores negativos de los receptores gaba que contienen subunidades alfa5 como antidepresivos de acción rápida

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/972.446, presentada el 31 de marzo de 2014.

Declaración con respecto a la investigación o desarrollo subvencionado federalmente

La presente invención se realizó con soporte del gobierno con la subvención número MH086828, otorgada por los National Institutes of Health. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

Campo técnico

Las realizaciones de la divulgación están relacionadas al menos con los campos de la biología celular, biología molecular, bioquímica, neurología, psiquiatría, farmacología, psicología y medicina. En realizaciones específicas, la divulgación se refiere a métodos para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto mediante la administración de uno o más moduladores del receptor GABA_A que puede producir una rápida acción antidepresiva.

Antecedentes

Existe la necesidad de identificar nuevos fármacos que se puedan utilizar para tratar los trastornos depresivos y reducir la incidencia de suicidio a nivel mundial. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI, por sus siglas en inglés) son, con frecuencia, la primera línea de tratamiento, pero muchos pacientes no responden a estos medicamentos y con frecuencia se necesita un tratamiento prolongado (varias semanas o meses) para lograr una mejora terapéutica.

El receptor GABA_A es un receptor ionotrópico y un canal iónico dependiente de ligando. Su ligando endógeno es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. El sitio primario de activación del receptor GABA_A es el sitio de unión para GABA y varios fármacos, tal como muscimol, gaboxadol y bicuculina. Un segundo sitio de unión es el llamado sitio "receptor de benzodiazepinas". Los fármacos que se unen a este sitio pueden promover o alterar la capacidad de GABA para activar el receptor GABA_A. Los receptores GABA_A se encuentran en todos los organismos con un sistema nervioso central. Debido a su amplia distribución dentro del sistema nervioso de mamíferos, desempeñan un papel en prácticamente todas las funciones cerebrales.

La ketamina, un antagonista reconocido del receptor de glutamato de tipo NMDA, ha demostrado propiedades antidepresivas de acción rápida. Sin embargo, se reconoce que la ketamina tiene potentes efectos psicotomiméticos y el mecanismo de acción de la ketamina sigue siendo incierto. Por lo tanto, existe una clara necesidad clínica de identificar otros antidepresivos de acción rápida para la depresión y tendencias suicidas que tengan propiedades farmacocinéticas potenciadas y que puedan producir respuestas más fuertes con menos efectos secundarios negativos.

Breve resumen

Las realizaciones de la divulgación se refieren a métodos y composiciones para el tratamiento de una o más afecciones médicas. En realizaciones particulares, la una o más afecciones médicas incluyen depresión y afecciones similares. La afección puede ser de cualquier tipo, pero en realizaciones específicas, la afección a tratar es depresión y/o tendencias suicidas mayores. En realizaciones específicas, el tratamiento de la afección médica se produce a un ritmo más rápido que los tratamientos conocidos actualmente y tiene menos efectos secundarios perjudiciales. En realizaciones específicas, la afección médica es un trastorno relacionado con la depresión.

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a un método para tratar o mejorar la depresión y/o las tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de un receptor GABA_A. Aunque cualquier modulador de un receptor GABA_A que mejora una afección médica como se describe en el presente documento, en una realización específica, el modulador es un modulador negativo del receptor. En realizaciones específicas, el modulador es un modulador alostérico negativo de receptores GABA_A que contienen una subunidad alfa5.

Realizaciones específicas de la divulgación se refieren al uso de moduladores alostéricos negativos de receptores GABA que contienen subunidades alfa5 como antidepresivos de acción rápida para tratar la depresión y/o reducir las tendencias suicidas. En realizaciones específicas, la acción rápida, como se usa en el presente documento, se define como el comienzo de los efectos terapéuticos en horas o días en comparación con las terapias actuales que tardan

días, semanas o meses.

En realizaciones particulares, cualquiera y cada uno de los fármacos que son moduladores alostéricos negativos de los receptores GABA que contienen subunidades alfa5 (incluidos los agonistas inversos en el sitio de unión a benzodiazepinas de los receptores GABA_A que contienen subunidades alfa5) producirán una rápida acción antidepresiva y producirán una rápida disminución de la depresión y/o tendencias suicidas en pacientes que padecen depresión mayor o en pacientes que padecen depresión que no son suicidas. Debido a que los receptores GABA que contienen alfa5 se expresan de manera estrecha en el hipocampo y la corteza, y porque en al menos algunas realizaciones las sustancias son agonistas inversos débiles, en determinadas realizaciones tienen una capacidad terapéutica significativamente mayor que los tratamientos actuales.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador alostérico negativo del receptor GABA_A y en algunas realizaciones el modulador se administra por vía oral, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, *mediante* insuflación o en un parche dérmico.

La presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador alostérico negativo de la subunidad alfa5 del receptor GABA_A y en algunas realizaciones el modulador se administra por vía oral, intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, *mediante* insuflación o en un parche dérmico.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de L655,708 o un derivado o análogo del mismo y en donde L655,708 se administra (pero sin limitación) por vía oral, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, *mediante* insuflación o en un parche dérmico, en realizaciones específicas.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de MRK-016 o un derivado o análogo del mismo y en donde MRK-016 se administra (pero sin limitación) por vía oral, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, *mediante* insuflación o en un parche dérmico, en realizaciones específicas.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de CP-457,920 o un derivado o análogo del mismo y en donde CP-457,920 se administra (pero sin limitación) por vía oral, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, *mediante* insuflación o en un parche dérmico, en realizaciones específicas.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de RG-1662 o un derivado o análogo del mismo y en donde RG-1662 se administra (pero sin limitación) por vía oral, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, *mediante* insuflación o en un parche dérmico, en realizaciones específicas.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un modulador alostérico negativo del receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5 ya sea solo o en combinación con otro fármaco antidepresivo que incluye, por ejemplo, uno o más seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOi, por sus siglas en inglés), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRi), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI, por sus siglas en inglés), inhibidores de triple recaptación, moduladores de la función de la acetilcolina del SNC, estimulantes, antiglucocorticoides, antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, antidepresivos tricíclicos (TCA, por sus siglas en inglés) y una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más de L655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; o un derivado o análogo de los mismos, ya sea solo o en combinación con uno o más fármacos antidepresivos diferentes seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOi), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRi), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), inhibidores de triple recaptación, moduladores de la función de la acetilcolina del SNC, estimulantes, antiglucocorticoides, antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, antidepresivos tricíclicos (TCA) y combinaciones de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar formas unipolares y bipolares de depresión, tendencias suicidas y otros síntomas depresivos de depresión unipolar y bipolar, trastorno de estrés postraumático y/o depresión posparto en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más moduladores negativos de un receptor GABA_A, incluyendo un receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5 y, en algunas realizaciones, el modulador es un agonista inverso parcial de un receptor GABA_A que contiene alfa5.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar formas unipolares y bipolares de depresión, tendencias suicidas y otros síntomas depresivos de depresión unipolar y bipolar, trastorno de estrés postraumático y/o depresión posparto en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más moduladores negativos de un receptor GABA_A, tal como un agonista inverso del receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5, por ejemplo, ya sea solo o en combinación con uno o más fármacos antidepressivos diferentes seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), inhibidores de triple recaptación, moduladores de la función de la acetilcolina del SNC, estimulantes, antigluocorticoides, antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, antidepressivos tricíclicos (TCA, por sus siglas en inglés) y una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para reforzar la función de sinapsis excitatoria en múltiples regiones del cerebro de un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador negativo del receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para restaurar la preferencia por sacarosa en un modelo animal de roedor con anhedonia inducida por estrés en donde la preferencia por sacarosa aumenta tras la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de moduladores negativos de un receptor GABA_A, tal como un modulador negativo del receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5, tal como L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto L-655,708 (etil(13aS)-7-metoxi-9-oxo-11,12,13,13a-terahidro-9H-imidazo[1,5-a] pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina-1-carboxilato; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente de compuesto L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente de compuesto L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos que se administra al sujeto por vía oral, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, mediante insuflación o en un parche dérmico, en determinadas realizaciones.

En otra realización, la presente divulgación se refieren a un método para tratar o mejorar la depresión y/o las tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un modulador alostérico negativo de un receptor GABA_A, incluyendo uno que comprende una subunidad alfa5, y en algunos casos es un agonista inverso del receptor GABA_A que contiene una subunidad alfa5, en donde el modulador es uno o más agonistas inversos del sitio de unión a benzodiazepinas u otros sitios de unión que producen modulación alostérica negativa de receptores GABA_A que contienen subunidades alfa5.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un modulador alostérico negativo de receptor GABA_A (incluido un modulador negativo de un receptor GABA_A que tiene una subunidad alfa5, tal como un agonista inverso del receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5) tal como L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos en combinación con uno o más fármacos antidepressivos seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), moduladores de la función de la acetilcolina del SNC, estimulantes, antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, antidepressivos tricíclicos, o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un agonista inverso del receptor

GABA_A que contiene subunidades alfa5, tal como L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos, en donde la dosis eficaz da como resultado la presencia del agonista inverso en el líquido cefalorraquídeo a una concentración suficiente para unir del 10 al 75 % de todos los receptores GABA_A y de ese modo reducir la función del receptor GABA_A entre un 10 y un 75 %.

En otra realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión en un sujeto que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más moduladores alostéricos negativos del receptor GABA_A (incluido un modulador alostérico negativo de receptor GABA_A que comprende subunidades alfa5, tal como un agonista inverso del receptor GABA_A que contiene subunidades alfa5), tales como L-655,708 o derivados o análogos del mismo (o MRK-16 o análogos o derivados del mismo; o CP-457,920, o análogos o derivados del mismo; o RG-1662 o análogos o derivados del mismo), o una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, la dosis eficaz del modulador alostérico negativo del receptor GABA_A se administra al sujeto cada 0,5, 1, 2, 3 o más días o en regímenes de dosificación repetitivos. La dosificación repetitiva puede ocurrir cuando el modulador se proporciona solo o cuando se proporciona con una o más terapias diferentes y cuando una o más terapias diferentes se utilizan con el modulador, las otras terapias se pueden proporcionar en regímenes de dosificación repetitivos.

En otra realización la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente de compuesto L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos, en combinación con otro agonista inverso del sitio de unión a benzodiazepinas, tal como RO4882224, RO4938581 u otros moduladores alostéricos negativos de la función del receptor GABA_A.

En otra realización la presente divulgación se refiere a un método para tratar o mejorar la depresión y/o tendencias suicidas en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente de compuesto L-655,708; MRK-016; CP-457,920; RG-1662; un derivado o análogo de los mismos; o una combinación de los mismos, en combinación con una clase de compuestos de 3-fenil-5-arilpiridacina tal como RO 15-4513, RY-010, RY-023, RY-080 o RG-1662.

Las realizaciones de la divulgación incluyen métodos para reducir el riesgo de suicidio en un individuo propenso al suicidio y/o depresión.

En una divulgación, hay un método para tratar o prevenir o mejorar al menos un síntoma de una afección médica en un individuo, que comprende la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más moduladores negativos de receptores GABA_A, en donde la afección médica se selecciona del grupo que consiste en un trastorno relacionado con la depresión; tendencias suicidas; y una combinación de los mismos. En realizaciones específicas, el comienzo de la mejora de uno o más síntomas relacionados con la depresión se produce en horas, días o semanas. En realizaciones particulares, el receptor GABA_A comprende una subunidad alfa5. El modulador negativo puede seleccionarse del grupo que consiste en moduladores alostéricos negativos que actúan en el sitio de unión a benzodiazepinas; moduladores alostéricos negativos que actúan en el sitio de unión a esteroides barbitúricos; moduladores alostéricos negativos que actúan en el sitio de unión a esteroides neuroactivos; antagonistas competitivos de GABA_AR; moduladores negativos que actúan en el poro del canal de GABA_AR; nicotinamida y compuestos relacionados; agonistas inversos y antagonistas del sitio de unión a propofol del GABA_AR; y una combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, el trastorno relacionado con la depresión es el trastorno depresivo mayor (MDD por sus siglas en inglés); distimia; trastorno ciclotímico; trastorno afectivo estacional/depresión estacional; depresión después de una lesión cerebral traumática; depresión posparto; trastorno disfórico premenstrual; síntomas depresivos asociados con la menopausia; depresión después de abuso/abstinencia de sustancias; trastorno bipolar; trastorno bipolar en remisión; o episodios depresivos del trastorno bipolar.

Un individuo tratado con realizaciones de la divulgación incluye un individuo que se ha sido o no diagnosticado con la afección médica.

En realizaciones particulares, el modulador negativo del receptor GABA_A es un modulador alostérico negativo que actúa en el sitio de unión a benzodiazepinas; el modulador negativo del receptor GABA_A es un modulador alostérico negativo que actúa en el sitio de unión a esteroides barbitúricos; el modulador negativo del receptor GABA_A es un modulador alostérico negativo que actúa en el sitio de unión a esteroides neuroactivos; el modulador negativo del receptor GABA_A es un antagonista competitivo del R de GABA_A; modulador negativo que actúa en el poro del canal R de GABA_A; y/o el modulador negativo del receptor GABA_A es un agonista inverso parcial de un receptor GABA_A que comprende una subunidad $\alpha 5$. En realizaciones específicas, el agonista inverso parcial de un receptor GABA_A que comprende una subunidad $\alpha 5$ es L-655,708, RO4938581, CP-457,920, MRK-016, o una combinación de los mismos.

En realizaciones particulares, el método comprende además la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de otra terapia, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), inhibidores de

triple recaptación, moduladores de la función de la acetilcolina del SNC, estimulantes, antiglucocorticoides, antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, antidepresivos tricíclicos (TCA, por sus siglas en inglés) y una combinación de los mismos. La otra terapia puede ser un antidepresivo.

- 5 Lo anterior ha esbozado de manera bastante amplia las características y ventajas técnicas de la presente invención para que la **Descripción de la invención** detallada que sigue puede entenderse mejor.

Las características novedosas que se cree que son características de la invención, tanto en su organización como en su método de funcionamiento, junto con otros objetos y ventajas adicionales se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considere en relación con las figuras adjuntas. Debe entenderse expresamente, sin embargo, que cada una de las figuras se proporciona con fines ilustrativos y descriptivos únicamente y no pretende ser una definición de los límites de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, ahora se hace referencia a las siguientes descripciones tomadas junto con el dibujo adjunto, en el que:

La **FIG. 1** ilustra un ejemplo de la acción terapéutica de acción rápida de la ketamina y la participación de las sinapsis excitatorias en la depresión.

FIG. 2. La inyección de L-655,708 produjo un rápido aumento en la actividad oscilatoria en el estrato piramidal del área CA1 (fila superior) y en la cubierta del NAc (fila inferior) *in vivo*, particularmente en las bandas de frecuencia theta y beta, que continuó durante más de una hora.

FIG. 3A. En cortes de control (negro), la anpirtolina produjo una potenciación completamente reversible de la pendiente TA-CA 1 EP8P de -175 %. Después de CUS (gris), la potenciación fue mayor y continuó durante > 60 minutos después del lavado. **FIG. 3B,** En dos cortes de ratas con CUS a las que se les dio una inyección de L-655,708, 24 horas antes, la potenciación fue similar a los controles.

FIG. 4. 24 horas después de la inyección de L-655,708, pero no de vehículo, la fosforilación de S831 y la expresión total de GluA 1 aumentaron en SLM del tejido del hipocampo de ratas con CRS a niveles comparables a los de los controles sin estrés. Por el contrario, L-655,708 no tuvo ningún efecto en animales sin estrés.

FIG. 5. Una hora después de la inyección de L-655,708 hubo un aumento en la expresión de FosS y Δ FosB en animales sin estrés en el NAc, pero no en el hipocampo. No hubo cambios aparentes 24 horas después de la inyección.

FIG. 6A y 6B. L-655,708 revierte rápidamente la pérdida de preferencia por sacarosa y los comportamientos de interacción social después del estrés crónico por restricción. Cuantificación de los resultados de la prueba de preferencia por sacarosa (SPT, por sus siglas en inglés **FIG. 6A**) y las pruebas de interacción social (SIT, por sus siglas en inglés **FIG. 6B**) en dos puntos temporales: antes de CRS y después de 10 días de CRS. 24 horas antes de la segunda ronda de pruebas, las ratas recibieron una inyección de bien vehículos (negro, barra izquierda en pares de barras; vehículo) o L-655,708 (blanco, barra derecha en pares de barras; L-655,708). La preferencia por sacarosa media difirió significativamente después de la inyección del vehículo en comparación con todos los otros grupos (ANOVA con medidas repetidas 2X2 de la interacción grupo-tiempo $F(1,11) = 7,514$, $p = 0,019$; *, $p < 0,05$ en comparación con el valor inicial antes de CUS, prueba post-hoc de Bonferroni; $n = 7$ ratas con CRS + vehículo, 6 ratas con CRS + L-655,708). Las relaciones de interacción social medias difirieron significativamente después de la inyección del vehículo en comparación con todos los demás grupos ($F(1,12) = 2,85$, $p = 0,115$; $n = 7$ ratas con CRS + vehículo, 7 ratas con CRS + L-655,708).

FIG. 7A, 7B, 7C y 7D. L-655,708 revierte rápidamente la pérdida de conductas de interacción social después de un estrés crónico impredecible pero no afecta a la conducta hedónica en ratas sin estrés. Cuantificación de los resultados de la prueba de interacción social (SIT) en tres puntos temporales: antes de CUS, después de 4 semanas de CUS y una inyección de vehículo administrada 24 horas antes, y después de una semana adicional de CUS y una inyección de L-655,708 administrada 24 horas antes. **FIG. 7A,** la relación de interacción social media difirió significativamente en el grupo CUS + vehículo en comparación con todos los demás grupos (ANOVA con medidas repetidas 3x2 de la interacción grupo-tiempo $F(2,50) = 6,538$, $p = 0,005$; *, $p < 0,05$ frente a todos los demás grupos, prueba de Bonferroni, $n = 18$ ratas con CUS, 9 ratas sin estrés). **FIG. 7B,** El análisis de animales individuales reveló que 14 de 18 animales mostraron respuestas fuertes a CUS y L-655,708 (negro). Las 4 ratas que no respondieron a L-655,708 parecieron en gran parte resistentes a los efectos de CUS (símbolos grises). Los controles no estresados también recibieron inyecciones de vehículo y L-655,708 en los mismos puntos temporales. Ninguna inyección produjo un cambio significativo en la interacción social. (**FIG. 7C**) o preferencia por sacarosa (**Figura 7D**).

FIG. 8. La preferencia por sacarosa media después de 4 semanas con CUS + inyección de vehículo difirió

significativamente de todos los demás grupos, (ANOVA con medidas repetidas 3x2 de la interacción grupo-tiempo $F(2,18) = 12,309$, $p = 0,006$; * $p < 0,05$ frente a todos los demás grupos, prueba de Bonferroni) $N = 5$ ratas con CUS y $N = 7$ ratas sin estrés. La barra izquierda de los pares (negro) refleja ratas con CUS y la barra derecha de los pares (blanco) refleja ratas sin estrés.

FIG. 9A, 9B y 9C. MRK-016 revierte rápidamente la pérdida de preferencia por sacarosa y los comportamientos de interacción social después del estrés crónico por restricción. **FIG. 9A**, Cuantificación de los resultados de un grupo de ratas en la prueba de preferencia por sacarosa en cinco puntos temporales: valor inicial, después de 2 semanas de CRS, 24 horas después de 3 días adicionales de CRS y 24 horas después de la inyección del vehículo, después de una semana de CRS y 24 horas después de una inyección de MRK-016 (3 mg/kg), y en los mismos animales después de una semana adicional de CRS y 7 días después de la inyección de MRK-016. La preferencia media por sacarosa difirió significativamente después de la inyección del vehículo en comparación con todos los demás grupos ($F(3,33) = 20,63$, $p < 0,0001$, $n = 12$ ratas). *, $p < 0,05$ en comparación con el valor inicial antes de CUS, prueba post-hoc de Tukey). **FIG. 9B**, resultados en animales individuales para el experimento completo. **FIG. 9C**, cuantificación de los resultados de un grupo de ratas en la prueba de interacción social en cuatro puntos temporales: valor inicial, después de 2 semanas de CRS y 24 horas después de la inyección del vehículo, después de una semana de CRS y 24 horas después de una inyección de MRK-016 (3 mg/kg), y en los mismos animales después de una semana adicional de CRS y 7 días después de la inyección de MRK-016. Las relaciones de interacción social media difirieron significativamente después de la inyección del vehículo en comparación con todos los demás grupos ($F(2,14) = 11,84$, $p = 0,0009$, $n = 8$ ratas). *, $p < 0,05$ en comparación con el valor inicial antes de CUS, prueba post-hoc de Tukey).

FIG. 10A, 10B y 10C. L-655,708 revierte rápidamente el debilitamiento inducido por estrés de la transmisión sináptica mediada por AMPAR en las sinapsis TA-CA1 del hipocampo de rata. **FIG. 10A**, trazos representativos que muestran los componentes mediados por AMPAR y NMDAR del fEPSP, registrado extracelularmente en SLM del área CA1 en respuesta a la simulación de aferentes TA en solución salina que carece de Mg^{2+} añadido. Se muestran trazos antes (negro) y después (gris) de la adición de $50 \mu M$ de DNQX para bloquear los AMPAR. Se registraron los trazos de cortes tomados de controles sin estrés (izquierda) y ratas sometidas a 10 días de CRS y después se les dio una inyección 24 horas antes de una solución de vehículo (centro) o L-655,708 (derecha). **FIG. 10B**, la pendiente media de la relación entre la respuesta mediada por AMPAR (izquierda) y por NMDAR (derecha) y la amplitud de FV en un intervalo de intensidades de estimulación de los tres grupos de animales. La pendiente de las respuestas mediadas por AMPAR disminuyó significativamente en los cortes de ratas con CRS tratadas con vehículo (gris, barra central de triplete de barras) en comparación con cortes de ratas sin estrés (negro, barra izquierda de triplete de barras) o con CRS tratadas con L-655,708 (blanco, barra derecha de triplete de barras) en el intervalo de intensidades de estimulación (ANOVA de 1 vía, $F(2,17) = 3,675$, $p = 0,047$; $n = 5$ sin estrés, 8 con CRS + vehículo, 7 con CRS + L-655,708; *, $p < 0,05$, prueba post hoc de LSD). No hubo diferencias significativas en las respuestas mediadas por NMDAR (ANOVA de 1 vía, $F(2,17) = 0,549$, $p = 0,588$). **FIG. 10C**, las relaciones de AMPA:NMDA se calcularon a partir de las pendientes iniciales de las respuestas en cada corte antes y después de la aplicación de DNQX (mostradas por líneas de puntos en A). Las proporciones de AMPA:NMDA disminuyeron significativamente en cortes de ratas CRS tratadas con vehículo en comparación con cortes de ratas sin estrés o con CRS tratadas con L-655,708 (ANOVA de 1 vía $F(2,17) = 4,345$ $p = 0,03$; $n = 5$ sin estrés, 8 con CRS + vehículo, 7 con CRS + L-655,708; *, $p < 0,05$ en comparación con sin estrés y con CRS+L-655,708, prueba post-hoc de LSD). Las notaciones de barra en la FIG. 10C son las mismas que en la FIG. 10B.

FIG. 11A y 11B. L-655,708 revierte rápidamente las disminuciones inducidas por el estrés en la expresión de GluA1 en las sinapsis TA-CA1 del hipocampo de rata. **FIG. 11A**, transferencias Western representativas de niveles de proteína GluA1 y β -actina en muestras de SLM de ratas sin estrés (izquierda) y ratas sometidas a 10 días de CRS y después una inyección administrada 24 horas antes de una solución bien de vehículo (centro) o de L-655,708 (derecha). **FIG. 11B**, la expresión de GluA1, normalizada a los niveles de β -actina, disminuyó significativamente en el tejido de ratas con CRS tratadas con vehículo (gris, barra central del triplete de barras) en comparación con el tejido de ratas sin estrés (negro, barra izquierda del triplete de barras) o ratas con CRS tratadas con L-655,708 (blanco, barra derecha de triplete de barras) (prueba H de Kruskal-Wallis: $\chi^2(2) = 10,62$, $p = 0,0049$; $n = 6$ sin estrés, 6 con CRS + vehículo, 8 con CRS + L-655,708; *, $p < 0,05$ en comparación con sin estrés y con CRS + L-655,708, prueba U post-hoc de Mann-Whitney).

FIG. 12A y 12B. Ni el estrés ni la inyección de L-655,708 afectan el tiempo en la zona de interacción en la condición de ausencia de diana. **FIG. 12A**, el porcentaje de tiempo transcurrido en la zona de interacción se cuantifica para las ratas durante el período inicial y 24 horas después de la inyección de cualquier vehículo (blanco, barra derecha del par de barras) o L-655,708 (negro, barra izquierda del par de barras) para los experimentos ilustrados en la FIG. 12A. **FIG. 12B**, porcentaje de tiempo transcurrido en la zona de interacción se cuantifica para las ratas sometidas a CUS (negro, barra izquierda del par de barras) o ratas sin estrés (blanco, barra derecha de un par de barras) durante el período inicial, 24 horas después de la inyección del vehículo y 24 horas después de la inyección de L-655,708 para los experimentos ilustrados en la FIG. 6B.

Descripción detallada

I. Definiciones ilustrativas

Como se usan en el presente documento, las palabras "un" y "una/o" cuando se usan en la presente memoria descriptiva junto con la expresión que comprende, incluidas las reivindicaciones, indica "uno o más". Algunas realizaciones de la invención pueden consistir o consisten esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento pueden implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento.

Las expresiones "nivel terapéutico"; "dosis terapéuticamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz", y similares, como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o concentración de un compuesto o agente, p. ej., un antagonista de GABA_AR, que logra un efecto terapéutico en un sujeto, en donde el efecto terapéutico puede ser una mejora o alivio, si no es una cesación completa, de uno o más síntomas de depresión clínica y otras afecciones similares, incluyendo las tendencias suicidas como se define en otra parte del presente documento. En realizaciones particulares, una dosis eficaz es la dosis del compuesto que da como resultado, en presencia del compuesto en el líquido cefalorraquídeo una concentración suficiente para unirse a los receptores GABA_A, incluidos los que contienen subunidades alfa 5. En realizaciones específicas, una dosis eficaz es la dosis del compuesto que da como resultado en presencia del compuesto en el líquido cefalorraquídeo una concentración suficiente para unirse al 10-75 % de todos los GABA_AR y así reducir la función de GABA_AR en un 10-75 %, aunque en realizaciones específicas los porcentajes son del 10-100%, 10-90 %, 10-80 %, 10-70 %, 10-60 %, 10-50 %, 10-40 %, 10-30 %, 10-20 %, 20-100 %, 20-90 %, 20-80 %, 20-70 %, 20-60 %, 20-50 %, 20-40 %, 20-30 %, 30-100 %, 30-90 %, 30-80 %, 30-70 %, 30-60 %, 30-50 %, 30-40 %, 40-100 %, 40-90 %, 40-80 %, 40-70 %, 40-60 %, 40-50 %, 50-100 %, 50-90 %, 50-80 %, 50-70 %, 50-60 %, 60-100 %, 60-90 %, 60-80 %, 60-70 %, 70-100 %, 70-80 %, 70-90 %, 70-80 %, 80-100 %, 80-90 %, 90-100 y así sucesivamente. En realizaciones específicas, el porcentaje de receptores que se unen es superior al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 %.

II. Realizaciones Generales

El trastorno depresivo mayor (MDD) afecta a casi el 20 por ciento de la población mundial, con el suicidio como un final demasiado común y trágico. Los antidepresivos monoaminérgicos (AD, por sus siglas en inglés), tal como inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSR), son el tratamiento de primera línea para el MDD, pero muchos pacientes no responden a estos medicamentos y la mejoría clínica generalmente requiere un tratamiento prolongado (de semanas a meses) en los pacientes que sí lo hacen. El retraso en la eficacia, así como la alta tasa de no respuesta, han motivado la búsqueda de mejores fármacos AD mejores. La ketamina, un antagonista del receptor de NMDA (NMDAR) no competitivo, ha demostrado eficacia como AD de acción rápida en pacientes refractarios al tratamiento. Las dosis bajas de ketamina dan como resultado una mejoría rápida y sostenida de los síntomas depresivos centrales y una disminución de la ideación suicida en individuos con MDD resistente al tratamiento (Berman *et al.*, 2000; Zarate *et al.*, 2006). De forma similar, la administración sistémica de ketamina en dosis subanestésicas (3-50 mg/kg) da como resultado un comportamiento similar a los AD en varios modelos de depresión en roedores (Maeng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). Aunque la ketamina ejerce una rápida acción de AD en seres humanos, su capacidad de uso fuera del ámbito de la investigación es limitado porque es adictiva y porque produce efectos disociativos, psicotomiméticos incluso a dosis bajas (p. ej., Machado-Vieira *et al.*, 2009). Por lo tanto, aunque la ketamina en sí misma tiene una capacidad terapéutica limitada, su rápida acción ha despertado un gran entusiasmo por la posibilidad de desarrollar AD de acción rápida. La ketamina también ha proporcionado una visión mecanicista crítica sobre cómo se pueden producir acciones rápidas de AD (p. ej., Li *et al.*, 2011), lo que genera esperanzas de que se puedan desarrollar nuevos fármacos que carezcan de sus desventajas y riesgos.

El mecanismo de acción terapéutica de acción rápida de la ketamina sigue siendo incierto. Se ha postulado que la ketamina es algo selectiva para los NMDAR en las interneuronas inhibitoras, de modo que su excitación se ve disminuida por la ketamina, dando como resultado una leve desinhibición de la población neuronal y un aumento general de su actividad. Los aumentos de actividad inducidos por la ketamina provocan, entonces, la estimulación de procesos dependientes de la actividad, tal como la potenciación y la activación a largo plazo de la diana de mamíferos de la vía de señalización de la rapamicina (mTOR) que conduce a la rápida inducción de la sinaptogénesis mediante el aumento de la síntesis de proteínas sinápticas (Li *et al.*, 2010) y el restablecimiento de la actividad normal.

En la presente divulgación, en determinadas realizaciones se consideró que, en última instancia, el leve aumento de la actividad global en los circuitos neuronales del prosencéfalo es el mecanismo mediante el cual se ejercen las acciones terapéuticas rápidas de los AD. Por lo tanto, se buscaron otros medios para producir tales cambios. En una realización, se consideró que producía una disminución directa de la fuerza de inhibición mediada por los receptores de tipo A del ácido γ -aminobutírico (GABA_AR). Sin embargo, la desinhibición promueve la ansiedad y la secreción epileptiforme. En otra realización, relacionada con los esfuerzos para desarrollar fármacos que potencian la memoria, una alternativa a la ketamina como AD de acción rápida incluye agonistas inversos parciales de GABA_A que contienen $\alpha 5$.

GABA_AR son canales iónicos heteropentaméricos dependientes de ligando. Se han identificado hasta la fecha, diecinueve subunidades de receptores GABA_A. La mayoría de receptores GABA_A contienen subunidades α , β y $\gamma 2$ en una estequiometría 2:2:1. Las subunidades β dirigen la inserción de la membrana, mientras que las subunidades $\gamma 2$ y

α adyacentes forman el sitio de las benzodiazepinas, un modulador alostérico de la apertura del canal. La identidad de la subunidad α determina el perfil farmacológico de este sitio. Los receptores que contienen subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ o $\alpha 3$ son potenciados por zolpidem, un agonista de benzodiazepinas de tipo 1, mientras que los receptores que contienen subunidades $\alpha 5$ son esencialmente insensibles al zolpidem. Estudios recientes han demostrado que las subunidades $\alpha 1$ median los efectos sedantes, anticonvulsivos y amnésicos de las benzodiazepinas preferentemente, mientras que las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ median sus efectos ansiolíticos. Además de los agonistas ansiolíticos de las benzodiazepinas, hay una clase de fármaco, ejemplificado por las β -carbólinas, que actúan como agonistas inversos totales o parciales en el sitio de las benzodiazepinas para disminuir el la función de los receptores GABA_A. Los agonistas inversos parciales ofrecen la ventaja de un intervalo de concentración terapéutica más amplio y una menor probabilidad de producir ansiedad o secreción epileptiforme, en realizaciones específicas de la divulgación.

El ARNm de la subunidad $\alpha 5$ se expresa altamente en las células piramidales del hipocampo y la corteza (Allen Brain Atlas) y los receptores GABA_A que contienen $\alpha 5$ están localizados en las dendritas de las células piramidales CA1 del hipocampo en sitios sinápticos y extrasinápticos. Debido a que la desinhibición promueve la inducción de potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y debido a su localización selectiva en el prosencéfalo, se están desarrollando fármacos que inhiben selectivamente los receptores que contienen $\alpha 5$ como potenciadores cognitivos. Se ha demostrado, por ejemplo, que los agonistas inversos parciales de receptores GABA_A que contienen $\alpha 5$ potencian la adquisición de memoria asociativa en tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo.

Por lo tanto, en realizaciones particulares de la divulgación uno o más agonistas inversos parciales del sitio de unión a benzodiazepinas de receptores GABA_A, particularmente aquellos que contienen una subunidad $\alpha 5$, producen una rápida acción antidepresiva en las formas unipolares y bipolares de depresión y reducen la ideación suicida al restaurar la función normal de las sinapsis excitatorias. Tales consideraciones pueden caracterizarse, por ejemplo, utilizando un modelo de depresión en roedores con validez aparente, teórica y pronóstica, estrés crónico impredecible (CUS, por sus siglas en inglés) para comparar las acciones de la administración a corto plazo (24 horas) de los agonistas inversos parciales selectivos de $\alpha 5$ (RO4938581, Ballard *et al.*, 2009; MRK-016, Atack *et al.*, 2009) y el agonista inverso no selectivo (FG7142; Shansky *et al.*, 2004) con las acciones de la ketamina administrada de forma aguda. La eficacia antidepresiva de los agonistas inversos parciales de receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ se prueban después *in vivo* utilizando las pruebas de preferencia por sacarosa y exploración social (Am- at *et al.*, 2010), por ejemplo. También se podría determinar la capacidad de los agonistas inversos parciales de receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ para revertir los marcadores electrofisiológicos de la depresión inducida por estrés usando análisis electrofisiológicos y bioquímicos *in vitro*.

En realizaciones de la divulgación, agonistas inversos parciales de receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ ejercen una acción antidepresiva comparable a la de la ketamina (Ibrahim *et al.*, 2012). En determinadas realizaciones, los pacientes pueden someterse a una exploración psiquiátrica convencional para determinar criterios DSM-IV para episodios depresivos mayores. En realizaciones específicas, se proporciona al individuo una solución salina que comprende uno o más de los agonistas, tal como infundido lentamente (aprox. 30-60 min), por ejemplo. Las pruebas de evaluación relacionadas con la depresión y otras, tal como la escala de Hamilton para la evaluación de la depresión, inventario de depresión de Beck, las escalas visuales analógicas puntúan como "alta" la intoxicación y la escala breve de evaluación psiquiátrica, pueden administrarse de forma repetida; solo como ejemplo, pueden administrarse durante un período de cuatro horas después de la administración del fármaco y diariamente durante los siete días siguientes. La eficacia antidepresiva, así como respuestas psicomiméticas o ansiogénicas, se determina sobre los cambios en las puntuaciones de las pruebas, en realizaciones específicas para mostrar la eficacia con un compuesto en particular.

Los estudios incluidos en el presente documento son los primeros en caracterizar la eficacia similar a un antidepresivo de los agonistas inversos parciales de receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$. el comienzo rápido de la acción antidepresiva, mostrado usando modelos preclínicos establecidos, por ejemplo, es muy deseable desde una perspectiva clínica y nunca se ha intentado con estos compuestos. Los estudios permiten demostrar que los agonistas inversos parciales de receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ son útiles al menos como tratamiento para la depresión.

III. Afecciones médicas de la divulgación

Existe una variedad de afecciones médicas en las que el tratamiento abarcado en esta divulgación produce una respuesta terapéutica beneficiosa. La afección médica puede diagnosticarse antes del tratamiento. En realizaciones específicas, se sospecha que el individuo tiene la afección médica, está en riesgo de tener la afección médica, ha mostrado un comportamiento indicativo de la afección médica, tiene antecedentes personales o familiares de la afección médica, etc. En determinadas realizaciones, los síntomas de la afección médica pueden superponerse con los síntomas de otros tipos de afecciones médicas relacionadas.

En realizaciones específicas, existe eficacia clínica en cualquier afección en la que se estén utilizando actualmente medicamentos antidepresivos, ya sea con aprobación regulatoria o mediante un uso "extraoficial". Los ejemplos específicos de afecciones médicas en las que los métodos y composiciones de la divulgación son útiles incluyen, pero sin limitación, trastornos relacionados con la depresión (tales como trastorno depresivo mayor (MDD); distimia; trastorno ciclotímico; trastorno afectivo estacional/depresión estacional; depresión después de una lesión cerebral

traumática; depresión posparto; trastorno disfórico premenstrual; síntomas depresivos asociados con la menopausia; depresión después de abuso/abstinencia de sustancias; trastorno bipolar; trastorno bipolar en remisión; y episodios depresivos del trastorno bipolar); trastornos relacionados con la ansiedad (tal como trastorno de ansiedad generalizada; trastorno obsesivo compulsivo; trastorno de control de impulsos; ansiedad asociada con la depresión; episodios repetidos de ansiedad, aprensión extrema o miedo a la interacción social (fobia social); trastornos de pánico; síndrome de estrés postraumático o trastorno de estrés postraumático; y trastorno de ansiedad por separación); trastornos relacionados con la atención (tal como trastorno por déficit de atención con hiperactividad; trastorno por déficit de atención con hiperactividad en adultos); trastornos relacionados con la psicosis (tales como esquizofrenia, trastorno del espectro de la esquizofrenia; enfermedad depresiva psicótica); trastornos alimentarios (tales como la anorexia nerviosa; bulimia; obesidad); trastornos de la personalidad (tal como el trastorno de la personalidad por evitación; trastorno antisocial de la personalidad; trastorno límite de la personalidad; trastorno de conducta; trastorno dependiente de la personalidad; trastorno depresivo de la personalidad; trastorno histriónico de la personalidad; trastorno narcisista de la personalidad; trastorno negativista de la personalidad; trastorno obsesivo-compulsivo de la personalidad; trastorno paranoide de la personalidad; trastorno esquizoide de la personalidad; trastorno esquizotípico de la personalidad) y otras afecciones tales como alteración de las facultades cognitivas después de una lesión cerebral traumática; dolor neuropático; dolor crónico de músculos o huesos; complicaciones diabéticas que dan como resultado lesiones nerviosas; ataque generalizado de debilidad muscular; episodios de sueño recurrentes durante el día; tratamiento y prevención de la migraña; y adicción a la nicotina. También, se pueden abordar cuestiones relacionadas con el tratamiento, tal como la falta de cumplimiento de los tratamientos actuales e intolerancia a los efectos secundarios de los tratamientos actuales. Las realizaciones de la divulgación proporcionan una mejoría con respecto a otras terapias en la técnica en los casos en los que el tratamiento de la divulgación es eficaz con menos dosis que otras terapias en la técnica.

En realizaciones particulares, se sabe que el individuo tiene o se sospecha que tiene MDD (que también se conoce como depresión clínica, depresión mayor, depresión unipolar o trastorno unipolar; o como depresión recurrente en el caso de episodios repetidos), que es un trastorno mental caracterizado por un estado de ánimo bajo generalizado y constante que está acompañado de una baja autoestima y de una pérdida de interés o placer en actividades normalmente agradables. En realizaciones específicas, el individuo con MDD (o con otra afección médica) tiene tendencias suicidas, aunque en realizaciones específicas la persona con tendencias suicidas no tiene depresión. Como ejemplo, un individuo puede tener tendencias suicidas si tiene uno o más de los siguientes atributos: depresión; intentos de suicidio previos; preocupación por la muerte; hacer declaraciones inquietantes o malhumoradas; hablar abiertamente de querer suicidarse; haber desarrollado un plan de suicidio; haber adquirido los medios para llevar a cabo un plan de suicidio; comportamiento de "simulacro"; establecer un tiempo para un intento de suicidio; lesiones autoinfligidas, tal como cortes, quemaduras y/o golpes en la cabeza; participar en conductas de riesgo, tal como conducir de forma imprudente, consumir fármacos y/o comportamientos sexuales de alto riesgo; hacer un testamento o regalar sus posesiones favoritas; decir adiós de forma inapropiada, etc. En los casos en que el individuo tenga depresión, puede ser unipolar o bipolar. El individuo puede tener una propensión a la depresión y/o pensamientos suicidas debido a una predisposición genética o familiar, por ejemplo, pero sin limitación, tener el polimorfismo Val66Met del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*, por sus siglas en inglés) y/o el polimorfismo de la región promotora *5HTLPPR* del gen transportador.

En realizaciones específicas, la afección que se está tratando con métodos y composiciones abarcados por la divulgación se considera resistente al tratamiento con tratamientos previamente existentes para la depresión (incluidos SSRI, SNRI y/o TCA, por ejemplo), tal como MDD resistente al tratamiento, por ejemplo.

Aunque en realizaciones particulares la afección médica se diagnostica antes del tratamiento, en otras realizaciones, el individuo se trata sin un diagnóstico formal de la afección, tal como en los casos en que un socorrista, respondedor médico, miembro de la familia, trabajador del hospital, o así sucesivamente, considera que el tratamiento está justificado. El individuo puede tratarse o no en un centro médico. En realizaciones específicas, el individuo padece depresión, ha tenido una o más conmociones cerebrales u otra lesión cerebral, está siendo tratado con una terapia (tal como un fármaco) que tiene como efecto secundario el suicidio y/o la depresión, abusa del alcohol u otros fármacos recetados o recreativos, es víctima de abuso mental y/o sexual, una combinación de los mismos, etc. El individuo puede ser un atleta profesional que ha tenido una o más conmociones cerebrales, como ejemplo. El individuo puede estar actualmente en el ejército o puede haber estado en el ejército. El individuo puede ser de cualquier raza, sexo o edad.

En realizaciones específicas, se considera que el tratamiento para el individuo es eficaz en un período de tiempo más corto que los tratamientos conocidos para la afección. Por ejemplo, en el caso de composiciones de la divulgación, el individuo puede tener un efecto terapéutico a los minutos, horas, días o semanas de la primera administración. En realizaciones particulares, al individuo se le administra la composición o composiciones terapéuticas una vez o más de una vez. En realizaciones específicas, hay uno o más efectos terapéuticos con la composición de la divulgación no más de días, horas o minutos después de la primera administración. Por ejemplo, el efecto terapéutico puede tener lugar no más de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día después de la primera administración. El efecto terapéutico no puede tener lugar no más de 96, 72, 48, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 hora después de la primera administración. El efecto terapéutico puede tener lugar no más de 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29,

28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto después de la primera administración. Un efecto terapéutico puede comprender una situación en la que el individuo ya no quiere suicidarse, o tiene un deseo reducido de suicidarse, o está teniendo dudas acerca de suicidarse, o ahora no está seguro de suicidarse, por ejemplo. Un efecto terapéutico puede comprender cuando un individuo ya no tiene depresión o cuando el individuo está menos deprimido o tiene menos síntomas de depresión o tiene períodos de tiempo más largos entre estados de ánimo depresivos, por ejemplo.

IV. Composiciones de la divulgación

En realizaciones específicas de la divulgación, se puede emplear una o más composiciones para el tratamiento de una o más afecciones médicas en las que la modulación del receptor GABA_A es terapéuticamente eficaz para la o las afecciones. En realizaciones específicas, el receptor GABA_A comprende una subunidad alfa5. Aunque en realizaciones particulares cualquier afección de este tipo es tratable, en realizaciones específicas, la afección tiene depresión o tendencias suicidas como al menos un síntoma. En realizaciones particulares, la administración de una o más composiciones de la divulgación al individuo proporciona el tratamiento de la afección o la prevención de la afección y/o reduce la aparición de la afección y/o reduce la gravedad de uno o más síntomas de la afección.

En realizaciones específicas, la composición utilizada para los métodos de la divulgación incluye uno o más moduladores negativos del receptor GABA_A. La expresión de moduladores negativos del receptor GABA_A, como se usa en la presente divulgación, puede referirse a compuestos que disminuyen la actividad del receptor GABA_A, p. ej., bloqueando o reduciendo la entrada de iones cloruro a través del poro del GABA_AR (es decir bloqueadores de canales) y/o bloqueando o reduciendo la unión de un agonista al GABA_AR (es decir, antagonistas de GABA_AR) y/o bloqueando o reduciendo un efecto de un agonista sobre el GABA_AR (es decir, moduladores alostéricos negativos). Un bloqueador del canal GABA_AR ilustrativo es la picrotoxina. Los agonistas de GABA_AR ilustrativos incluyen bicuculina y pentilentetrazol. Un bloqueador del canal GABA_AR ilustrativo es la picrotoxina. Los moduladores alostéricos negativos de GABA_AR ilustrativos incluyen agonistas inversos del receptor de benzodiazepinas selectivos y no selectivos.

Ejemplos de moduladores negativos del receptor GABA_A son los siguientes:

1. *Moduladores alostéricos negativos que actúan en el sitio de unión a benzodiazepinas.* Las subunidades beta dirigen la inserción de la membrana, mientras que las subunidades gamma2 y alfa adyacentes forman el llamado sitio de las benzodiazepinas, un modulador alostérico de la apertura del canal. La identidad de la subunidad α determina el perfil farmacológico de este sitio. Los GABA_AR que contienen subunidades α 1, α 2 o α 3 están potenciados por zolpidem, un agonista de benzodiazepinas de tipo 1, mientras que los GABA_AR que contienen subunidades α 5 son esencialmente insensibles a zolpidem (Burgard *et al.*, 1996). Estudios recientes han demostrado que las subunidades α 2 median los efectos sedantes, anticonvulsivos y amnésicos de las benzodiazepinas preferentemente, mientras que las subunidades α 2 y α 3 median sus efectos ansiolíticos (Rudolph *et al.*, 1999; Mohler *et al.*, 2002). Además de los agonistas ansiolíticos de las benzodiazepinas, existe una clase de fármacos, ejemplificada por las β -carbolinas que actúan como agonistas inversos totales o parciales en el sitio de las benzodiazepinas para disminuir la función del GABA_AR. Los agonistas inversos parciales ofrecen la ventaja de un intervalo de concentración terapéutica más amplio y una menor probabilidad de producir ansiedad o secreción epileptiforme, en realizaciones específicas.

El ARNm de la subunidad α 5 se expresa altamente en las células piramidales del hipocampo y la corteza (Allen Brain Atlas) y los GABA_AR que contienen α 5 están localizados en las dendritas de las células piramidales CA1 del hipocampo (Fritschy and Mohler, 1995; Wainwright *et al.*, 2000) en sitios sinápticos y extrasinápticos (Serwanski *et al.*, 2006). Debido a que la desinhibición promueve la inducción de potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y debido a su localización selectiva en el prosencéfalo, se están desarrollando fármacos que inhiben selectivamente los receptores que contienen α 5 como potenciadores cognitivos (Ballard *et al.*, 2009). Se ha demostrado, por ejemplo, que los agonistas inversos parciales de los GABA_AR que contienen α 5 potencian la adquisición de memoria asociativa en tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo (Collinson *et al.*, 2002).

Los ejemplos representativos de agonistas inversos del sitio de unión a benzodiazepinas son los siguientes:
General, no selectivo de subunidades: sarmazenil, beta-carbolinas, S-8510, DMCM, FG 7142.

Selectivo de subunidad α 5: la clase de compuestos de imidazo[1,5-a] [1,2,4] -triazolo[1,5-d] [1,4]benzodiazepinas (tales como RO4882224, RO4938581, L-655,708), la clase de compuestos de triazolofthalazinas (tal como α 5IA), la clase de compuestos de 7,8,9,10-tetrahidro-(7,10-etano)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazinas, la clase de compuestos de pirazolotriazinas (tal como MRK-016), la clase de compuestos de 6,7-dihidro-2-benzotiofen-4 (5H)-ona, 6,6-dimetil-3-(2-hidroxietil)tio-1-(tiazol-2-il)-6,7-dihidro-2-benzotiofen-4(5H)-ona, la clase de compuestos de 3,4-dihidronaftalen-1(2H)-ona, (3-*terc*-butil-7-(5-metilisoxazol-3-il)-2-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-ilmetoxi)pirazolo[1,5-d] [1,2,4] triazinas, la clase de compuestos de 3-fenil-5-arilpiridazinas, Ro 15-4513, RY-010, RY-023, RY-024, RY-080 y RG1662.

2. *Moduladores alostéricos negativos que actúan en el sitio de unión a esteroides barbitúricos.* Los barbitúricos son fármacos que se desarrollaron originalmente por sus propiedades sedantes. Actúan como moduladores alostéricos positivos de los GABA_AR para aumentar la eficacia de GABA mediante un aumento en el tiempo de apertura del canal. Se cree que los barbitúricos se unen en la interfaz entre una subunidad α y β del GABA_AR (Sieghart *et al.*, 2012). Los barbitúricos a concentraciones supraclínicas también pueden abrir directamente el canal en ausencia de GABA.

Aunque todavía no se han descrito moduladores alostéricos negativos que actúan en este sitio, en realizaciones específicas, ejercen acciones antidepresivas y pueden ser o no selectivos para los receptores que contienen subunidades $\alpha 5$.

- 5 3. *Moduladores alostéricos negativos que actúan en el sitio de unión a esteroides neuroactivos.* Los esteroides neuroactivos son compuestos endógenos que pueden sintetizarse en el cerebro a partir del colesterol o precursores de esteroideos o por metabolismo de esteroides suprarrenales o esteroides gonadales, tal como la testosterona (Mellon y Griffin, 2002). Los ejemplos de esteroides neuroactivos incluyen pregnenolona y dehidroepiandrosterona, sus sulfatos y sus metabolitos reducidos. La alopregnanolona y la tetrahidrodesoxicorticosterona son moduladores
- 10 alostéricos positivos de las corrientes de cloruro mediadas por $GABA_A$ R, mientras que el sulfato de pregnenolona y el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA, por sus siglas en inglés) son moduladores alostéricos negativos. Los esteroides neuroactivos se unen a la subunidad delta del $GABA_A$ R, que se expresa de manera fuerte en el prosencéfalo y el estriado ventral; regiones del cerebro implicadas en la génesis de la depresión. Existe evidencia de que el embarazo se asocia con disminuciones en la expresión de subunidades delta y con la elevación de los niveles de neuroesteroides (Maguire *et al.*, 2009), en realizaciones específicas que implican la desregulación en sus interacciones como un factor que contribuye a la depresión posparto.

Se han desarrollado fármacos para imitar los efectos alostéricos positivos de los esteroides neuroactivos y se utilizan clínicamente como sedantes y anestésicos, tal como alfaxolona, alfadolona, hidroxidiona y minaxolona. Debido a la

20 presencia de esteroides neuroactivos endógenos en el cerebro, también se puede predecir que un antagonista de este sitio debilite la inhibición mediada por $GABA_A$ R. Debido a que algunos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), tal como fluoxetina, se informa que elevan los niveles de esteroides neuroactivos endógenos en el cerebro (Pinna *et al.*, 2006), en realizaciones específicas, un antagonista en este sitio también amplifica los efectos de tales SSRI. Los fármacos que interactúan en este sitio son útiles en el tratamiento de la depresión posparto, en

25 realizaciones específicas.

4. *Antagonistas competitivos del $GABA_A$ R.* Se han desarrollado numerosos compuestos que actúan para bloquear la unión de GABA al $GABA_A$ R de manera competitiva. Un ejemplo bien conocido es la bicuculina. Los antagonistas competitivos disminuyen la capacidad del GABA liberado sinápticamente para activar el canal. Los miembros potentes

30 de esta clase de compuestos reducen tanto la inhibición que con frecuencia se utilizan para provocar descargas epileptiformes en estudios preclínicos. Una acción proconvulsiva debería minimizarse en gran medida para que un miembro de esta clase de compuestos sea clínicamente útil, sin embargo, es útil un antagonista con baja afinidad, en determinadas realizaciones.

35 Ejemplos representativos de antagonistas de $GABA_A$ R son los siguientes: picrotoxina, bilobalida, pentilenetetrazol, tuyona y ginkgolida B.

5. *Moduladores negativos que actúan en el poro del canal $GABA_A$ R.* Se han desarrollado numerosos compuestos que actúan para bloquear el flujo de iones Cl^- a través del poro del $GABA_A$ R. Debido a que no compiten con GABA en su

40 receptor en el canal, se les conoce como antagonistas no competitivos (NCA, por sus siglas en inglés). El ejemplo más conocido es la picrotoxina, que también es altamente epileptogénico. Los fármacos activos en este sitio se utilizan ampliamente como insecticidas y actúan bloqueando físicamente el canal, aunque no se ha descartado la modulación alostérica. La subunidad $\beta 3$ puede ser particularmente relevante para la unión de NCA (Chen *et al.*, 2006). Los bloqueadores de baja afinidad serían útiles para la utilidad clínica.

45 6. *Otros moduladores negativos.* La nicotinamida y compuestos relacionados, así como agonistas inversos y antagonistas del sitio de unión a propofol del $GABA_A$ R, son moduladores negativos útiles de la inhibición mediada por $GABA_A$ R, en realizaciones específicas.

50 Por lo tanto, en realizaciones específicas, se utilizan uno o más moduladores negativos de los receptores $GABA_A$, ya sea actuando alostéricamente, bloqueando el canal, o bloqueando el receptor del propio GABA, en los métodos terapéuticos de la divulgación, por ejemplo, para producir una acción antidepresiva fuerte en formas unipolares y bipolares de depresión, en trastorno de estrés postraumático y en depresión posparto, elevando el estado de ánimo y/o reduciendo la ideación suicida. En realizaciones específicas, el mecanismo de acción de estos compuestos es un

55 fortalecimiento de las sinapsis excitatorias que se debilitan patológicamente en pacientes deprimidos. En realizaciones específicas, estos compuestos actúan más rápidamente que los antidepresivos convencionales, tales como inhibidores de la recaptación y catabolismo de neurotransmisores monoamínicos. En realizaciones particulares, la depresión es el resultado de un debilitamiento patológico de las sinapsis excitatorias en múltiples regiones del cerebro que afecta a la función de los circuitos de recompensa en el mesencéfalo ventral, y los métodos de la divulgación proporcionan una

60 terapia que aborda este evento fisiológico.

En una realización de esta divulgación, los moduladores negativos de $GABA_A$ R se administran solos a una dosis terapéuticamente eficaz. En otra realización, los moduladores negativos de $GABA_A$ R se administran en una dosis terapéuticamente eficaz junto con uno o más tratamientos antidepresivos convencionales. En esta realización, el o los

65 antidepresivos convencionales se pueden administrar (por ejemplo, por vía oral) con los regímenes de dosificación estándar aprobados por la FDA.

En una realización de la divulgación, los moduladores negativos de GABA_AR se administran a una dosis terapéuticamente eficaz, fija o variable, durante un período de tiempo ilimitado para tratar la depresión y afecciones relacionadas. En realizaciones específicas, a un individuo se le proporciona un régimen de dosificación inicial que

- 5 tiene una dosis más fuerte del tratamiento que un régimen de dosificación posterior que tiene una dosis que es menor que la dosis inicial. En algunas realizaciones, a un individuo se le proporciona un régimen de dosificación inicial que tiene una dosis menor del tratamiento que un régimen de dosificación posterior que tiene una dosis que es mayor que la dosis inicial.
- 10 En una realización de la divulgación, Los moduladores negativos de GABA_AR se administran en una dosis terapéuticamente eficaz en un número limitado de ocasiones (p. ej., una vez por semana o una vez cada 2-3 días) durante un período de tiempo limitado (p. ej., 1-4 meses). El modulador puede administrarse 1, 2, 3 o 4 o más veces al día durante un período de tiempo particular, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses. Los tratamientos antidepresivos convencionales se pueden administrar de forma
- 15 continua, según los regímenes de dosificación actuales aprobados por la FDA y otras autoridades reguladoras. El estado depresivo del individuo puede o no determinarse durante el curso del tratamiento.

En realizaciones específicas, un modulador negativo de GABA_AR actúa sobre alfa 5 pero también actúa sobre otras subunidades del GABA_AR.

- 20 En realizaciones particulares, se utilizan uno o más análogos o derivados de un modulador negativo de GABA_AR. Un experto en la materia reconoce cómo modificar un modulador y probar su actividad en métodos descritos en otra parte en el presente documento, tal como en modelos en ratones.

- 25 En determinadas realizaciones, la formulación del uno o más moduladores se adapta a las necesidades del individuo. Por ejemplo, en los casos en que un individuo tenga un problema de depresión crónica, la formulación puede necesitar ser tal que la cantidad en el individuo se mantenga en una meseta, sin embargo, el modulador para un individuo con depresión severa inminente y/o suicidio puede necesitar formularse para que ingrese rápidamente al torrente sanguíneo.

30 V. Terapia de combinación

En determinadas realizaciones, los métodos de la presente divulgación para aspectos clínicos se combinan con otros agentes eficaces en el tratamiento de una o más afecciones médicas abarcadas por la divulgación. La terapia de la presente invención puede preceder o seguir al tratamiento con otro agente en intervalos que varían de minutos a días, a semanas, por ejemplo. En realizaciones en las que el otro agente y composición o composiciones de la presente divulgación se administran por separado al individuo, habría que asegurarse, en general, de que no pasara un período de tiempo significativo entre el momento de cada suministro, de manera que el agente y la terapia de la invención todavía podrían ejercer un efecto combinado ventajoso sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se puede

40 poner en contacto la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente las 0-24 horas entre sí y, en realizaciones específicas, dentro de aproximadamente 6-12 h, 1-6 h, menos de una hora, 1-12 h, 1-3 h, o 1-24 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, sin embargo, cuando transcurren de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones correspondientes. En realizaciones específicas, los ciclos de tratamiento se repetirán

45 según sea necesario.

En determinadas realizaciones, se proporciona una terapia adicional al individuo al inicio del tratamiento con métodos y/o composiciones de la divulgación, aunque la terapia adicional se puede proporcionar antes, durante y/o después del comienzo del tratamiento con métodos y/o composiciones de la divulgación. En algunos casos, el individuo puede suspender el tratamiento con los métodos y/o composiciones de la divulgación una vez que se le ha administrado una

50 terapia adicional al individuo, incluso durante un período de tiempo tal que la terapia adicional pueda ser eficaz.

En realizaciones particulares, se proporcionan al individuo una o más terapias adicionales distintas de las abarcadas por la divulgación y además de las mismas. La terapia adicional puede ser para la depresión, tendencias suicidas, etc.

55 A continuación se proporcionan ejemplos de fármacos y tratamientos antidepresivos convencionales, y uno o más de estos pueden emplearse con las composiciones de la divulgación. Las dosis son mg/día por vía oral (p.o.) a menos que se indique lo contrario.

Los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI) incluyen selegilina -1,25-12 mg/día; tranilcipromina 10-60 mg/día; moclobemida 100-600 mg/día (MAOI reversible, aprobado fuera de EE. UU.); fenelzina 15-90 mg/día; isocarboxazida; y una combinación de los mismos.

60

Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRi) incluyen Citalopram 10-20 mg/día; escitalopram 10-20 mg/día; fluoxetina 10-40 mg/día o 90 mg/semana de liberación lenta; paroxetina 10-40 mg/día; pertralina 25-200 mg/día; fluvoxamina 50-300 mg/día; y una combinación de los mismos.

65

Los inhibidores selectivos de la recaptación serotoninérgicos y noradrenérgicos (SSRI/SNRI) incluyen venlafaxina XR 37,5-225 mg/d; desvenlafaxina 50-100 mg/día; duloxetina 20-120 mg/día; milnacipran 12,5-200 mg/día; levomilnacipran; amoxapina; protriptilina; nefazodona (antagonista moderado de los receptores 5HT-2 y alfa-adrenérgicos); y una combinación de los mismos.

5 Los estimulantes (uso extraoficial) incluyen metilfenidato 2,5-20 mg/día por vía oral o 10-30 mg por vía transdérmica; modafinilo 100-400 mg; y una combinación de los mismos.

10 Ejemplos de antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA incluyen ketamina 6,5-13 mg/kg por inyección intramuscular o 1-4,5 mg/l < g por vía intravenosa; lanicemina (también conocida como AZD6765 o AR-R15896AR); memantina 5-20 mg/día; amantadina 100-200 mg/día; metoxetamina 6-10 mg/kg (NMDAR y recaptación de serotonina); riluzol 50 mg/día; y una combinación de los mismos.

15 Los ejemplos de antidepresivos tricíclicos (TCA) incluyen desipramina 10-150 mg/día; nortriptilina 10-100 mg/día; Amitriptilina 20-300 mg/día; Clomipramina 25-250 mg/día; Doxepina 10-300 mg/día; Imipramina 30-300 mg/día; Melitracen 10-225 mg/día; Amlneptina 25-250 mg/día; Opipramol 50-300 mg/día; Tianeptina 12,5-75 mg/día; Trimipramina 25-300 mg/día; y una combinación de los mismos.

20 Ejemplos de otros medicamentos incluyen atomoxetina 40-100 mg/día (solo recaptación de norepinefrina selectiva de Strattera); Bupropion 75q12h o 150-300/día; Bupirone (extraoficial) 10-30 mg/día en múltiples dosis; Hypericum perforatum (hierba de San Juan extraoficial) 300-3600 mg/día; Lamotrigina XR 25-200 mg/día; mirtazapina 7,5-45 mg/día; trazadona 25-400 mg/día; L-triiodotironina (extraoficial) 25-50 microgramos/día; vilazodona 10-40 mg/día; dexanabol (HU-211) 150 mg IV (inmunomodulador derivado de cannabinoides y antagonista de NMDAR) quetlapina (antipsicótico atípico); aripirazol (antipsicótico atípico; usado con frecuencia en combinación con otros medicamentos); y una combinación de los mismos.

Las combinaciones de fármacos de uso común incluyen clordiazepóxido/amitriptilina; fluoxetina/oianzapina; y perfenazina/amitri, y se pueden emplear una o más de las combinaciones con las composiciones de la divulgación

30 Otras intervenciones incluyen la terapia electroconvulsiva (ECT, por sus siglas en inglés), unilateral o bilateral; estimulación magnética transcraneal (TMS, por sus siglas en inglés) o terapia TMS repetitiva (rTMS); psicoterapia (tal como, pero sin limitación, la terapia de resolución de problemas; terapia cognitiva conductual; psicoterapia interpersonal; intervenciones psicosociales (centradas en la familia, terapias de ritmos interpersonales y sociales) y terapia de adaptación a problemas (PATH, por su siglas en inglés), y se pueden emplear una o más de las intervenciones con composiciones de la divulgación.

Puede emplearse la terapia de ejercicio (que se centra en la activación conductual, un concepto central de la terapia cognitiva-conductual) y se pueden emplear uno o más tipos de ejercicio con las composiciones de la divulgación.

40 VI. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz de una o más composiciones como se divulga en el presente documento disueltas o dispersadas en un transportador farmacéuticamente aceptable. Las oraciones "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un animal, tales como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que en algunos casos contiene al menos un modulador negativo de un receptor GABA_A de la invención, y en algunos casos un principio activo adicional, serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado por referencia en el presente documento. Por otra parte, para la administración a animales (p. ej., seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con la esterilidad, pirogenicidad, estándares generales de seguridad y pureza según las exigencias de las normas de la Oficina de normas biológicas de la FDA.

55 Como se usan en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardo de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sabría un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329, incorporado por referencia en el presente documento). Excepto en la medida en que cualquier transportador convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

65 La o las composiciones pueden comprender diferentes tipos de transportadores dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o de aerosol, y si deben ser estériles para dichas vías de administración tal como inyección.

La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleural, por vía intratraqueal, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía tópica, por vía intratumoral, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía subconjuntival, por vía intravesicular, por vía mucosa, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía intraocular, por vía oral, por vía tópica, por vía local, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que riega células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (p. ej., liposomas), como un aerosol o por otro método o cualquier combinación de los anteriores, como sabría un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado por referencia en el presente documento).

La cantidad de dosis real de una composición de la presente invención administrada a un individuo puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad a tratar, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas y la vía de administración. El médico responsable de la administración, en todo caso, determina la concentración de principio activo (o principios activos) en una composición y la dosis adecuada para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1 % de una composición. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, por ejemplo y cualquier intervalo derivado de los mismos. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal, 0,5 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo que pueda derivarse a partir de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, un intervalo de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, etc., puede administrarse, basándose en los números descritos anteriormente. En determinadas realizaciones de la invención, se contemplan diversos mecanismos de dosificación. Por ejemplo, la composición se puede administrar una o más veces al día, una o más veces a la semana, o una o más veces al mes y así sucesivamente.

En cualquier caso, la composición puede comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante conservantes tal como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitación, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

La composición puede formularse en forma de base libre, neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales formadas con los grupos carboxilo libres derivados de bases inorgánicas tal como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones donde la composición está en forma líquida, un transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero sin limitación, agua, etanol, poliol (p.ej., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (p. ej., triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido por dispersión en transportadores tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de tensioactivos tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos dichos métodos. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la presente invención en la cantidad necesaria del disolvente apropiado con diferentes cantidades de los otros ingredientes diferentes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido esterilizado por filtración del mismo. El medio líquido debe estar tamponado de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hará isotónico primero, antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas

concentraciones de los principios activos en un área pequeña.

La composición ha de ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse al mínimo en un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, puede lograrse la absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

VII. Kits de la divulgación

Cualquiera del uno o más moduladores negativos de las composiciones de receptores GABA_A abarcadas en el presente documento pueden estar incluidas en un kit y se alojan en un recipiente adecuado. Los kits comprenderán así, en un recipiente adecuado, una o más composiciones y, en algunos casos, un agente adicional de la presente invención. En algunos casos, existen uno o más agentes distintos a los de la composición de la divulgación que se incluyen en el kit, tales como uno o más agentes diferentes para el tratamiento de la depresión o tendencias suicidas. En realizaciones particulares, existe un aparato o cualquier tipo de medio para el diagnóstico de depresión y/o tendencias suicidas.

Los componentes de los kits pueden envasarse bien en medios acuosos o en forma liofilizada. El recipiente de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro recipiente, en el que se puede colocar un componente y preferentemente, distribuir en alícuotas adecuadamente. Cuando existe más de un componente en el kit, el kit también puede contener generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en los que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, en un vial pueden estar comprendidas diferentes combinaciones de componentes. Los kits de la presente divulgación también incluirán generalmente un medio para contener la composición, agente adicional y cualquier otro recipiente de reactivos en aislamiento cerrado para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conserven los viales deseados.

Las composiciones también pueden formularse en una composición inyectable. En cuyo caso, el recipiente puede ser una jeringa en sí mismo, una pipeta y/u otro aparato similar, a partir del cual la formulación puede aplicarse a un área infectada del cuerpo, inyectarse en el individuo y/o incluso aplicarse y/o mezclarse con los otros componentes del kit. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo o polvos secos. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otro recipiente. El kit puede configurarse de manera que se pueda usar fácilmente dentro o fuera de un centro médico, incluso en público, en una ambulancia, en un hogar o en una escuela, por ejemplo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar de forma más completa las realizaciones preferidas de la divulgación. No deberían, de ninguna manera, sin embargo, interpretarse como limitantes del amplio alcance de la divulgación.

EJEMPLO 1

MODULADOR NEGATIVO DE GABA_AR EN MODELO PARA DEPRESIÓN

Utilizando un modelo de depresión en roedores con validez aparente, teórica y pronóstica, estrés crónico impredecible (CUS), se demuestra que la administración a corto plazo (24 h) de un modulador negativo de GABA_AR tiene una eficacia similar a la de un antidepresivo en este modelo. Específicamente, un agonista inverso parcial de GABA_AR que contienen la subunidad $\alpha 5$, L-655,708, restaura el comportamiento de ratas previamente sometidas a CUS durante 3-6 semanas al comportamiento observado en ratas de control sin estrés tanto en la prueba de preferencia por sacarosa como en las pruebas de interacción social (Amat *et al.*, 2010; Willner *et al.*, 1987). Coherente con las opiniones ampliamente difundidas en el campo, la restauración de la preferencia por sacarosa indica que el compuesto ha revertido la anhedonia inducida por estrés, un síntoma principal de la depresión en seres humanos.

En determinadas realizaciones, otros agonistas inversos parciales selectivos de $\alpha 5$ (RO4938S81, Ballard *et al.*, 2009; MRK-016, Attack *et al.*, 2009) y un agonista inverso no selectivo (FG7142; Shansky *et al.*, 2004) ejercen acciones similares. Coherente con los hallazgos anteriores, no hay evidencia de un aumento de ansiedad en la prueba de campo abierto con L-655,708. Se puede determinar si la administración de agonistas inversos parciales de los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ pueden revertir los marcadores electrofisiológicos de la depresión inducida por estrés (disminución de la expresión de GluA1, disminución de las relaciones AMPA:NMDA, respuestas prolongadas a agonistas de 5-HT1BR) que se describen en otra parte (Cai *et al.*, 2013; Kallarackal *et al.*, 2013), utilizando análisis electrofisiológicos y bioquímicos *in vitro*.

Dado que los agonistas inversos parciales de GABA_AR que contienen la subunidad $\alpha 5$ ejercen una acción antidepresiva en estudios con animales, comparables a los mostrados por otros para la ketamina (Ibrahim *et al.*, 2012), en realizaciones específicas, muchos otros compuestos que debilitan la inhibición sináptica mediada por GABA_AR en los circuitos de recompensa del prosencéfalo y el hipocampo demuestran una eficacia similar en un entorno clínico en seres humanos. En realizaciones particulares, los compuestos pueden ser activos por vía oral y/o autoadministrados, pero se puede infundir por vía intravenosa, por ejemplo. En realizaciones específicas, los individuos muestran una mejora en uno o más ensayos convencionales de depresión, tal como la escala de Hamilton para la evaluación de la depresión, el inventario de depresión de Beck y/o la escala breve de evaluación psiquiátrica, por ejemplo. La eficacia antidepresiva, así como los posibles efectos secundarios negativos, tal como psicotomimético de respuestas ansiogénicas, puede ser fácilmente aparente a partir de cambios en las puntuaciones de las pruebas. Se puede determinar en animales o seres humanos cuánto tiempo continuaría la mejora después de la administración con la cumplimentación repetida de cuestionarios clínicos ampliamente utilizados (por ejemplo, la Escala de Hamilton de evaluación para la depresión, la escala de Montgomery-Asberg de evaluación de la depresión *etc.*), por ejemplo.

EJEMPLO 2

MODULADOR NEGATIVO DE GABA_AR Y TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN

La depresión es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. La depresión grave afecta hasta al 5% de la población de EE. UU., mientras que el 20 % padece formas más leves (Nestler *et al.*, 2002). La carga económica anual de la depresión en los Estados Unidos es de miles de millones de dólares. Entre los muchos síntomas devastadores de la depresión, la prevalencia del suicidio (38.000 muertes/año) la convierte en una enfermedad que necesita desesperadamente un tratamiento terapéutico más eficaz. A pesar de su alta incidencia e impacto socioeconómico, la etiología de la depresión sigue siendo poco conocida. La depresión probablemente involucra una combinación de factores genéticos (Flint y Kendler, 2014; Hamet y Tremblay, 2005) y ambientales (Nestler *et al.*, 2002). Se han identificado muchos genes que aumentan el riesgo de depresión, pero ningún gen tiene una penetrancia fuerte.

No está claro cómo interactúan los factores genéticos y ambientales para desencadenar la depresión. Un factor ambiental común que aumenta la probabilidad de episodios depresivos es el estrés. Los pacientes deprimidos informan de acontecimientos vitales más estresantes que los sujetos no deprimidos, incluyendo enfermedad física, relaciones familiares problemáticas y dificultades financieras (Billings *et al.*, 1983). La naturaleza del o de los cambios producidos en el cerebro por el estrés que promueve la depresión en individuos susceptibles sigue siendo desconocida.

Antidepresivos (AD). El aumento de la señalización monoaminérgica por inhibición de su recaptación con medicamentos como los SSRI es el tratamiento de referencia, pero los SSRI son eficaces solo en aproximadamente la mitad de los pacientes. Además, el retraso de 3-8 semanas entre el comienzo de la medicación y el efecto terapéutico complica la optimización de la medicación y retrasa el alivio sintomático. Se necesita una mejor comprensión para diseñar terapias más eficaces.

El descubrimiento de que la ketamina ejerce una acción antidepresiva rápida (Trullas y Skolnick, 1990) cuando se administra en un entorno clínico ha causado gran entusiasmo (Berman *et al.*, 2000; Zarate *et al.*, 2006). Sin embargo, existe la preocupación de que su naturaleza adictiva y su capacidad para desencadenar episodios psicotomiméticos (p.ej., Machado-Vieira *et al.*, 2009) puede evitar que alcance su capacidad para salvar vidas y reducir la discapacidad. No obstante, su capacidad para aliviar rápidamente la ideación suicida y otros síntomas depresivos centrales ha obligado a la comunidad médica a repensar las causas de la depresión y las dianas a las que dirigir los fármacos antidepresivos. Como en los pacientes, la administración de ketamina da como resultado una respuesta conductual similar a los AD en roedores sometidos a estrés crónico (Maeng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). La ketamina también ha proporcionado una visión mecanicista crítica sobre cómo se pueden producir acciones rápidas de AD (por ejemplo, Li *et al.*, 2011; Autry *et al.*, 2011), lo que genera esperanzas de que se puedan desarrollar nuevos medicamentos que se dirijan a los mismos mecanismos de señalización, pero carezcan de las desventajas y los riesgos de la ketamina.

Sinapsis excitatorias y depresión. Un elemento común que vincula el estrés con las acciones terapéuticas de los SSRI (Cal *et al.*, 2013) y ketamina (Kavalali y Monteggia, 2012) son sus efectos compartidos, pero opuestos, sobre las sinapsis excitatorias. Existe una creciente evidencia de que el estrés crónico ejerce efectos perjudiciales sobre la estructura y función sinápticas excitatorias en múltiples regiones del cerebro que están asociadas con las facultades cognitivas y la emoción (McEwen, 1999), mientras que la ketamina, la serotonina y los SSRI ejercen una acción opuesta para promover la transmisión sináptica excitatoria en algunas de estas mismas áreas (Autry *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013; Kallarackal *et al.*, 2013). En el núcleo accumbens (NAc), por ejemplo, Lim *et al.* (2012) demostraron que las sinapsis excitatorias en células estrelladas espinosas medianas que expresan D1 tienen una disminución selectiva en la excitación mediada por AMPAR después de 5 días de estrés crónico por restricción. Esta disminución de la excitación se produce en paralelo con muchos cambios conductuales, incluyendo anhedonia en la prueba de preferencia por sacarosa y preferencia de lugar condicionada alterada. Las manipulaciones experimentales que causan una disminución de la excitación mediada por AMPAR imitan los cambios conductuales inducidos por estrés en animales sin estrés y las manipulaciones que previenen la disminución de la excitación mediada por AMPAR

bloquean los cambios conductual en animales estresados, lo que indica que esta disminución de la excitación es suficiente y necesaria para estos cambios conductuales. La fuente de los axones que forman estas sinapsis excitatorias no se identificó, pero es probable que incluya aferentes del hipocampo, corteza prefrontal y amígdala. La activación de las neuronas que expresan D1 promueve la liberación de dopamina de las células en el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés), por lo que una disminución en su capacidad para impulsar la liberación de dopamina debido a la disminución de la excitación, junto con cambios en la activación de las células del VTA (Chaudhury *et al.*, 2013), puede contribuir a la pérdida de las propiedades gratificantes de los estímulos normalmente placenteros. El estrés crónico también debilita las sinapsis excitatorias dentro de la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés) (Yen *et al.*, 2012) y el hipocampo (Kallarackal *et al.*, 2013), probablemente reduciendo el impulso aferente de la NAc y disminuyendo adicionalmente la liberación de dopamina al recompensar los estímulos. La administración crónica de fluoxetina restaura la fuerza de las sinapsis del hipocampo y revierte las disminuciones en la expresión de GluA 1 inducidas por estrés (Kallarackal *et al.*, 2013).

En realizaciones de la divulgación, el estrés crónico promueve la depresión al debilitar subconjuntos de sinapsis excitatorias en múltiples regiones del cerebro que son críticas en la determinación del afecto y la recompensa. La depresión se debe a que el efecto neto de la excitación sináptica debilitada es alterar la activación de los circuitos de recompensa (p. ej. Nestler y Carlezon, 2005). Siguiendo esta consideración, la restauración de la fuerza sináptica excitatoria es una acción crítica de todos los antidepresivos eficaces, en realizaciones particulares.

Aunque permanece en investigación activa, la acción terapéutica de acción rápida de la ketamina es coherente con la implicación de las sinapsis excitatorias en la depresión (FIG. 1). Una hipótesis es que la ketamina es algo selectiva para los NMDAR en las interneuronas inhibitoras (Moghaddam *et al.*, 1997; Farber *et al.*, 1998; Kavalali y Monteggia, 2012), de manera que la ketamina disminuye su excitación. Esto da como resultado una desinhibición leve de la población neuronal y un aumento general de la actividad oscilatoria de alta frecuencia en animales (p.ej., Kittleberger *et al.*, 2012) y seres humanos (Cornwell *et al.*, 2012). Probablemente debido a este aumento en la actividad de la red, la ketamina desencadena varios procesos dependientes de la actividad, tal como la potenciación a largo plazo, el aumento de la expresión del gen deltaFosB temprano inmediato y la activación de las vías de señalización mTOR y/o eEF2. En última instancia, esto conduce a la rápida inducción de genes relacionados con la sinapsis, al aumento de la síntesis de proteínas sinápticas (Li *et al.*, 2010; Autry *et al.*, 2011) y a la restauración de la fuerza sináptica normal. Estos resultados indican que, en última instancia, el leve aumento de la actividad global en los circuitos neuronales del prosencéfalo es el mecanismo mediante el cual se ejercen las acciones terapéuticas rápidas de los AD.

Se puede probar otro medio de producir tales cambios, concretamente, el debilitamiento leve y selectivo de la fuerza de inhibición mediada por los receptores de tipo A del ácido gamma-aminobutírico (GABAR o GABA_AR). Los GABAR son canales iónicos heteropentaméricos, que contienen subunidades alfa, beta y gamma en una estequiometría 2:2:1 (Sieghart y Sperk, 2002). La interfaz entre una subunidad gamma2 y una subunidad α forma el receptor de benzodiazepinas, un modulador alostérico positivo de la apertura del canal que aumenta la función de GABAR. Además de los agonistas de las benzodiazepinas, existen fármacos (p. ej., beta-carbolina) que actúan como agonistas inversos en el sitio de las benzodiazepinas para disminuir la función de GABAR. La identidad molecular de la subunidad alfa en el sitio receptor de benzodiazepinas determina su perfil farmacológico. Los GABAR que contienen subunidades alfa1 median los efectos sedantes, anticonvulsivos y amnésicos de las benzodiazepinas preferentemente, mientras que los GABAR que contienen subunidades alfa2 y alfa3 median sus efectos ansiolíticos (Rudolph *et al.*, 1999; Mohler *et al.*, 2002). Los agonistas inversos parciales ofrecen la posible ventaja de un intervalo de concentración terapéutica más amplio y una menor probabilidad de producir efectos secundarios negativos, tales como ansiedad o descarga epileptiforme.

Moduladores alostéricos negativos de GABAR que contienen subunidades alfa5 o alfa5 GABA-NAM, se han desarrollado recientemente (Quirk *et al.*, 1996; Atack *et al.*, 2006; 2009). Mientras que los agonistas inversos de benzodiazepina no selectivos son ansiogénicos en seres humanos, los alfa5 GABA-NAM no lo son. El ARNm de las subunidades alfa5 es abundante en las células piramidales del hipocampo y la corteza (Allen Brain Atlas) y los GABAR que contienen α 5 están localizados en sitios sinápticos y extrasinápticos en las dendritas (Fritschy y Mohler, 1995; Wainwright *et al.*, 2000; Serwanski *et al.* 2006). Los GABAR que contienen α 5 median la inhibición tónica y reducen la excitabilidad de las células piramidales (Bonin *et al.*, 2006). Curiosamente, las subunidades α 5 se regulan positivamente en ratones después del estrés crónico (Matsumoto *et al.*, 2007). Debido a que la desinhibición promueve la inducción de potenciación a largo plazo (LTP), la presunta base celular de la memoria, los alfa5 GABA-NAM se están desarrollando clínicamente como potenciadores cognitivos (Ballard *et al.*, 2009). Se ha demostrado, por ejemplo, que los alfa5 GABA-NAM aumentan la LTP y potencian la adquisición de memoria en tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo (Collinson *et al.*, 2002). De hecho, un compuesto alfa5 GABA-NAM ya se encuentra en ensayos clínicos para el síndrome de Down. La capacidad de esta clase de compuestos para promover el impulso excitatorio en regiones del cerebro como el hipocampo indica su utilidad como antidepresivos de acción rápida, similar a la ketamina pero que carecen de los efectos secundarios perjudiciales.

En realizaciones de la divulgación, los agonistas inversos parciales del sitio de unión a benzodiazepinas de los receptores GABA_A que contienen subunidades alfa5 (L-665,708 y MRK-016) producen una restauración rápida y constante de una variedad de comportamientos que se alteran por el estrés crónico en ratas y ratones porque restauran la fuerza de las sinapsis excitatorias debilitadas patológicamente.

Se pueden utilizar estudios que cuestionen y traten de cambiar el paradigma actual para comprender la génesis y el tratamiento de la depresión. Concretamente, se puede proporcionar una prueba de estudio de viabilidad definitiva de una clase completamente innovadora de posibles medicamentos, con capacidad para una rápida implementación en la clínica. El resultado de estos estudios también pone a prueba la consideración de que la disfunción de las sinapsis excitatorias contribuye a la génesis de la depresión. Se pueden utilizar tanto los enfoques experimentales convencionales como inestimables modelos de ratones transgénicos existentes que son adecuados para demostrar la eficacia. También se pueden emplear una variedad de paradigmas de estrés crónico con viabilidad de cara, teórica y pronóstica con respecto a la depresión y al desarrollo de antidepresivos, así como una batería de ensayos conductuales, electrofisiológicos y bioquímicos. Por lo tanto, los estudios abarcan niveles de análisis desde el comportamiento hasta los circuitos, las sinapsis y las moléculas, según se promueve por la iniciativa Research Domain Criteria del NIMH, con el fin de acelerar la traducción de los hallazgos de la investigación preclínica en roedores a los ensayos clínicos en seres humanos.

La depresión es una afección puramente humana, pero se pueden inducir cambios conductuales en roedores en respuesta a las condiciones ambientales, como el estrés crónico, que promueven la depresión en seres humanos. Muchos de los comportamientos afectados por el estrés crónico, tal como la recompensa, son análogos a los comportamientos humanos que son sintomáticos de la depresión en seres humanos, tal como la anhedonia. Asimismo, la susceptibilidad a varios paradigmas de estrés crónico se asocia con genes que se sabe que tienen una alta correlación con la depresión (Hasler *et al.*, 2004). Es importante evaluar la validez al relacionar los efectos del estrés crónico en roedores con la depresión en seres humanos. Los fenotipos conductuales y electrofisiológicos de roedores sometidos a paradigmas de estrés crónico se asemejan a la depresión en seres humanos porque 1) incluyen cambios en el estado afectivo, facultades cognitivas y motivación; 2) son el resultado de un factor implicado en la depresión en seres humanos; y 3) responden a la administración crónica, pero no a corto plazo, de SSRi (Willner y Mitchell, 2002), al igual que los síntomas de los seres humanos deprimidos. Comprender cómo el estrés crónico afecta el cerebro en roedores revela conocimientos sobre la génesis y el tratamiento de la depresión en seres humanos.

Paradigmas de estrés crónico. Se pueden usar cuatro paradigmas de estrés crónico diferentes en ratas o ratones para determinar si los efectos de los compuestos son independientes de los paradigmas. Se puede emplear estrés crónico impredecible (CUS), que implica el suministro repetido de factores estresantes leves dos veces al día durante 3 semanas (Wilner *et al.*, 1987). Se puede usar el estrés por derrota social crónica (SDS, por sus siglas en inglés), una forma de estrés psicosocial en la que los animales pierden crónicamente nivel social frente a un animal más dominante (Malatynska y Knapp, 2005). En este paradigma, los individuos juveniles (> 4s de edad) se colocan en la jaula de alojamiento de un animal residente dominante durante 1 hora mientras están separados por una pantalla protectora perforada, permitiendo contacto olfativo, visual y auditivo. El protocolo de SDS se repite diariamente durante 3 semanas. En tercer lugar, se puede usar estrés crónico por restricción (CRS, por sus siglas en inglés), en el que los animales se mantienen en tubos de restricción ajustados durante 4 h todos los días durante 8-10 días (Lim *et al.*, 2012). Finalmente, se puede elevar directamente los niveles de la hormona del estrés mediante la administración de corticosterona (Gourley *et al.*, 2008). Todos estos paradigmas inducen cambios en el comportamiento de los animales que se revierten por administración crónica, pero no a corto plazo, de SSRi (Papp *et al.*, 1996; Grippo *et al.*, 2006; Bondi *et al.*, 2008), comparable al retraso de 3-8 semanas en los pacientes en respuesta a los SSRi.

Consecuencias del estrés en el comportamiento en roedores. ¿Qué comportamientos en roedores se parecen más a los síntomas de los seres humanos deprimidos y también pueden predecir mejor los tratamientos terapéuticos eficaces para la depresión? Los signos ideales de un estado de tipo depresivo 1) tendrán relevancia etológica, 2) serán fuertes y cuantificables de manera precisa y 3) responderán a la administración crónica, pero no a corto plazo de SSRi, como la depresión en seres humanos. Se considera que la prueba de natación forzada y la prueba de suspensión de la cola proporcionan una medida de desesperación conductual. Si bien estas pruebas son populares por su facilidad de uso y confiabilidad, carecen de cierta validez aparente porque los cambios en estas tareas pueden detectarse después de una sola administración de SSRi en animales de control (Detke *et al.*, 1997; Petit-Demoulier *et al.*, 2005). Otra medida del comportamiento que se ve afectada por el estrés crónico, pero que solo responde a SSRi crónicos, pero no a corto plazo, es un ensayo de estado hedónico llamado prueba de preferencia por sacarosa (SPT) (Rygula *et al.*, 2006). En la presente prueba, a los roedores se les presenta una tarea de elección de dos botellas con una botella que contiene agua normal y una botella que contiene una solución de sacarosa diluida. La alta preferencia natural de ratas y ratones por la solución de sacarosa se disminuye en gran medida por el estrés crónico y se restaura con tratamiento crónico, pero no a corto plazo, con SSRi (Pothion *et al.*, 2004). Se dice que la falta de preferencia por sacarosa revela anhedonia, o la incapacidad de experimentar recompensa, un síntoma central de la depresión en seres humanos. Los defectos en la recompensa social también son un síntoma destacado de la depresión en seres humanos. Un ensayo de la curiosidad social de los roedores, la prueba de interacción social (SIT) (Berton *et al.*, 2006), mide la cantidad de tiempo que los animales pasan interactuando con un nuevo animal diana y proporciona una medida del valor de recompensa de las interacciones sociales.

El uso de estos modelos permite revelar un rápido inicio de la acción, que distingue las realizaciones de la presente divulgación de la técnica anterior. Lo que se ha hecho anteriormente utilizando modelos animales es insuficiente para predecir una acción antidepresiva de acción rápida e inicio rápido de estos compuestos. Uso de otros modelos y métodos, tal como la prueba de natación forzada y la prueba de suspensión de la cola, no proporcionan validez

pronóstica de un inicio rápido del alivio terapéutico de los síntomas depresivos y el pensamiento suicida en animales (es decir, seres humanos).

El hipocampo en la depresión. La depresión probablemente esté causada por disfunción en muchas regiones del cerebro y tipos celulares, incluido el hipocampo. Los receptores de glucocorticoides se expresan en niveles elevados en las células piramidales, haciéndolas particularmente sensibles al estrés (Reul & de Kloet, 1985; Magarinos *et al.*, 1996). De hecho, el estrés crónico induce disfunción del hipocampo, incluyendo atrofia y pérdida de espinas dendríticas (McEwen, 1999), déficits en plasticidad sináptica (Aifare *et al.*, 2003), neurogénesis y sinaptogénesis disminuidas (Duman y Li, 2012) y circuitos aberrantes (Airan *et al.*, 2007). De manera destacable, los pacientes deprimidos tienen un volumen del hipocampo reducido y déficits en las tareas conductuales dependientes del hipocampo (MacQueen *et al.*, 2003; Campbell y MacQueen, 2004) tal como la navegación visoespacial (Hickie *et al.*, 2005; Gould *et al.*, 2007).

La salida del hipocampo impulsa la actividad en el NAc, un regulador clave de la motivación y el valor de la recompensa, y se sabe que influye en la motivación, quizás a través de su capacidad para promover la secreción de dopamina (Kelley y Mittleman, 1999; Boulenguez *et al.*, 1996; Floresco *et al.*, 2001; Tye *et al.*, 2013). Un diálogo entre el hipocampo y la neocorteza también es importante para mantener la función cognitiva normal (Gray, 1998; Lisman y Otmakhova, 2001; Morris *et al.*, 1982; Remondes y Schuman, 2004). La corteza entorrinal (EC, por sus siglas en inglés) proporciona las entradas principales al hipocampo y la proyección desde el área CA 1 a la EC es una salida principal. Las dendritas apicales de las neuronas piramidales CA 1 en el hipocampo reciben una entrada directa de la EC, la vía temporoamónica (TA), en sus dendritas apicales distales en estrato lacunoso molecular (SLM) (Remondes y Schuman, 2002; Steward y Scoville, 1976). La vía TA es importante para la consolidación de la memoria a largo plazo, así como tareas de reconocimiento espacial (Brunet *et al.*, 2002; Remondes y Schuman, 2004). El estrés crónico produce una serie de cambios en las sinapsis excitatorias TA-CA 1 y déficits en la consolidación de la memoria (Cai *et al.*, 2013; Kallarakal *et al.*, 2013). Se puede usar esta sinapsis como un arquetipo conveniente para los cambios que se sabe que se producen en múltiples sitios del cerebro durante la depresión.

Determinación de la constancia y generalidad de las acciones antidepresivas de los alfa5 GABA-NAM sobre la conducta.

Fundamento: Una sola inyección de uno de los dos alfa5 GABA-NAM disponibles comercialmente, L-665,708 (1 mg/kg, intraperitonealmente, IP) (Quirk *et al.*, 1996) revierte la pérdida de preferencia por sacarosa (FIG. 3A y 3B) y la disminución de la interacción social (FIG. 3C y 3D) inducida por dos formas de estrés crónico en 24 horas: estrés crónico impredecible y estrés crónico de restricción. Para que esta clase de compuestos tenga uso como AD eficaces en seres humanos, en realizaciones específicas, sus efectos restauradores deberían 1) mantenerse en una amplia gama de comportamientos que se ven afectados por estrés crónico, 2) ser independientes del paradigma mediante el cual se aplica el estrés y 3) ser constantes.

En realizaciones específicas, una sola inyección de L-665, 708 u otro alfa5 GABA-NAM disponible comercialmente, MRK-016 (Ataque *et al.*, 2009), a una dosis máxima eficaz rápidamente (en unos días) revierte los cambios inducidos por estrés en una amplia gama de comportamientos independientemente de cómo se aplique el estrés, y estos efectos continúan durante varios días después de la inyección (FIG. 9).

Definición de animales de control y susceptibles. Como ejemplo, en este y al menos en algunos otros estudios descritos en el presente documento, se prueban ratas macho adultas durante 2 semanas utilizando las pruebas de preferencia por sacarosa e interacción social (SPT, SIT) para establecer los valores iniciales. Solo los animales que cumplen de manera repetida los criterios preestablecidos de ratas de control basándose en resultados anteriores (preferencia por sacarosa > 75 %, relación de interacción social > 130 %) se consideran controles aceptables. Aquellos que no lo hacen se excluyen de estudios posteriores para que una población inicial sea lo más homogénea posible. Después, las ratas se someten a uno de los paradigmas de estrés crónico, seguido de SPT y SIT. En ese momento, sólo aquellos animales con preferencia por sacarosa < 65 % y relaciones de interacción social < 115 % se considera que han sido susceptibles al estrés crónico y por lo tanto son útiles para estudiar los efectos de los compuestos de prueba y otras manipulaciones.

Experimento A. ¿Cuál es la dependencia de la dosis de alfa5 GABA-NAM? ¿Cuánto duran sus efectos? Se puede utilizar el paradigma del estrés crónico por restricción (CRS) para determinar la dependencia de la dosis. Se administra una sola inyección de L-665,708 o MRK-016 a ratas susceptibles a dosis de 0,3, 1, 3, 10 o 30 mg/kg IP, seguido de SPT y SIT < 24 horas después. Las curvas de dosis-respuesta se preparan representando gráficamente 1) la preferencia por sacarosa media y la relación de interacción social en función de la dosis de alfa5 GABA-NAM y 2) el porcentaje de animales que respondieron al fármaco con un aumento en la preferencia por sacarosa a -75 % y un aumento en la relación de interacción social a -130 % en función de la dosis. A continuación, los animales se vuelven a probar con SPT y SIT a los 5, 10 y 15 días después de la inyección para determinar la constancia de los efectos. Un conjunto de grupo de control de animales puede someterse a CRS, recibir una inyección de vehículo y probarse con SPT y SIT 1, 5, 10 y 15 días después de la inyección. Un segundo conjunto de animales de control no se somete a CRS, pero recibe una inyección de la dosis máxima eficaz de L-665,708 o MRK-016. En realizaciones específicas, los efectos de los compuestos son dependientes de la dosis en ambos comportamientos según ambas medidas, y los efectos continúan durante 5-15 días después de la inyección. En realizaciones específicas, la inyección de vehículo no restaura las respuestas de control en ninguno de los comportamientos y los compuestos no afectan

significativamente a ninguno de los comportamientos en animales sin estrés. Se puede utilizar la dosis máxima eficaz del compuesto más eficaz, como se determina en estos estudios, en otros estudios descritos en otra parte del presente documento.

5 Experimento B. ¿Cuán generalizados son los efectos conductuales restauradores de los alfa5 GABA-NAM? Se pueden extender los datos sobre los efectos de alfa5 GABA-NAM en el SPT y SIT a una gama más amplia de comportamientos afectados por estrés: alimentación suprimida por novedad, preferencia de lugar sexual, jerarquía social y natación forzada.

10 B1. La alimentación suprimida por novedad (NSF) es una medida de estrés crónico sensible a la fluoxetina ampliamente utilizada (Cal *et al.*, 2013). En la primera cohorte de animales, se mide la latencia inicial en la prueba de NSF, como se realizó anteriormente. A continuación, las ratas se someten a CRS y se seleccionan los animales susceptibles. El CRS continúa durante 5 días más, después, la mitad de los animales se seleccionan al azar para recibir una inyección de vehículo y la otra mitad recibe una sola inyección de L-665,708. 24 horas después vuelven a someterse a la prueba de NSF.

15 B2. La preferencia de lugar condicionada es un ensayo bien establecido de valoración de la recompensa y estado afectivo. Por lo tanto, una segunda cohorte de animales se somete al mismo procedimiento, pero se prueba con una prueba de preferencia de lugar sexual. Las ratas macho de control están condicionadas para asociar hembras sexualmente receptivas con señales olfativas y visuales específicas, después se le dio una prueba de sondeo de preferencia ambiental (Camacho *et al.*, 2004). Después se someten a CRS y se seleccionan los animales susceptibles. La mitad de las ratas reciben una inyección de vehículo y a la otra mitad se les administra una inyección de L-665,708. 24 horas después se repite la prueba de sondeo de preferencia de lugar. Para ambas cohortes, se realizan, después, comparaciones bidireccionales entre puntuaciones de comportamiento (antes frente a después de la inyección x fármaco frente al vehículo). Las latencias de monta e intromisión, que se sabe que son sensibles al estrés crónico (Gronli *et al.*, 2005), también se miden como indicadores de motivación sexual (Hull, 2002). En realizaciones específicas, únicamente las ratas que reciben L-665,708 muestran latencias de NSF y preferencias de lugar que son diferentes de sus propias puntuaciones antes de la inyección y diferentes de las ratas inyectadas con vehículo. Las ratas de control se someten a pruebas de NSF o preferencia de lugar sexual. Una semana después, reciben una inyección de L-665,708 y se vuelven a probar 24 horas después. En realizaciones específicas, las inyecciones no tienen ningún efecto sobre ninguno de los comportamientos en ratas de control sin estrés, como se observó con SPT y SIT.

20 B3. Los roedores muestran una jerarquía social innata prominente que se sabe que es sensible al estrés crónico y se restaura por fluoxetina crónica (Lehmann *et al.*, 2013). El marcaje de olor con orina, una forma de comunicación social en roedores, se correlaciona con el estado de dominancia, haciendo las ratas socialmente dominantes más marcas y más grandes que las que están socialmente subordinadas. Se puede utilizar otra prueba consistente de dominancia social, la prueba del tubo (Wang *et al.*, 2011). Las ratas de control se alojan en parejas durante una semana, después se someten a una serie de pruebas de tubo y una prueba de marcaje con orina para identificar la rata dominante y subordinada en cada par. Los animales dominantes se someten después a 10 días de CRS, se prueban para determinar la preferencia por sacarosa para identificar individuos susceptibles, después se someten a preferencia por sacarosa, marcaje de orina y pruebas de tubo. En realizaciones específicas, los animales dominantes pierden su dominio como consecuencia del estrés. Si es así, se puede administrar una inyección de L-665,708 o vehículo. En realizaciones específicas, el dominio se restaura mediante alfa5 GABA-NAM, pero no por inyección de vehículo, en paralelo a la preferencia por sacarosa. Los controles se tratan como anteriormente, pero no se someten a CRS. 24 horas después, se vuelven a probar en la preferencia por sacarosa, marcaje de orina y pruebas de tubo.

25 B4. Una tercera cohorte de ratas de control recibe una inyección de L-665,708 o vehículo y después se someten a pruebas de natación forzada 1 hora más tarde. Se realizan comparaciones estadísticas del tiempo que permanecen inmóviles entre los animales inyectados con vehículo y con fármaco. La ketamina a corto plazo reduce el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada (Maeng *et al.*, 2008), al igual que la administración a corto plazo de fluoxetina, lo que indica que los compuestos alfa5 GABA-NAM también disminuyen la inmovilidad en esta prueba.

30 Experimento C. ¿Induce alfa5 GABA-NAM efectos conductuales adversos? Se prueban dos comportamientos complejos que podrían verse afectados negativamente por los agonistas inversos de benzodiazepinas: ansiedad y sueño.

35 C1. Una cohorte de ratas de control se someten a una prueba de campo abierto basal. Una semana después, la mitad de los animales reciben una inyección de L-665,708 o vehículo, seguido 24 horas después por una segunda prueba de campo abierto en una nueva arena. En una realización específica, un análisis de varianza de diseño mixto no revela ninguna diferencia entre la inyección de alfa5 GABA-NAM o de vehículo en la cantidad de tiempo transcurrido en la zona central, un indicador de ansiedad, o en cruces de línea totales, un indicador de locomoción, en comparación con su propio valor inicial o entre grupos.

40 C2. Se prueba una segunda cohorte para detectar ritmos de actividad diaria alterados, como indicador inicial de sueño alterado. Las ratas se alojan individualmente en una jaula con múltiples rayos infrarrojos cruzados (SmartCage, Afasci,

Inc). La frecuencia de las interrupciones del haz se registra continuamente durante un período de 48 horas antes de una inyección de L-665,708 o de vehículo. A continuación, se registra la actividad durante las siguientes 48 horas. El número total de interrupciones del haz y la duración de los períodos de inactividad se comparan en animales individuales antes y después de la inyección, y entre los grupos de tratamiento y de vehículo en otro ANOVA mixto.

5 Experimento D. ¿Pueden los alfa5 GABA-NAM revertir los efectos de múltiples paradigmas de estrés? Se pueden completar estudios iniciales con CRS y CUS y extenderlos a ratas sometidas a estrés por derrota social (SDS) (Papciak *et al.*, 2013) y la administración directa de corticosterona (Gourley *et al.*, 2008).

10 D1. Una cohorte de controles experimenta la derrota social diariamente durante 1 hora cada día durante 3 semanas.

D2. Otra cohorte de controles recibe hemisuccinato de corticosterona (50 µg/ml) mediante el agua potable en la jaula de alojamiento durante 4 semanas, para producir concentraciones sanguíneas elevadas que se correlacionan con el ciclo diurno de los animales. Estudios anteriores han demostrado que los niveles máximos son comparables a los obtenidos en ratas durante procedimientos de estrés crónico (Gourley *et al.*, 2008). Las ratas susceptibles de cada grupo se someten después a otra semana de SDS o administración de corticosterona. La mitad de las ratas de cada grupo recibe una inyección de L-665,708 y la mitad de vehículo. 24 horas después, se someten de nuevo a SPT y SIT. Se realizan comparaciones estadísticas dentro y entre sujetos de la preferencia por sacarosa y las relaciones de interacción social para los individuos antes y después de la inyección de vehículo o fármaco en un ANOVA de diseño mixto. En realizaciones específicas, la inyección del compuesto de prueba, pero no del vehículo, produce un cambio significativo en la preferencia por sacarosa de los animales y en las relaciones de interacción social tanto en ratas con SDS como en las tratadas con corticosterona.

En los casos en donde se necesite detectar pequeñas diferencias en los comportamientos en respuesta al estrés o a la administración de alfa5 GABA-NAM, los estudios pueden diseñarse con comportamientos iniciales normalizados y evidencia de susceptibilidad a fin de reducir la variabilidad debida a eventos desconocidos durante la reproducción y el parto de los animales, individuos resilientes, *etc.* Los estudios también pueden diseñarse para permitir el uso de medidas repetidas y comparaciones pareadas siempre que sea posible, aumentando así la capacidad de detectar pequeños efectos. Los experimentos iniciales sobre el efecto de CRS y tratamiento con alfa5 GABA-NAM dieron tamaños de efectos fuertes para SPT y SIT ($f = 0,73$ y $f = 0,43$, respectivamente). Utilizando el tamaño del efecto de SIT más pequeño, y $\alpha = 0,05$, se necesitan 8 animales/grupo para tener un 95 % de probabilidad de observar diferencias significativas en futuras SPT en un formato ANOVA de diseño mixto (calculado con el software G*Power e IBM SPSS). Estos tamaños de grupo son consistentes con la experiencia y los resultados publicados previos para experimentos similares (es decir, Lim *et al.*, 2012). No se han demostrado los efectos del estrés sobre la dominancia social en ratas, pero se ve afectado negativamente en ratones y se restaura por fluoxetina (Lehmann *et al.*, 2013). Si no se logra la dominancia con CRS en ratas, después se realizan los estudios en ratones C57BL6/J, como en trabajos publicados anteriormente.

Una vez finalizados los estudios anteriormente mencionados, se establece si las acciones restauradoras similares a los antidepresivos alfa5 GABA-NAM sobre conductas sensibles al estrés son altamente generalizables a toda una gama de fenotipos conductuales motivacionales (alimentación, social, sexual) y si son independientes de los medios en los que se aplicó el estrés (directo frente a físico frente a social). En realizaciones específicas, un compuesto antidepresivo útil es ampliamente eficaz, independientemente de la causa próxima del comportamiento alterado y tiene pocos efectos secundarios.

45 Determinación del mecanismo de acción de alfa5 GABA-NAM a nivel de circuitos sinápticos.

Fundamento: La ketamina induce un rápido aumento de las oscilaciones neuronales en los circuitos del hipocampo, corteza entorrinal, NAc y PFC en roedores (p. ej., Kittleberger *et al.*, 2012; Middleton *et al.*, 2008; Hunt *et al.*, 2011) y en seres humanos (Driesen *et al.*, 2013). Está ampliamente aceptado que este aumento en la actividad del circuito subyace a la inducción de acciones similares a los antidepresivos de la ketamina porque la actividad oscilatoria en estas frecuencias promueve no solo la LTP (p. ej., Huerta y Lisman, 1993) sino también otras formas de fortalecimiento dependiente de la actividad de las sinapsis excitatorias que son fundamentales para la reversión del fenotipo de estrés. Se puede examinar si la capacidad de alfa5 GABA-NAM para revertir el fenotipo de estrés es el resultado de desencadenar una actividad oscilatoria similar.

En realizaciones específicas, los alfa5 GABA-NAM se unen a los receptores de benzodiazepinas para inducir la activación rápida de los circuitos neuronales en los circuitos de recompensa y restaurar los comportamientos alterados por estrés debido a su capacidad para activar la plasticidad sináptica dependiente de la actividad.

60 Experimento A. ¿La administración de alfa5 GABA-NAM produce activación de circuitos neuronales *in vivo* como resultado de la unión a los receptores de benzodiazepinas? A las ratas se les colocan electrodos de manera esterotáctica en el estrato piramidal del área CA1 (la salida del hipocampo), capa II de la corteza entorrinal (fuente de la vía temporoamónica), o la cubierta del NAc. Después de la recuperación, se entrenan para permanecer quietos en un tubo de plástico sin anestesia con la cabeza asegurada.

A1. Se realiza un período de 60 minutos de registro continuo de la actividad espontánea del potencial de campo con iluminación tenue. A continuación, se inyecta a las ratas con bien L-665, 708 o con vehículo, y se vuelven a colocar en el tubo durante 60-90 min adicionales de registro. Las transformadas discretas de Fourier rápidas se realizan en segmentos de registro de 60 segundos de duración para la preparación de espectrogramas. La potencia de oscilación (área bajo la curva) está integrada para diferentes anchos de banda de frecuencia para gráficos de densidad espectral de potencia ($\alpha = 3-7$ Hz; $\beta = 8-12$ Hz; $\gamma = 13-29$ Hz; $\delta = 30-80$ Hz) (Buhl *et al.*, 1998; Raver *et al.*, 2013). Al igual que con la ketamina (p. Ej., Kittleberger *et al.*, 2012; Lazarewicz *et al.*, 2010; Hinman *et al.*, 2013), en realizaciones específicas, los aumentos de potencia se observan mediante la comparación por pares de espectros antes y después de la inyección del fármaco. Los estudios iniciales son consistentes con esta consideración (FIG. 2).

A2. A continuación, se puede probar si los alfa5 GABA-NAM ejercen su influencia sobre la actividad mediante la unión al sitio de las benzodiacepinas en el GABAR. Los experimentos anteriores se repiten en una segunda cohorte de animales con la inyección conjunta del antagonista farmacológico del receptor de benzodiacepinas, flumazenil (20 mg/kg IP) (Tietz *et al.*, 1999), 30 min antes de la inyección de L-665,708. En realizaciones específicas, L-665,708 no produce ningún cambio significativo en la actividad oscilatoria en estas condiciones porque no puede unirse al GABAR.

Experimento B. ¿Las acciones de alfa5 GABA-NAM dependen de la señalización de la serotonina? Una forma en que la actividad oscilatoria inducida por alfa5 GABA-NAM podría restaurar el comportamiento alterado por estrés es promoviendo la liberación de serotonina de las neuronas del rafe.

B1. Se pueden utilizar ratones Pet1cre-Lmx1b^{flox} (Zhao *et al.*, 2006), en los que los adultos carecen de neuronas serotoninérgicas en el SNC, para caracterizar esto. Sorprendentemente, estos ratones aún no se han caracterizado en muchos comportamientos relacionados con la depresión, pero es posible que estos comportamientos sean anormales. Primero se pueden caracterizar estos ratones en el SPT y SIT. Si sus respuestas conductuales están dentro del mismo intervalo que los ratones compañeros de camada de tipo silvestre, entonces se pueden someter a 10 días de CRS. Una semana después, reciben una sola inyección de L-665,708 o vehículo, seguida 24 horas después, por una segunda ronda de SPT y SIT. En realizaciones específicas, la acción restauradora de los alfa5 GABA-NAM sobre estos comportamientos es independiente de la liberación de serotonina y de la activación del receptor de serotonina. En realizaciones específicas, L-665,708 desencadena un aumento en ambas medidas para que sean diferentes en comparación con los niveles antes de la inyección de fármaco en las comparaciones de medidas repetidas, mientras que en determinadas realizaciones los animales tratados con vehículo no tienen diferentes medidas en un diseño ANOVA mixto. Si estos ratones no tienen preferencias por sacarosa > 75 % y relaciones de interacción social > 130 %, entonces no se prosigue con los experimentos.

B2. Se pueden seleccionar ratas de control y susceptibles a CRS. A la mitad de las ratas susceptibles se les inyecta dos veces la toxina PCPA (300 mg/kg, IP, con 24 horas de diferencia) (Dewar *et al.*, 1992) para agotar la serotonina a corto plazo. La otra mitad se inyecta con solución salina. 24 horas después de la segunda inyección de PCPA, a ambos grupos de ratas se les administra una sola inyección de L-665,708. 24 horas después se someten a SPT y SIT. Los animales se sacrifican y las secciones se tiñen con un anticuerpo contra la serotonina para verificar el agotamiento de serotonina inducido por PCPA, como se ha realizado anteriormente (Cai *et al.*, 2013). Si los alfa5 GABA-NAM actúan independientemente de la serotonina, en realizaciones específicas, tanto las ratas inyectadas con PCPA como con solución salina muestran normalización de comportamientos sensibles al estrés en respuesta al tratamiento con alfa5 GABA-NAM.

Experimento C. ¿Las acciones de los alfa5 GABA-NAM dependen de la plasticidad dependiente de NMDAR o de la fosforilación de GluA1? Las acciones de la ketamina probablemente dependen del bloqueo de los NMDAR interneuronales, con el consiguiente aumento de la actividad que impulsa una fuerte activación de los NMDAR de las células piramidales. Ahora se puede probar si alfa5 GABA-NAM converge en este último mecanismo efector (FIG. 1).

C1. Se pueden utilizar ratones CxNRIKO (Iwasato *et al.*, 2000), en los que los NMDAR se eliminan genéticamente en las células piramidales del hipocampo y de la corteza. Estos ratones tampoco están caracterizados en muchos comportamientos relacionados con la depresión y es posible que estos comportamientos sean anormales (véase sin embargo: Rompala *et al.*, 2013). Primero se pueden caracterizar estos ratones en SPT y SIT. Si sus respuestas de comportamiento están dentro del mismo intervalo que los controles de compañeros de camada de tipo silvestre, después se pueden someter a 10 días de CRS y repetir SPT y SIT. Después de 5 días adicionales de CRS, reciben una sola inyección de L-665,708 o vehículo, seguida 24 horas después, por una tercera ronda de SPT y SIT. En realizaciones específicas, la acción restauradora de los alfa5 GABA-NAM sobre estos comportamientos depende de la activación del receptor NMDAR de células piramidales y, por lo tanto, en ausencia de estos NMDAR, los alfa5 GABA-NAM no pueden restaurar los cambios conductuales inducidos por estrés. Las comparaciones por parejas en ratas inyectadas con alfa5 GABA-NAM o con vehículo no revelan diferencias significativas en la preferencia por sacarosa o en la interacción social en comparación con antes de la inyección, en realizaciones específicas. Si estos ratones no muestran respuestas en el intervalo normal de respuestas en SPT y SIT en condiciones de control, se puede administrar, después, una sola inyección de L-665, 708 o de vehículo a la dosis máxima, seguida de una segunda ronda de SPT y SIT 24 horas después. En realizaciones específicas, su comportamiento no es significativamente diferente en ninguna prueba después de la inyección, Si alfa5 GABA-NAM es eficaz en los ratones CxNRIKO; en los que no se eliminan los NMDAR en el NAc, después, en realizaciones específicas, la activación de

entradas de la corteza y el hipocampo por alfa5 GABA-NAM son cruciales en sus acciones similares a AD.

C2. A continuación, se pueden usar ratones S831A en los que la serina 831 de la subunidad GluA1 del AMPAR se ha mutado a alanina, haciéndolos incapaces de ser fosforilados por CaM cinasa. Estudios previos han demostrado que la LTP dependiente de NMDAR es anormal en estos ratones (Lee *et al.*, 2010). Estos ratones tienen un fenotipo conductual que se asemeja al producido por el estrés crónico, aunque todavía no se ha probado la interacción social. Por lo tanto, se pueden someter a SPT y SIT de referencia a ratones no tratados previamente. Debido a que en realizaciones particulares sus respuestas no están en el intervalo normal en estas pruebas, 5 días después se puede administrar una sola inyección de L-665,708 o vehículo, seguida de una segunda ronda de SPT y SIT 24 horas después. En realizaciones específicas, su comportamiento no es significativamente diferente en ninguna de las pruebas. Los cortes de cerebro del hipocampo se pueden recoger una vez finalizados los análisis electrofisiológicos y bioquímicos, como se describe a continuación, para probar las correlaciones entre el comportamiento y la función sináptica.

En realizaciones específicas, las acciones restauradoras de tipo antidepresivo de alfa5 GABA-NAM sobre comportamientos sensibles al estrés 1) están inducidas por un aumento dependiente del receptor de benzodiazepinas en la actividad del circuito oscilatorio y 2) necesitan el fortalecimiento dependiente de la actividad dependiente de NMDAR de las sinapsis excitatorias para su expresión.

Determinación de los mecanismos moleculares y sinápticos de la acción de alfa5 GABA-NAM.

Fundamento: Los inventores y otros han observado un debilitamiento de sinapsis excitatorias específicas después del estrés crónico y, en realizaciones específicas, esto contribuye a la génesis de la depresión. La administración crónica de fluoxetina revierte estos déficits y, en realizaciones específicas, estos efectos subyacen a la restauración del comportamiento normal mediante AD eficaces. Se describen cambios cualitativos y cuantitativos en la respuesta de las sinapsis TACA 1 a la activación de 5-HT18R después de estrés crónico, que se revierten con el tratamiento con AD (Cai *et al.*, 2013). En este caso se pueden probar los efectos de los alfa5 GABA-NAM en estos fenotipos inducidos por estrés. La sinapsis TA-CA1 puede usarse como un arquetipo para los cambios que pueden producirse en múltiples regiones del cerebro. También se pueden comenzar a identificar las vías de señalización a través de las cuales están mediados estos cambios.

La rápida reversión de los cambios en el comportamiento inducidos por estrés por alfa5 GABA-NAM, como se describe anteriormente, se acompaña de un 1) fortalecimiento de la transmisión sináptica excitatoria mediada por AMPAR, 2) normalización de la potenciación sináptica mediada por 5-HT1BR y 3) aumento en los niveles de expresión de GluA 1 rápidos.

Experimento A. ¿Restauran los alfa5 GABA-NAM las respuestas sinápticas mediadas por AMPAR? A las ratas de control y susceptibles a CRS se les administra una única inyección de L-665, 708 o vehículo, seguida 24 horas después, por una segunda ronda de SPT y SIT. A continuación, se preparan cortes de cerebro de hipocampo para el registro electrofisiológico. Debido a que las sinapsis TA-CA1 están electrotónicamente alejadas de los somas de células CA 1, se puede utilizar el registro extracelular de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo local (fEPSP, por sus siglas en inglés) en SLM. Las respuestas mediadas por AMPAR se comparan utilizando dos métodos independientes (amplitud de descargas de fibra y respuestas mediadas por NMDAR) para controlar la intensidad de la estimulación y la salud de los cortes, como se ha realizado anteriormente (Kallarackal *et al.*, 2013). En primer lugar, se pueden normalizar las respuestas de AMPAR a la amplitud de la descarga de fibras en un intervalo de intensidades de estimulación. También se pueden normalizar las respuestas comparando las pendientes de los componentes mediados por AMPAR y NMDAR a una intensidad de estimulación modesta que produce descargas de fibra de -0,2 mV antes y después de la aplicación de DNQX. Las respuestas colaterales de Schaffer se miden como control porque no se ven afectadas por el estrés crónico mediante esta medida (Kallarackal *et al.*, 2013). En realizaciones específicas, La excitación mediada por AMPAR se reduce en cortes de ratas con CRS inyectadas con vehículo en comparación con los controles inyectados con vehículo sin estrés. La inyección de alfa5 GABA-NAM restaura los niveles de control de excitación en cortes de ratas con CRS, pero no tiene ningún efecto en las ratas de control. Esto es lo que se ha observado en estudios iniciales (FIG. 10A, 10C).

Experimento B. ¿Restauran los alfa5 GABA-NAM la potenciación mediada por 5-HT1BR? Se puede considerar si los alfa5 GABA-NAM revierten otra alteración fenotípica de las sinapsis TA-CA 1 estresadas: amplificación y constancia de respuestas al agonista de 5-HT1BR anpirtolina (FIG. 3A) (Cai *et al.*, 2013). Se preparan cortes a partir de los cuatro grupos descritos en el Experimento A. Se aplica en baño anpirtolina (50 µM) durante 60 min, seguido de un período de lavado de 90 minutos. En realizaciones específicas, la potenciación con anpirtolina de las fEPSP de TA-CA1 es de mayor magnitud y es constante en cortes de animales con CRS inyectados con vehículo en comparación con los controles inyectados con vehículo sin estrés y esa inyección de alfa5 GABA-NAM restablece los niveles de control de potenciación reversible en cortes de ratas con CRS, pero no tiene ningún efecto en las ratas de control (véase la FIG. 3B).

Experimento C. ¿El alfa5 GABA-NAM restaura la fosforilación y/o expresión de GluA1? Las punciones de tejido se obtienen de la región SLM (donde están las sinapsis TA-CA1 sensibles al estrés) en los cortes preparados para el

Experimento A. Las punciones de control se toman de estrato radiado (donde están las sinapsis colaterales de Schaffer insensibles al estrés). La transferencia Western se usa para comparar la expresión de la fosforilación de GluA1 y S831, GluA2, PSD-95 y NR1, como se ha realizado anteriormente (Cai *et al.*, 2013; Kallarackal *et al.*, 2013). En realizaciones específicas, la expresión de GluA1 y PSD-95, pero no la de GluA2 o NR1, disminuye en el SLM en animales con CRS
 5 inyectados con vehículo en comparación con los controles inyectados con vehículo sin estrés y la inyección de alfa5 GABA-NAM aumentan la fosforilación de GluA1 S831 y restauran los niveles de control de expresión en ratas con CRS, pero no tiene ningún efecto en las ratas de control (véase la FIG. 3).

Experimento D. ¿Qué vía de señalización activa alfa5 GABA-NAM para mediar sus acciones beneficiosas?

10 D1. Duman y colegas (Li *et al.*, 2011) mostraron que la ketamina aumenta la expresión de varios genes asociados con la función sináptica a través de la activación rápida de la vía de señalización de mTOR. Se puede utilizar el mismo enfoque para probar el papel de esta vía en las acciones de alfa5 GABA-NAM. Las cánulas se colocan en los ventrículos cerebrales. Una semana después, se identifican ratas susceptibles a CRS. A continuación, las ratas se
 15 dividen en tres grupos. El grupo uno recibe rapamicina (0,2 nmol, ICV) 30 min antes de una inyección de L-665,708, el grupo dos recibe solución salina ICV 30 minutos antes de una inyección de L-665,708, y el grupo tres recibe rapamicina ICV antes de una inyección IP de vehículo. 24 horas después, se vuelven a probar en SPT y SIT. Si se necesita la señalización de mTOR para los efectos de los alfa5 GABA-NAM, después, en realizaciones específicas, las comparaciones por pares muestran que las ratas con alfa5 GABA-NAM + solución salina tienen una mayor
 20 preferencia por sacarosa e interacciones sociales en comparación con antes de la inyección, mientras que las ratas con alfa5 GABA-NAM + rapamicina y vehículo + rapamicina no los tienen. Después, las ratas se sacrifican para análisis electrofisiológicos y bioquímicos, como anteriormente. En realizaciones específicas, los cambios sinápticos y bioquímicos inducidos por alfa5 GABA-NAM restauradores observados en los experimentos A-C también se bloquean por rapamicina. También se puede usar la transferencia Western para buscar aumentos en fosfo-mTOR y BDNF
 25 después de la inyección de alfa5 GABA-NAM en el NAc, en el área CA1, en la EC y en la PFC.

D2. Kavalali y Monteggia (2012) han avanzado un modelo de acción de la ketamina independiente de mTOR en el que la inhibición de los NMDAR desfosforila el factor de elongación eucariota eEF2, permitiendo una rápida eliminación de la supresión y la traducción de ARNm dendríticos, incluyendo BDNF. Se puede utilizar el mismo enfoque para probar
 30 este mecanismo de acción de alfa5 GABA-NAM. Se administra a las ratas de control y susceptibles a CRS una inyección de L-665, 708. Una hora más tarde, las ratas se sacrifican y se recogen los tejidos. Las punciones de tejido se toman del NAc, área CA 1 (separando capas dendríticas y somáticas), la EC y la PFC y se someten a transferencia Western para la cuantificación de BDNF y expresión de eEF2 fosforilado y total, como en Autry *et al.* (2011). Si la desfosforilación de eEF2 contribuye a las acciones de alfa5 GABA-NAM, después, en realizaciones específicas, el
 35 eEF2 fosforilado disminuye y el BDNF aumenta en el tejido de ratas inyectadas con alfa5 GABA-NAM, en comparación con el tejido de ratas inyectadas con vehículo. En las muestras de hipocampo, los cambios en fosfoeEF2 y BDNF son mayores en tejido dendrítico que en tejido somático.

D3. Nestler y sus colegas han demostrado que la inducción del factor de transcripción Δ FosB en neuronas espinosas medianas que expresan D1 en el NAc en respuesta al estrés crónico es un mediador importante de la resiliencia y
 40 puede desempeñar un papel en las acciones antidepresivas de la fluoxetina al cambiar la expresión génica y la fuerza sináptica (Perrotti *et al.*, 2004; Lobo *et al.*, 2013; Grueter *et al.*, 2013). Se considera si la inyección de alfa5 GABA-NAM también afecta la expresión de deltaFosB. Las ratas de control y susceptibles a CRS reciben una inyección de L-665, 708. Una hora más tarde, las ratas se sacrifican y se recogen los tejidos. Las punciones de tejido se toman del
 45 NAc, en el área CA1, EC y PFC y se sometieron a transferencia Western para la cuantificación de los niveles de deltaFosB. Se preparan secciones a partir de estas mismas regiones y se tiñen para determinar Δ FosB con el fin de contar núcleos inmunorreactivos con técnicas estereológicas (Vialou *et al.*, 2010). Las secciones a través del cuerpo estriado ventral se tiñen conjuntamente con un anticuerpo contra el D1R, ya que la expresión de Δ FosB en estas células puede ser particularmente importante para las acciones de los SSRi (Lobo *et al.*, 2013). Similar a la fluoxetina,
 50 en formas de realización específicas en animales estresados y sin estrés, alfa5 GABA-NAM afecta la expresión de Δ FosB en la NAc y en otras regiones del cerebro, coherente con los estudios iniciales (FIG. 5).

Con respecto a la sensibilidad de los ensayos, el análisis de potencia basado en datos publicados anteriormente sobre los efectos de CUS en las relaciones AMPAR: NMDAR (Kallarackal *et al.*, 2013) sugiere que la detección de un tamaño
 55 del efecto con $p = 0,6$ necesitaría un total de $n = 21$ para tener una potencia de 0,95. Estos estudios están diseñados para establecer una correlación entre la restauración de los fenotipos conductuales y sinápticos inducidos por estrés. Dicha etapa inicial puede conducir a más estudios específicos de sinapsis y comportamiento, y después se pueden caracterizar otras sinapsis electrofisiológica y bioquímicamente, particularmente en el NAc. Los resultados de los estudios sobre las vías de señalización son valiosos para diseñar intervenciones experimentales eficaces, tales como
 60 atenuación génica y sobreexpresión dirigidas de deltaFosB (Grueter *et al.*, 2013), para establecer causalidad.

Por lo tanto, Se determina si la rápida reversión del fenotipo conductual inducido por estrés por alfa5 GABA-NAM está acompañada de cambios rápidos en el fenotipo sináptico inducido por estrés. También se pueden identificar las vías de señalización a través de las cuales están mediados estos cambios.

Se determina que los agonistas inversos parciales del sitio de las benzodiazepinas de los GABAR que contienen

subunidades $\alpha 5$ (por ejemplo) tienen eficacia antidepressiva. En una realización, los cambios sinápticos inducidos por estrés provocan cambios conductuales inducidos por estrés. En otras realizaciones, hay un mapeo de sinapsis específicas afectadas por estrés y la consecuencia conductual correspondiente de esa disfunción, tal como la correlación entre la fuerza sináptica TA-CA1 y la consolidación de la memoria (Kallarackal *et al.*, 2013).

En realizaciones específicas, se prueba si la potenciación inducida por 5-HT1BR y la plasticidad sináptica dependiente de la actividad comparten mecanismos de señalización comunes en las sinapsis TA-CA1. Los 5-HT1BR potencian las sinapsis TA-CA1 mediante un fortalecimiento de las respuestas postsinápticas de AMPAR mediadas por la fosforilación de los AMPAR por CaMK (Cal. *et al.*, 2013). Otra vía de señalización paralela, que implica ras y activación de ERK, también está activada. La inhibición de ERK bloquea la potenciación mediada por 5-HT1BR al evitar que CaMK pueda fosforilar los GluA1R.

Se puede determinar cómo se potencia la potenciación de las sinapsis TA-CA 1 por 5-HT1BR después de CUS. La magnitud de la potenciación inducida por 5-HT1BR en las sinapsis TA-CA1 es mayor después de CUS y, en realizaciones específicas, esto se debió a una baja fuerza inicial de las sinapsis excitatorias (Cal. *et al.*, 2013). Esto se confirmó con electrofisiología y bioquímica (Kallarackal *et al.*, 2013). La potenciación mediada por 5HT1BR también es constante en cortes de animales con CUS, a diferencia de los controles, y esta está mediada por una fosforilación constante de S831 de GluA1R. En realizaciones específicas, la fosforilación de S845 en las subunidades GluR1 es crítica y se pueden comparar los cambios en la fosforilación de S845 en el tejido de control y con CUS. La administración de corticosterona es necesaria y suficiente para imitar ambas consecuencias de CUS.

Se puede determinar por qué la potenciación de las sinapsis TA-CA1 por 5-HT1BRs está ausente después del tratamiento crónico con SSRI. El tratamiento con SSRI a largo plazo elimina la potenciación inducida por 5-HT1BR (Cai *et al.*, 2013). No existe evidencia de que el tratamiento crónico con fluoxetina en animales sin CUS provoque una regulación positiva de los AMPAR o aumentos constantes en la fuerza sináptica, lo que indica que la falta de respuestas a la serotonina en animales tratados crónicamente con SSRI no se debe a la maximización previa de la fuerza sináptica. Se pueden estudiar los cambios en la activación de diversas vías del segundo mensajero en busca de evidencia de alteraciones que puedan explicar los resultados. LTP está ausente en ratas no tratadas previamente a las que se les administró fluoxetina, lo que sugiere que la activación de CaMK puede alterarse.

Se puede determinar si la activación de 5-HT1BR y la potenciación de las sinapsis glutamatérgicas son necesarias para los efectos terapéuticos conductuales de los AD. Los SSRI no pueden revertir la anhedonia inducida por estrés si los 5-HT1BR se bloquean farmacológicamente o se desactivan. Asimismo, los SSRI no pueden revertir la anhedonia en ratones GluA1 S831A, lo que implica la potenciación mediada por serotonina. Los ratones transgénicos S831A, pero no ratones nuligénicos para 5-HT1BR, eran anhedónicos incluso en ausencia de CUS, apoyando un modelo de depresión en el que las alteraciones cognitivas y emocionales son el resultado de una disfunción de las sinapsis excitatorias, en lugar de una disfunción de la señalización serotoninérgica (Cai *et al.*, 2013; Kallarackal *et al.*, 2013).

MÉTODOS GENERALES. Se realizan todos los estudios y se analizan todos los datos, con el experimentador 'cegado' al tratamiento farmacológico, genotipo o protocolo conductual utilizado. A menos que se indique de otro modo, se utilizan ratas macho Sprague-Dawley de 4-6 semanas de edad.

Electrofisiología *in vitro*. Realizada como en Kallarackal *et al.* (2013). Para las relaciones AMPA:NMDA, se usa solución salina sin Mg^{2+} para producir una respuesta fuerte mediada por NMDAR. Las respuestas a AMPA se cuantifican como la fase ascendente inicial de la respuesta (FIG. 10A). Las respuestas a NMDA se determinan después de la aplicación de DNQX (50 μM).

Electrofisiología *in vivo*. Los microelectrodos de tungsteno (impedancias de la punta = 0,5 M Ω) se implantan de manera estereotáctica en el estrato piramidal del área CA 1, en la capa II de la EC, en la capa V de la PFC medial, o en la cubierta del NAc y se aseguran al cráneo con cemento. Después de la implantación, las ratas se habitúan a permanecer quietas con una ligera restricción (un poste de metal que conecta la plataforma con un brazo rígido) en un tubo estrecho. La actividad eléctrica en curso se registrará en ausencia de anestesia. Los potenciales de campo se analizarán utilizando el software Spike2.

Transferencia Western. Realizada como anteriormente (Kallarackal *et al.*, 2013) con anticuerpos comerciales.

El estrés crónico impredecible y el estrés por derrota social es como se describe en Cai *et al.* (2013).

Estrés crónico por restricción. Los animales se colocan en tubos de restricción ajustados y se ponen en jaulas con lecho normal a la luz de la habitación durante 4 horas diarias durante 10 días (Lim *et al.*, 2012), después regresaban todas las noches a sus jaulas de alojamiento.

Alfa5 GABA-NAM, L-655,708 y MRK-0106 (Tocris) se disuelven en DMSO y después se diluyen en solución salina para inyección.

Las pruebas de preferencia por sacarosa y alimentación suprimida por novedad fueron como se describe en Cai *et al.*

(2013).

Prueba de interacción social. Las ratas de prueba se colocan primero solas durante 3 minutos en una arena con un pequeño corral de retención en un extremo vacío, después se retiró durante 60 minutos y se volvió a colocar en la arena con una nueva rata juvenil en el corral de retención.

Se hacen grabaciones de video de la posición de la rata en la arena y después se analizan post-hoc para calcular una relación de interacción, definida como la relación del tiempo que la rata pasa en una 'zona de interacción' cerca del corral de retención con el juvenil presente y ausente (Berton *et al.*, 2006). Se realizan múltiples SIT con > 5 días de diferencia.

Preferencia de lugar sexual condicionada. Las ratas se someten primero a una prueba previa, 3 semanas de condicionamiento y después una prueba de preferencia (Camacho *et al.*, 2004). En las sesiones de prueba, cada rata se coloca en el compartimento del medio, y el tiempo transcurrido en 2 compartimentos laterales, cada uno con pistas visuales y lecho exclusivos, se mide durante 30 minutos para determinar la preferencia de lado. Tres veces por semana durante 3 semanas, los machos se colocan después en el compartimento preferido durante 30 minutos directamente desde su jaula de alojamiento con una hembra receptiva (ovariectomizada y se les administra 10 mg de benzoato de estradiol y 2 mg de progesterona, 48 y 4h antes de las pruebas) hasta la eyaculación. Se puntúan la latencia a la primera monta y a la intromisión. 48 horas después de la última cópula, la preferencia se prueba como anteriormente.

Prueba de tubo. Las ratas se alojan en parejas y reciben 2 sesiones de entrenamiento en las que se colocan en un extremo de un tubo de 1m de largo, 5 cm de diámetro, con una recompensa de comida en el otro extremo. Diez veces al día durante 5 días, se colocan en extremos opuestos del tubo. La rata que sale por el extremo opuesto del tubo es declarada ganadora. Se asigna una puntuación a cada rata de la pareja en función del número de victorias totales. Se considera que solo las parejas en las que una rata gana > 75 % de las pruebas tienen una dominancia suficientemente fuerte para probar los efectos de CRS.

Marcaje de olor con orina. Las parejas de ratas se colocan en lados opuestos de una jaula dividida por una pantalla con hojas de papel de filtro debajo. Las hojas secas se tiñen con ninhidrina, que tiñe las aminos en la orina, y se fotografían. El número y el área de las marcas se cuantifican utilizando ImageJ (Lehmann *et al.*, 2013).

Prueba de natación forzada. Las ratas se colocan en un tanque de 50 cm de diámetro lleno de agua a temperatura ambiente. Se puntúa la duración de la inmovilidad durante los últimos 4 minutos de la prueba de 6 minutos (Maeng *et al.*, 2008).

Prueba de preferencia por sacarosa. A las ratas se les administra una prueba de preferencia por sacarosa antes del estrés crónico impredecible o sin estrés. La barra izquierda de los pares (negro) refleja ratas con CUS y la barra derecha de los pares (blanco) refleja ratas sin estrés. Después de 4 semanas, la preferencia de sacarosa media después de 4 semanas de CUS + inyección de vehículo fue significativamente menor que en el grupo sin estrés, indicando anhedonia, (FIG. 8. ANOVA con medidas repetidas 3X2 de la interacción grupo-tiempo $F(2,18) = 12,309$, $p = 0,006$; * $p < 0,05$ frente a todos los demás grupos, prueba de Bonferroni) $N = 5$ ratas con CUS y $N = 7$ ratas sin estrés. Después de otra semana de estrés, las ratas tratadas con L-655,708 24 horas antes tenían una preferencia por sacarosa restaurada, indicando acción antidepresiva. Las ratas sin estrés no tuvieron una preferencia por sacarosa significativamente diferente después de 4 o 5 semanas sin estrés.

MRK-016 revierte rápidamente la pérdida de preferencia por sacarosa y los comportamientos de interacción social después del estrés crónico por restricción (FIG. 9). Después de dos semanas de estrés crónico por restricción, las ratas tuvieron una reducción en la preferencia por sacarosa, que no se revirtió después del tratamiento con vehículo ($F(3,33) = 20,63$, $p < 0,0001$, $n = 12$ ratas, $p < 0,05$ en comparación con el valor inicial antes de CUS, prueba post-hoc de Tukey). 24 horas después del tratamiento con MRK-016, la preferencia por sacarosa no fue significativamente diferente de la inicial antes de la exposición a estrés, y este efecto continuó durante 7 días. De forma similar, las puntuaciones de interacción social disminuyeron significativamente después del estrés crónico y el tratamiento con vehículo ($F(2,14) = 11,84$, $p = 0,0009$, $n = 8$ ratas). *, $p < 0,05$ en comparación con el valor inicial antes de CUS, prueba post-hoc de Tukey). Sin embargo, 24 horas después del tratamiento con MRK-016 (3 mg/kg), las puntuaciones de interacción social no fueron significativamente diferentes a la afección previa al estrés, lo que indica una rápida acción antidepresiva. Esto continuó durante 7 días a pesar de una exposición a estrés posterior y en los mismos animales después de una semana adicional de CRS y 7 días después de la inyección de MRK-016.

EJEMPLO 3

Los moduladores alostéricos negativos selectivos de alfa5 de los receptores GABAA ejercen una rápida acción antidepresiva y restauran la alteración inducida por estrés de la fuerza sináptica excitatoria

Visión general

Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) son la primera línea de tratamiento farmacológico

para la depresión, pero los SSRi son eficaces solamente en la mitad de los pacientes y, por lo general, tardan varias semanas en aliviar los síntomas. La ketamina, un antagonista del receptor de NMDA, ejerce una rápida acción antidepresiva, pero tiene efectos secundarios preocupantes. En la presente divulgación se consideró que los agonistas inversos parciales de benzodiacepinas ejercerían efectos similares sobre la actividad cerebral como la ketamina, pero no ejercería tantos efectos secundarios si se dirigiera solamente a receptores GABA_A que contienen subunidades alfa5, que están enriquecidos en el hipocampo y la corteza prefrontal. En la presente divulgación se muestra que el agonista inverso selectivo de alfa5 L-655,708 revirtió las alteraciones en el comportamiento hedónico en las pruebas de preferencia por sacarosa e interacción social producidas por dos paradigmas de estrés crónico diferentes en ratas dentro de las 24 horas de la administración sistémica. L-655,708 no tuvo efecto sobre el comportamiento hedónico en animales sin estrés. La inyección de L-655,708 también restauró en 24 horas la fuerza de la transmisión sináptica excitatoria patológicamente debilitada en la sinapsis temporoamónica-CA1 sensible al estrés, medida electrofisiológicamente, y aumentó los niveles de la subunidad GluA1 del receptor AMPA, medido con transferencia Western. En realizaciones específicas, la capacidad del L-655,708 para restaurar la fuerza sináptica excitatoria subyace rápidamente a su capacidad para restaurar rápidamente las alteraciones conductuales inducidas por estrés, evidencia de apoyo de que la disfunción de múltiples sinapsis excitatorias en las vías de recompensa cortico-mesolímbicas contribuye, en parte, a la génesis de la depresión. Los agonistas inversos parciales del sitio receptor de benzodiacepinas de los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ son útiles como compuestos antidepresivos de acción rápida y clínicamente viables.

Introducción

El tratamiento de referencia actual para el tratamiento del trastorno depresivo mayor es aumentar la concentración de neurotransmisores monoamínicos inhibiendo su recaptación con medicamentos tal como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRi). Sin embargo, los SSRi son completamente eficaces solamente en la mitad de los pacientes deprimidos (Gaynes y Warden, 2009). Además, la latencia de 3-8 semanas para lograr un efecto terapéutico complica la optimización de la medicación y retrasa el alivio sintomático. Claramente, se necesitan terapias más eficaces y de acción más rápida para reducir la carga socioeconómica de esta afección debilitante.

El descubrimiento de que los inhibidores de los receptores de glutamato de tipo NMDA (NMDAR), tal como la ketamina, ejercen una rápida acción antidepresiva (Trullas y Skolnick, 1990; Berman *et al.*, 2000; Zarate *et al.*, 2006) ha dado lugar a una reevaluación de las causas de la depresión y las posibles dianas de los antidepresivos. Desafortunadamente, existe la preocupación de que las propiedades adictivas y psicotomiméticas de la ketamina le impidan alcanzar su potencial para tratar la depresión en seres humanos (Machado-Vieira *et al.*, 2009). La ketamina también produce una rápida respuesta conductual similar a un antidepresivo en roedores sometidos a estrés crónico (Maeng *et al.*, 2008; Autry *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; 2011). Esto ha proporcionado información mecanicista crítica sobre cómo se pueden producir acciones antidepresivas rápidas y ha generado esperanzas de que se puedan desarrollar nuevos fármacos que se dirijan a los mismos mecanismos efectores, sin las desventajas de la ketamina.

Un elemento común que vincula las acciones terapéuticas de los antidepresivos, incluidos los SSRi (Cai *et al.*, 2013), ketamina (Pittenger y Duman, 2008; Kavalali y Monteggia, 2012; Abdallah *et al.*, 2014) y escopolamina (Voleti *et al.*, 2013), son sus efectos compartidos sobre las sinapsis excitatorias en los circuitos de recompensa cortico-mesolímbicos. El estrés crónico produce cambios en el comportamiento similares a los de la depresión, así como efectos perjudiciales sobre la estructura y función sinápticas excitatorias en múltiples regiones del cerebro que están asociadas con las facultades cognitivas, la recompensa y el estado de ánimo, incluido el hipocampo (McEwen, 2000; Kallarackal *et al.*, 2013), la corteza prefrontal (PFC) (Yuen *et al.*, 2012; Pittenger y Duman, 2008) y el núcleo accumbens (NAc) (Lim *et al.*, 2012). En cambio, la ketamina, la serotonina y los SSRi promueven la transmisión sináptica excitatoria y revierten los efectos del estrés crónico en estas mismas áreas (Pittenger y Duman, 2008; Li *et al.*, 2010; Autry *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013).

Aunque los mecanismos que subyacen a la rápida acción antidepresiva de la ketamina permanecen en investigación activa, una hipótesis es que ésta suprime la excitación de interneuronas inhibitoras mediada por NMDAR (Moghaddam *et al.*, 1997; Farber *et al.*, 1998; Homayoun y Moghaddam, 2007; Abdallah *et al.*, 2014; cf. however: Autry *et al.*, 2011). Esto da como resultado una desinhibición leve de la población neuronal. Probablemente debido a este aumento en la actividad de la red, un breve período de administración de ketamina desencadena varios procesos dependientes de la actividad, tal como la inducción de potenciación a largo plazo, el aumento de la expresión del gen delta-FosB temprano inmediato y actividad alterada de las vías de señalización de mTOR y/o eEF2. En última instancia, esto conduce a la rápida inducción de genes relacionados con la sinapsis, al aumento de la síntesis de proteínas sinápticas (Li *et al.*, 2010; Autry *et al.*, 2011), la restauración de la fuerza sináptica normal y la mejora constante de los signos y síntomas depresivos. Estos resultados indican que, en última instancia, es el leve aumento de la actividad en los circuitos neuronales del prosencéfalo el mecanismo clave mediante el cual la ketamina ejerce sus rápidas acciones terapéuticas antidepresivas.

Basándose en esta consideración, los inventores buscaron identificar otros compuestos que pudieran desencadenar aumentos leves en la actividad neuronal, tal como la ketamina. Los agonistas inversos parciales en el sitio de las benzodiacepinas de los receptores de tipo A del ácido γ -aminobutírico (GABA_AR) son moduladores alostéricos negativos que se ha demostrado que promueven una actividad de red coherente (Hajos *et al.*, 2004). Los GABA_AR

que contienen la subunidad $\alpha 5$ se expresan exclusivamente por neuronas corticales prefrontales y células piramidales del hipocampo, ofreciendo los medios para dirigir selectivamente las entradas corticales a los circuitos mesolímbicos, minimizando así los efectos secundarios psicotomiméticos y sedantes. L-655,708 es uno de esos agonistas inversos parciales de los sitios de las benzodiazepinas de los GABA_AR con una selectividad de 10 a 100 veces mayor para los

5 GABA_AR que contienen la subunidad alfa5 (Atack *et al.*, 2005; 2006). Los agonistas inversos selectivos de alfa5 del sitio de las benzodiazepinas no son epileptogénicos, alucinógenos ni ansiogénicos en seres humanos (Atack *et al.*, 2009).

Se consideró que L-655,708 ejercería una rápida acción antidepresiva mediante convergencia sobre los mecanismos efectores aguas abajo de la ketamina y, por lo tanto, se predijo que un solo tratamiento de L-655,708 revertiría rápidamente (< 24 horas) los cambios crónicos inducidos por estrés tanto en el comportamiento hedónico como en la transmisión sináptica excitatoria en la sinapsis arquetípica sensible al estrés entre aferentes temporoamónicas (TA) y las dendritas distales de las células piramidales CA1.

15 **Materiales y métodos**

Estrés crónico por restricción (CRS). Se colocaron ratas macho Sprague Dawley (de 4 a 5 semanas de edad; Harlan Laboratories) en tubos de restricción de tamaño adecuado, restringiendo mucho su movimiento durante periodos de cuatro horas en un laboratorio bien iluminado, todos los días durante diez días durante la fase luminosa de su ciclo diurno (Lim *et al.*, 2012).

20 Estrés crónico impredecible (CUS). Se dividieron aleatoriamente ratas macho Sprague-Dawley (4 - 5 semanas de edad; Harlan Laboratories) en grupos de control y con CUS. Las ratas del grupo con CUS se alojaron individualmente. Los animales con CUS se trataron con dos factores estresantes leves todos los días durante 5-6 semanas durante su fase luminosa (Willner *et al.*, 1987). Los factores estresantes se ciclaron aleatoriamente para potenciar la imprevisibilidad. Los factores estresantes fueron: natación forzada, en la que las ratas se colocaron en una palangana que contenía agua fría durante 5 minutos; iluminación estroboscópica, en oscuridad total de otro modo durante 30 minutos; restricción, durante la cual las ratas se colocaron en tubos de restricción de tamaño apropiado durante 30 minutos; exposición al ruido blanco durante 30 minutos; y privación de comida o agua durante 14 horas que abarcan la fase oscura.

Prueba de preferencia por sacarosa (SPT). A las ratas se les dio a elegir entre dos botellas que contenían agua del grifo o una solución de sacarosa al 1 % (Rygula *et al.*, 2006). Las pruebas se realizaron durante la noche (16 horas), incluida la duración completa de su fase oscura. Los animales se entrenaron primero con ambas botellas mientras estaban alojados en grupo. Para pruebas posteriores, incluso durante el período inicial, los animales se alojaron individualmente. La preferencia por sacarosa se calculó como la cantidad de solución de sacarosa consumida como porcentaje de la cantidad total de líquido consumido. Para determinar los efectos del L-655,708, solamente se utilizaron ratas sin estrés que demostraron una preferencia por sacarosa > 75 % al inicio.

40 Test de interacción social (SIT). Como se describió anteriormente (Berton *et al.*, 2006), las ratas se colocaron en un recinto de plástico (82 x 82 cm) con una rejilla de cuadrados de 5x5 (16,4 x 16,4 cm) visible debajo del piso de plástico transparente. Se colocó una pequeña caja de plástico perforada translúcida (20 x 16 cm) contra el centro de una pared de la arena. Durante las condiciones de prueba, se utilizó iluminación fluorescente blanca superior para iluminar la arena. Se utilizó una cámara de video colocada a 170 cm sobre el suelo de la arena para seguir los movimientos de las ratas durante el experimento.

Cada prueba consistió en una prueba de "diana-ausente" seguida de un ensayo de "diana-presente". Durante la prueba, se colocó una rata de prueba individual en el centro de la arena y, después de 30 s de adaptación, los movimientos de la rata se registraron con la cámara de video durante 2,5 minutos. Después del ensayo de "diana-ausente", la rata de prueba se sacó de la arena y se volvió a colocar en su jaula de alojamiento. Para el ensayo "diana-presente", una rata juvenil nueva (3-6 semanas de edad; siempre más joven que la rata que se estaba probando) se colocó en la caja interna en un extremo de la arena y, después de tres minutos, la rata de prueba se devolvió al centro de la arena y se filmó durante 2,5 minutos. Se sacaron ambas ratas y se limpiaron la arena de prueba y la caja interna con etanol al 70 % antes de probar la siguiente rata. Ninguna rata de prueba se encontró con la misma rata diana más de una vez.

Los resultados se cuantificaron como el porcentaje de tiempo transcurrido en la "zona de interacción" (los cinco cuadrados de la cuadrícula que rodean inmediatamente la jaula de plástico) medido para los ensayos de "diana-ausente" y "diana-presente". Estos porcentajes se utilizaron después para calcular una relación de interacción, que es el porcentaje de tiempo transcurrido en la "zona de interacción" durante la prueba "diana-presente" dividido por el de "diana-ausente".

Electrofisiología de los cortes a corto plazo. Se utilizaron métodos convencionales para preparar cortes transversales de hipocampo de 400 μ m de espesor. La solución salina de disección y registro contenía: NaCl 124 mM, KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, MgSO₄ 1,5 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, y glucosa 10 mM, burbujeados con O₂ al 95 %/CO₂ al 5 %. A continuación, los cortes se transfirieron a una cámara de registro de tipo inmersión y se perfundieron

a 0,5 - 2 ml/min a 20-22 °C. Se incluyeron en picrotoxina (100 μ M) y CGP52432 (2 μ M) para bloquear los receptores GABA_A y GABA_B y la región CA3 se eliminó con un bisturí. Debido a que las sinapsis TA-CA1 están electrotónicamente alejadas de los somas de células CA1, se utilizó el registro extracelular de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo local (fEPSP). Las pipetas de registro (3-5 Mw) contenían solución salina extracelular y se colocaron en estrato lacunoso molecular (SLM) para registrar las respuestas TA-CA1. Los fEPSP se amplificaron 1000X, se filtraron a 3 kHz y se digitalizaron a 10 kHz. Se colocaron electrodos de tungsteno bipolares concéntricos a > 500 μ m de los electrodos estimulantes en SLM para aferentes de TA. Se suministraron estímulos (100 μ s) a 0,05 Hz.

Como en el trabajo anterior (Kallarackal *et al.*, 2013), se usó solución salina sin Mg²⁺ para producir un componente fuerte mediado por NMDAR de los fEPSP para la cuantificación de la excitación sináptica mediada por AMPAR. Se promediaron 3-5 respuestas consecutivas y se calculó la pendiente de fEPSP en una ventana de 1-3 ms. Para las respuestas mediadas por AMPAR, la ventana se fijó en la fase ascendente inicial de la respuesta, 2-5 ms después de su inicio. Para respuestas de NMDA, se aplicó en baño DNQX (50 μ M) durante 15 min y se calculó la pendiente en una ventana de 3-5 ms en la fase ascendente de la respuesta, 5-10 ms después de su inicio.

Se provocaron respuestas en una gama de intensidades de estimulación antes y después de la aplicación de DNQX. Las respuestas se compararon primero entre los cortes normalizándolos a la amplitud de la descarga de fibras. La parte lineal de la relación entre la pendiente de respuesta y la amplitud de FV se ajustó con una línea recta y las pendientes de las líneas ajustadas se compararon entre condiciones, como se ha realizado anteriormente (Kallarackal *et al.*, 2013). Los inventores también normalizaron la pendiente de las respuestas mediadas por AMPAR a la pendiente de la respuesta mediada por NMDAR, eligiendo trazos que tuvieran una descarga de fibras más cercana a 0,2 mV de amplitud.

Transferencia Western. Se diseccionaron punciones de tejido SLM (1 mm de diámetro) del área CA1 en cortes de hipocampo y se combinaron (3-4 punciones/muestra). Las membranas se sondaron con anticuerpos dirigidos contra GluA1 (Millipore Bioscience Research Reagents) y β -actina (tecnología de señalización celular). Los niveles de proteínas se expresan como la relación entre la intensidad normalizada y la intensidad de la β -actina, como se ha realizado anteriormente (Kallarackal *et al.*, 2013).

Fármacos/estadísticas. L-655,708 se adquirió de Tocris Bioscience (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se preparó a una concentración de 5 mM en solución salina al 75 %/DMSO al 25 %. La dosis utilizada en este estudio (0,7 mg/kg i.p.) se tomó del estudio de Martin *et al.* (2009), en el que se demostró que L-655,708 revierte las propiedades amnésicas del etomidato anestésico; un signo positivo de su eficacia en el cerebro. Esta dosis es suficiente para ocupar aproximadamente el 70 % de los sitios de unión del prosencéfalo (Atack *et al.*, 2005).

Toda la cuantificación y análisis de resultados conductuales, electrofisiológicos y de transferencia Western se realizaron con el experimentador cegado a la afección del animal, muestra de tejido o proteína. Los datos se compararon primero con un análisis de varianza, seguido de pruebas de comparación post-hoc por pares utilizando el software SPSS.

Resultados ilustrativos

Reversión rápida de los cambios inducidos por estrés en el comportamiento hedónico por L-655,708

Varios comportamientos hedónicos en roedores son sensibles al estrés crónico y se restauran por administración crónica, pero no a corto plazo, de SSRI, proporcionando un medio para detectar posibles compuestos antidepresivos. En primer lugar, se determinó si L-655,708 restauraría rápidamente (<24 horas) el comportamiento hedónico normal después de estrés crónico por restricción (Watanabe *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 2012), coherente con las acciones rápidas de tipo antidepresivo de la ketamina (Li *et al.*, 2011). Primero se hicieron mediciones iniciales de interacción social y preferencia por sacarosa, y después se sometieron ratas de 4-5 semanas a diez días de CRS. En la culminación del tratamiento con CRS, se inyectaron ratas con cualquier vehículo (solución salina al 75 %, DMSO al 25 %; i.p.) o L-655,708 (0,7 mg/kg, i.p.). Las pruebas de interacción social y la preferencia por sacarosa se repitieron a continuación, 24 horas después de la inyección. El estrés crónico por restricción produjo una disminución en la relación de interacción social en ratas con CRS inyectadas con vehículo en comparación con todos los demás grupos, mientras que la relación de interacción social en las ratas inyectadas con L-655,708 no fue significativamente diferente del valor inicial ($F(1,12) = 2,85$, $p=0,115$; $n = 7$ inyectadas con vehículo, 7 inyectadas con L-655,708) (FIG. 6A). De forma similar, hubo una disminución significativa en la preferencia por sacarosa en ratas que recibieron una inyección de vehículo en comparación con su valor inicial previo al estrés, mientras que las ratas estresadas a las que se les administró L-655,708 mostraron niveles de preferencia por sacarosa que no fueron diferentes de su valor inicial previo al estrés (ANOVA con medidas repetidas 2x2: $F(1,11) = 7,514$, $p=0,019$) (FIG. 6B). Estos cambios conductuales son coherentes con descripciones previas de SSRI crónicos (Cai *et al.*, 2013) y ketamina a corto plazo (Li *et al.*, 2011).

A fin de determinar si la rápida reversión de los cambios en el comportamiento inducidos por el estrés por L-655,708 era específica de los procedimientos de CRS, estos experimentos se repitieron utilizando otro paradigma de estrés crónico psicológico, estrés crónico impredecible (CUS) (Willner *et al.*, 1987). Las pruebas de interacción social se realizaron en tres puntos temporales secuenciales (FIG.7): antes de CUS (valor inicial), después de 4 semanas de

CUS y una inyección de la solución de vehículo 24 horas antes, y después de una semana adicional de CUS y una inyección de L-655,708 24 horas antes (0,7 mg/kg, i.p.). La relación media de interacción social fue significativamente menor en ratas sometidas a CUS que recibieron una inyección de vehículo en comparación con las ratas tanto al inicio y sin estrés (ANOVA con medidas repetidas 3X2 de la interacción grupo-tiempo: $F(2,50) = 6,538$, $p = 0,005$; $n = 18$ CUS, 9 ratas sin estrés) (Figura 10A), coherente con descripciones previas de cambios conductuales inducidos por estrés (Berton *et al.*, 2006). 24 horas después de una sola inyección de L-655,708, la interacción social en 14 de las 18 ratas con CUS se revirtió a niveles que no eran significativamente diferentes del valor inicial o las respuestas previas al estrés en animales no estresados (Figura 7B, símbolos negros). Las cuatro ratas con CUS inyectadas con L-655,708 que no mostraron un aumento en la interacción social parecieron en gran parte resistentes a los procedimientos con CUS (Figura 7B, símbolos grises).

L-655,708 no tuvo un efecto significativo en el tiempo que las ratas transcurrieron en la zona de interacción en la condición de ausencia de diana después de CUS ($F(2,23) = 1,484$, $p = 0,248$) o CRS ($F(1,10) = 0,971$, $p = 0,348$), así como en animales sin estrés, indicando que no indujo efectos inespecíficos duraderos sobre la conducta locomotora que podrían explicar sus efectos sobre la relación de interacción social (FIG. 12).

Las ratas sin estrés no mostraron cambios en la preferencia por sacarosa ni en la interacción social 24 horas después de la inyección bien con L-655,708 o con solución salina (FIG. 7C y 7D).

Considerados en conjunto, estos datos muestran que L-655,708 revirtió los cambios conductuales de tipo depresivo inducidos por estrés crónico en menos de 24 horas de una manera independiente del modelo. La administración de L-655,708 no produjo ningún cambio en el comportamiento de los animales sin estrés en estas pruebas.

Reversión rápida del debilitamiento inducido por estrés de la transmisión sináptica excitatoria por L-655,708

El estrés crónico induce una reducción en la transmisión sináptica excitatoria en muchos núcleos cortico-mesolímbicos, incluyendo sinapsis TA-CA1 en el hipocampo (Kallarackal *et al.*, 2013). La administración crónica, pero no a corto plazo, de fluoxetina restaura su fuerza con un curso de tiempo que es comparable con la restauración conductual (Cai *et al.*, 2013). Por lo tanto, se examinó la transmisión sináptica TA-CA1 para preguntar si el L-655,708 revertiría un fenotipo sináptico inducido por estrés tan rápidamente como revertía los cambios conductuales inducidos por estrés.

Los inventores utilizaron un registro electrofisiológico extracelular de fEPSP en las sinapsis TA-CA1 en SLM del área CA1 en cortes de cerebro preparados a partir de ratas sin estrés, ratas sometidas a diez días de CRS y que recibieron una inyección de vehículo 24 horas antes, y ratas sometidas a diez días de CRS y que recibieron una inyección de L-655,708 24 horas antes (0,7 mg/kg, i.p.). Estas fueron las mismas ratas utilizadas para los análisis conductuales en la FIG. 6. Se registraron los fEPSP en ACSF que carecía de Mg^{2+} añadido para desbloquear los receptores de NMDA. Se cuantificó primero la pendiente del componente AMPAR del fEPSP provocado en un intervalo de intensidades de estimulación en función de la amplitud de la descarga de fibras (FV), una medida del número de sinapsis activadas. Después se aplicó DNQX para bloquear la transmisión mediada por AMPAR y provocó una serie de respuestas mediadas por NMDAR en el mismo intervalo de intensidades de estimulación, como en un estudio anterior (Kallarackal *et al.*, 2013).

Hubo una disminución en la pendiente del componente mediado por AMPAR del fEPSP entre todas las intensidades de estimulación en cortes de ratas sometidas a CRS y que recibieron una inyección de vehículo, en comparación con cortes de ratas sin estrés y cortes de ratas sometidas a CRS y que recibieron una inyección de L-655,708 (ANOVA de una vía: $F(2,17) = 3,675$, $p = 0,047$; $n = 5$ sin estrés, 8 con CRS + vehículo, 7 con CRS + L-655,708) (FIG. 10A y 10B). No hubo diferencia correspondiente en la pendiente del componente NMDA del fEPSP en estas condiciones ($F(2,17) = 0,549$, $p = 0,588$) (FIG. 10A y 10B). Se calculó una relación AMPA:NMDA para cada corte usando la pendiente de la respuesta provocada cuando la FV era aprox. 0,2 mV de amplitud antes y después de la aplicación de DNQX. La relación AMPA:NMDA fue significativamente mayor en cortes de ratas con CRS inyectadas con L-655,708 24 horas antes, en comparación con los animales tratados con vehículo sometidos a CRS ($p < 0,05$ LSD post-hoc), y no fue diferente de las respuestas en el tejido de ratas sin estrés (ANOVA de una vía: $F(2,17) = 4,345$, $p = 0,03$) (FIG. 10C).

Estos resultados replican las observaciones anteriores de que la señalización mediada por AMPAR, pero no la señalización mediada por NMDAR, se ve alterada por el estrés crónico en las sinapsis TA-CA1 y ahora se ha demostrado que esta alteración puede revertirse rápidamente mediante el tratamiento con L-655,708. La eficacia conductual antidepressiva de L-655,708 se asocia con una restauración de la neurotransmisión excitatoria en esta sinapsis sensible al estrés.

La reversión rápida de la regulación negativa inducida por estrés de la expresión de GluA1 por L-655,708

la restauración de la transmisión mediada por AMPAR alterada por estrés producida por el tratamiento con SSRI crónicos (Kallarackal *et al.*, 2013) o con ketamina (Li *et al.*, 2011) se asocia con un aumento en la expresión de la subunidad GluA1 del AMPAR. Se consideró si el L-655,708 también restauraría la expresión de GluA1 tan rápidamente como revierte los fenotipos conductuales y sinápticos inducidos por estrés.

El tejido del SLM se recogió de los cortes tomados de ratas sin estrés, ratas sometidas a diez días de CRS y que recibieron una inyección de vehículo 24 horas antes, y ratas sometidas a diez días de CRS y que recibieron una inyección de L-655,708 24 horas antes (0,7 mg/kg, i.p.). Estas fueron las mismas ratas utilizadas en la FIG. 6. Como se informó anteriormente para CUS, las ratas sometidas a CRS e inyectadas con vehículo mostraron un nivel significativamente menor de proteína GluA1 en SLM en comparación con las ratas de control sin estrés (prueba H de Kruskal-Wallis: $\chi^2(2) = 10,62$, $p = 0,0049$; $n = 6$ ratas sin estrés, 6 con CRS + vehículo, 8 con CRS + L-655,708) (FIG. 11). Por el contrario, las ratas estresadas inyectadas con L-655,708 24 horas antes mostraron niveles de GluA1 que no eran significativamente diferentes a los niveles en los controles sin estrés.

Estos resultados demuestran que la disminución inducida por el estrés en la expresión de la proteína GluA1, que se correlaciona tanto con la transmisión sináptica excitatoria debilitada en las sinapsis TA-CA1 como con los comportamientos hedónicos alterados, se revierte rápidamente mediante el tratamiento con L-655,708. El agonista inverso selectivo de la subunidad $\alpha 5$ de las benzodiazepinas L-655,708 muestra por tanto eficacia antidepressiva con criterios de valoración conductuales, electrofisiológicos y moleculares.

Importancia de determinadas realizaciones

En el presente documento se describe que L-655,708, un agonista inverso parcial en el sitio de las benzodiazepinas del GABA_AR que es altamente selectivo para receptores que contienen subunidades alfa5, revierte los fenotipos conductuales y sinápticos producidos por dos paradigmas de estrés crónico diferentes dentro de las 24 horas de una sola administración sistémica.

Los comportamientos del apetito motivados, evaluados en las pruebas de interacción social y de preferencia por sacarosa evalúan las propiedades hedónicas de dos estímulos distintos, comida y sociabilidad. Tanto en las pruebas de preferencia por sacarosa como en las de interacción social, las ratas deben responder de manera activa para mostrar los altos niveles de preferencia por sacarosa e interacción social que se observan normalmente. Se sabe que el estrés crónico disminuye las propiedades de recompensa de una variedad de estímulos naturales y no naturales en roedores, incluyendo su alta preferencia por la solución apetecible que contiene sacarosa (Pothion *et al.*, 2004) y el valor de recompensa de manera natural de las interacciones sociales (Berton *et al.*, 2006). La pérdida de las propiedades de recompensa de estos estímulos se considera análoga a la anhedonia, o la incapacidad de experimentar recompensa, un síntoma central de la depresión en seres humanos. De manera importante, el comportamiento normal tanto en la prueba de preferencia por sacarosa (Rygula *et al.*, 2006) como en la prueba de interacción social (Berton *et al.*, 2006) se restauran con administración crónica de SSRI, pero no a corto plazo, proporcionando así una fuerte indicación pronóstica de la posible eficacia antidepressiva en seres humanos de L-655,708 u otros agonistas inversos selectivos de alfa5 del sitio de las benzodiazepinas.

Receptores GABA_A que contienen alfa5 como diana de un fármaco antidepressivo. Los receptores GABA_A son canales iónicos heteropentaméricos, que más comúnmente contienen subunidades alfa, beta y gamma en una estequiometría 2:2:1 (Sieghart y Sperk, 2002). La interfaz entre una subunidad gamma2 y una subunidad α forma el receptor de benzodiazepinas, un sitio de modulación alostérica que altera la apertura del canal y la función de GABA_AR. Además de los agonistas de las benzodiazepinas (moduladores positivos), existen agonistas inversos que actúan en el sitio de las benzodiazepinas para disminuir la función de los receptores GABA_A (moduladores negativos). La identidad molecular de la subunidad α en el sitio receptor de benzodiazepinas determina su perfil farmacológico. Los GABA_AR que contienen subunidades $\alpha 1$ median los efectos sedantes y amnésicos de las benzodiazepinas preferentemente, mientras que los GABA_AR que contienen subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ median sus efectos ansiolíticos (Rudolph *et al.*, 1999; Mohler *et al.*, 2002). Los agonistas inversos parciales con baja afinidad por estos subtipos de receptores ofrecen la posible ventaja de un intervalo de concentración terapéutica más amplio y una menor probabilidad de producir efectos secundarios negativos, tales como ansiedad o descarga epileptiforme.

El ARNm de la subunidad $\alpha 5$ es abundante en las células piramidales del hipocampo y las capas profundas de la neocorteza, y los GABA_AR que contienen $\alpha 5$ se localizan en sitios sinápticos y extrasinápticos en las dendritas (Fritschy y Mohler, 1995; Wainwright *et al.*, 2000; Serwanski *et al.*, 2006). Los GABA_AR que contienen $\alpha 5$ median la inhibición tónica (Caraiscos *et al.*, 2004) y reducen la excitabilidad de las células piramidales (Bonin *et al.*, 2006), por lo que los moduladores alostéricos negativos de los GABA_AR que contienen $\alpha 5$ deben promover una actividad coherente (Hajos *et al.*, 2004; Towers *et al.*, 2004). Los fármacos dirigidos a estos receptores son, por tanto, un medio atractivo para alterar selectivamente la actividad dentro de los circuitos cortico-mesolímbicos sin alterar la actividad en otros circuitos. De hecho, la eliminación del gen $\alpha 5$ altera el aprendizaje en tareas dependientes del hipocampo, pero no en las independientes del hipocampo (Collinson *et al.*, 2002). Curiosamente, las subunidades alfa5 se regulan positivamente en ratones después del estrés crónico (Matsumoto *et al.*, 2007), lo que sugiere un papel de las subunidades alfa5 en los déficits cognitivos asociados con el estrés crónico y la depresión, en realizaciones particulares.

Mecanismos de acción del L-655,708. La observación de que L-655,708 restaura rápidamente la transmisión excitatoria mediada por AMPAR debilitada patológicamente en las sinapsis TACA1 del hipocampo indica un mecanismo probable por el cual L-655,708 ejerce su eficacia antidepressiva en las pruebas conductuales. Los SSRI (Cai *et al.*, 2013), la ketamina (Autry *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010) y L-655,708, potencian todos la fuerza sináptica excitatoria en múltiples sitios dentro del circuito de recompensa cortico-mesolímbico, proporcionando así un fuerte

apoyo para una asociación entre la restauración de la fuerza sináptica excitatoria y la reversión de los fenotipos conductuales depresivos (Duman, 2014). Las sinapsis TA-CA1 no son únicamente sensibles al estrés ni responden a los antidepresivos, pero sirven como un arquetipo conveniente de cambios inducidos por estrés que probablemente están produciéndose en muchas sinapsis en el circuito de recompensa cortico-mesolímbico (Lim *et al.*, 2012; Yuen *et al.*, 2012). Es probable que el efecto neto de este debilitamiento sea una disfunción en el procesamiento de los estímulos de recompensa que pueden subyacer a los síntomas comunes de la depresión, tal como la anhedonia (Nestler y Carlezon, 2006). La restauración de la fuerza de estas sinapsis mediante antidepresivos eficaces debería restaurar las respuestas normales a los estímulos de recompensa (Belujon y Grace, 2014).

La administración a corto plazo de ketamina mejora el estado de ánimo y reduce los síntomas depresivos en 1-2 horas en seres humanos y estos efectos continúan hasta durante dos semanas. De forma similar, la ketamina restaura la preferencia por sacarosa y los comportamientos de alimentación suprimida por novedad rápidamente (24 horas) en animales con estrés crónico (Li *et al.*, 2011). Los efectos terapéuticos de la ketamina se inducen durante el breve período (aproximadamente 1-2 horas) cuando está presente en el cerebro en concentraciones suficientes para inhibir los NMDAR, desencadenando el alivio de los síntomas que continúan durante días después de que el cuerpo la elimine. Durante esta fase de inducción, la ketamina puede reducir preferentemente la excitación de las interneuronas inhibitorias GABAérgicas (Dwyer y Duman, 2013; Farber *et al.*, 1998; Homayoun y Moghaddam, 2007), produciendo así una leve desinhibición de la población neuronal y una mayor actividad en el hipocampo, corteza entorrinal, NAc y PFC, como se observa en roedores (p. ej., Kittelberger *et al.*, 2012; Middleton *et al.*, 2008; Cazar *et al.*, 2011) y en seres humanos (Cornwell *et al.*, 2012; Driesen *et al.*, 2013). Esta actividad va acompañada de una oleada de liberación de glutamato detectable neuroquímicamente en la PFC y en el NAc (Lorrain *et al.*, 2003; Moghaddam *et al.*, 1997; Razoux *et al.*, 2007). Los agonistas inversos de benzodiacepinas selectivos de $\alpha 5$ también producen una desinhibición leve a través de sus acciones alostéricas negativas y, por lo tanto, también deberían desencadenar una mayor coherencia en la actividad oscilatoria, como se ha observado después de la inyección de agonistas inversos de benzodiacepinas no selectivos (Hajos *et al.*, 2004).

En realizaciones específicas, la capacidad tanto de L-655,708 como de la ketamina para promover la actividad explica su eficacia antidepresiva compartida porque dicha actividad fortalece las sinapsis excitatorias mediante la convergencia en vías de señalización dependientes de la actividad comunes. Los posibles procesos dependientes de la actividad incluyen un aumento en la señalización de BDNF, la activación de la señalización de mTOR y la síntesis de proteínas (Autry *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010; 2011). También es probable que un aumento en la actividad del circuito coherente promueva la inducción de potenciación a largo plazo (por ejemplo, Huerta y Lisman, 1993). Se ha demostrado que todos estos procesos dependientes de la actividad fortalecen las sinapsis excitatorias. De hecho, la administración de L-655,708 desencadena un rápido aumento en los niveles de proteína GluA1 en las dendritas distales de las células piramidales CA1, coincidiendo con un aumento en la excitación sináptica mediada por AMPAR. Curiosamente, la administración crónica, pero no a corto plazo, de SSRi también promueve los niveles de proteína GluA1 en esta misma región (Kallarakal *et al.*, 2013), que está densamente innervado con terminales serotoninérgicas.

Potencial terapéutico. Debido a que la desinhibición promueve la inducción de la potenciación a largo plazo, la presunta base celular de la memoria, los agonistas inversos parciales de los GABA_AR que contienen subunidades $\alpha 5$ se han desarrollado como potenciadores cognitivos (Ballard *et al.*, 2009; Quirk *et al.*, 1996; Atack *et al.*, 2006; 2009). A diferencia de los agonistas inversos de benzodiacepinas no selectivos, estos compuestos no son ansiogénicos, alucinógeno o epileptogénicos en seres humanos (Atack *et al.*, 2009).

Aunque los SSRi son razonablemente seguros y bien tolerados, y no son adictivos, son eficaces solamente en un subconjunto de pacientes y solamente después de un plazo de semanas a meses. La ketamina, por otro lado, ejerce una rápida acción antidepresiva en la mayoría de los pacientes, pero su viabilidad terapéutica está extremadamente limitada a sus propiedades disociativas y anestésicas, así como su capacidad de abuso y sobredosis. L-655,708 revirtió los cambios conductuales inducidos por estrés y restauró la fuerza sináptica excitatoria mediada por AMPAR en dos modelos de roedores bien validados de eficacia antidepresiva, tal como los SSRi y la ketamina. Debido a que estos efectos se indujeron dentro de las 24 horas posteriores a una sola inyección sistémica, en realizaciones particulares, Los agonistas inversos parciales de receptores de benzodiacepinas que actúan sobre los GABA_AR que contienen la subunidad alfa5 representan un tratamiento novedoso, de acción rápida, eficaz y clínicamente viable para la depresión en seres humanos.

REFERENCIAS

Abdallah CG, Sanacora G, Duman RS, Krystal JH (2014). Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. *Annu Rev Med*, in press.

Amat J, Alekseyev RM, Paul E, Watkins LR, Maier SF (2010) Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neurosci*. 165: 1031-1038.

Atack JR, Alder L, Cook SM, Smith AJ, McKernan RM (2005). *In vivo* labelling of $\alpha 5$ subunit-containing GABA_A receptors using the selective radioligand [³H]L-655,708. *Neuropharmacol* 49: 220-229.

- Atack JR, Bayley PJ, Seabrook GR, Wafford KA, McKernan RM, Dawson GR (2006). L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for $\alpha 5$ -containing GABAA receptors. *Neuropharmacol* 51: 1023-1029.
- 5 Atack JR, Maubach KA, Wafford KA, O'Connor D, Rodrigues AD, Evans DC, et al (2009). *In vitro* and *in vivo* properties of 3-*tert*-Butyl-7-(5-methylisooxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy)-pyrazolo[1,5-d]-[1,2,4] triazine (MRK-016), a GABAA receptor $\alpha 5$ subtype-selective inverse agonist. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 331: 470-484.
- 10 Autry AE, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET et al (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioral antidepressant responses. *Nature* 475: 91-95.
- Ballard T, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J et al (2009). RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA $\alpha 5$ subunit-containing receptors. *Psychopharmacol* 202: 207-223.
- 15 Belujon P, Grace AA (2014). Restoring mood balance in depression: ketamine reverses deficit in dopamine-dependent synaptic plasticity. *Biol Psychiatry* May 6. pii: S0006-3223(14)00299-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.04.014.
- 20 Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS et al (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47: 351-54.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ et al (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864-868.
- 25 Bonin RP, Martin LJ, MacDonald JF, Orser BA (2007). $\alpha 5$ GABAA receptors regulate the intrinsic excitability of mouse hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 98: 2244-2254.
- Burgard EC, Tietz EI, Neelands TR, Macdonald RL (1996) Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol Pharmacol*. 50: 119-127.
- 30 Cai X, Kallarackal AJ, Kvarta MD, Goluskin S, Gaylor K, Bailey AM et al (2013). Local potentiation of excitatory synapses by serotonin and its alteration in rodent models of depression. *Nature Neuro* 16: 464-472.
- 35 Caixeta FV, Cornelio AM, Scheffer-Teixeira R, Ribeiro S, Tort ABL (2013). Ketamine alters oscillatory coupling in the hippocampus. *Nature Scientific Reports* 3: 2348.
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG et al (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3662-3667.
- 40 Chen L, Durkin KA, Casida JE (2006) Structural model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fit the same site. *Proc Natl Acad Sci USA*.103: 518S-5190.
- 45 Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, et al (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *JNeurosci* 22: 5572-5580.
- Cornwell B, Salvatore G, Furey M (2012). Synaptic potentiation is critical for rapid antidepressant response to ketamine in treatment-resistant major depression. *Biological Psychiatry*, 72: 555-561.
- 50 Driesen NR, McCarthy G, Bhagwagar Z, Bloch MH, Calhoun VD, D'Souza DC et al (2013). The impact of NMDA receptor blockade on human working memory-related prefrontal function and connectivity. *Neuropsychopharmacol* 38: 2613-2622.
- 55 Duman RS, Vaidya VA, Nibuya M, Morinobu S, Rydelek L (1995). Review: Stress, Antidepressant Treatments, and Neurotrophic Factors: Molecular Mechanism. *Neuroscientist* 1: 351.
- Duman RS, Voleti B (2012). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35: 47 - 56.
- 60 Duman RS (2014). Neurobiology of stress, depression and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. *Depress Anxiety* 31: 291-296.
- 65 Dwyer JM, Duman RS (2013). Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants. *Biol Psychiatry*, 73: 1189-1198.

- Farber NB, Newcomer JW, Olney JW (1998). The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders. Focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 116: 421-437.
- 5 Fritschy JM, Möhler H (1995). GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 1359: 154-194.
- 10 Gaynes B, Warden D (2009). What did STAR* D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatry Serv* 60: 1439-1445.
- Hajós M, Hoffmann WE, Orbán G, Kiss T, Erdi P (2004). Modulation of septo-hippocampal theta activity by GABAA receptors: an experimental and computational approach. *Neurosci* 126: 599-610.
- 15 Homayoun H, Moghaddam B (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neuroscience* 27: 11496-11500.
- Huerta PT, Lisman JE (1993). Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 364: 723-725.
- 20 Hunt MJ, Falinska M, Leski S, Wójcik DK, Kasicki S (2011). Differential effects produced by ketamine on oscillatory activity recorded in the rat hippocampus, dorsal striatum and nucleus accumbens. *J Psychopharmacol* 25: 808-821.
- 25 Ibrahim L, et al. (2012) Course of Improvement in depressive symptoms to a single intravenous infusion of ketamine vs add-on riluzole: results from a 4-week, double-blind, placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacol.* 37: 1526-1533.
- 30 Kallarackal AJ, Kvarata MD, Cammarata E, Jaber L, Cal X, Bailey AM, Thompson SM (2013) Chronic stress induces a selective decrease in AMPA receptor-mediated synaptic excitation at hippocampal temporoammonic-CA1 synapses. *J Neurosci.* 33: 15669 -15674.
- Kavalali ET, Monteggia LM (2012). Synaptic mechanisms underlying rapid antidepressant action of ketamine. *Am J Psychiatry* 169: 1150-1156.
- 35 Kittelberger K, Hur EE, Sazegar S, Keshavan V, Kocsis B (2012). Comparison of the effects of acute and chronic administration of ketamine on hippocampal oscillations: relevance for the NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Brain Struct Funct* 217: 395-409.
- 40 Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, et al (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329: 959-964.
- Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H et al (2011). Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69: 754-761.
- 45 Lim BK, Huang, KW, Grueter, BA, Rothwell, PE y Malenka, RC (2012). Anhedonia requires MC4R-mediated synaptic adaptations in nucleus accumbens. *Nature* 487: 183-189.
- Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA (2003). Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neurosci* 117: 697-706.
- 50 Machado-Vieira R, Salvatore G, Diazgranados N, Zarate CA (2009) Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Pharmacol Ther* 123: 143-150.
- 55 Maeng S, Zarate CA, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G et al (2008). Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biological Psychiatry* 63: 349-352.
- 60 Maguire J, Ferando I, Simonsen C, Mody I (2009) Excitability changes related to GABAA receptor plasticity during pregnancy. *J Neurosci* 29: 9592-9601.
- Martin LJ, Oh GH, Orser BA (2009). Etomidate targets $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid subtype A receptors to regulate synaptic plasticity and memory blockade. *Anesthesiol* 111: 1025-1035.
- 65 Matsumoto K, Puia G, Dong E, Pinna G (2007). GABAA receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood

and anxiety disorders. *Stress* 10: 3-12.

McEwen BS (2000). Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacol* 22: 108-124.

Mellon SH, Griffin LD (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 35-43.

Middleton S, Jalics J, Kispersky T, Lebeau FE, Roopun AK, Kopell NJ et al (2008). NMDA receptor-dependent switching between different gamma rhythm-generating microcircuits in entorhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18572-18577.

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: A novel step in the pathway from NMDA receptor blockade. *J Neurosci* 17: 2921-2927.

Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U (2002). A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 300: 2-8.

Nestler EJ, Carlezon WA (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59: 1151-1159.

Pinna G, Costa E, Guidotti A (2006) Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacol* 186: 362-72.

Pittenger C, Duman RS (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol* 33: 88-109.

Pothion S, Bizot J-C, Trovero F, Belzung C (2004). Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behavioural Brain Res* 155: 135-146.

Quirk K, Blurton P, Fletcher S, Leeson P, Tang F, Mellilo D et al (1996). [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the $\alpha 5$ subunit. *Neuropharmacol* 35: 1331-1335.

Razoux F, Garcia R, Léna I (2007). Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacol* 32: 719-727.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM et al (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acidA receptor subtypes. *Nature* 401: 796-800.

Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Hiemke C, Fuchs E, Ruther E et al (2006). Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. *Behav Pharmacol* 17: 19-29.

Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL (2006). Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the $\alpha 5$ subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* 499: 458-470.

Shansky RM, et al. (2004) Estrogen mediates sex differences in stress-induced prefrontal cortex dysfunction. *Mol Psychiatry* 9: 531-538.

Sieghart W, Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795-816.

Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M (2012) A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the α (+) PH interface. *Br J Pharmacol* 166:476-485.

Towers SK, Gloveli T, Traub RD, Driver JE, Engel D, Fradley Ret al (2004). Alpha 5 subunit-containing GABAA receptors affect the dynamic range of mouse hippocampal kainate-induced gamma frequency oscillations *in vitro*. *J Physiol* 559: 721-728.

Trullas R, Skolnick P (1990). Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 18: 1-10.

Yuen EY, Wei J, Liu W, Zhong P, Li X, Zhen Y (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron* 73: 962-977.

Voleti B, Navarria A, Liu RJ, Banasr M, Li N, Terwilliger R, et al (2013). Scopolamine rapidly increases mammalian

target of rapamycin complex 1 signaling, synaptogenesis, and antidepressant behavioral responses. *Biol Psychiatry* 74: 742-749.

5 Wafford KA (2005) GABAA receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr Opin Pharmacol*. 5: 47-52.

Wainwright A, Sirinathsinghji DJ, Oliver KR (2000) Expression of GABA(A) receptor alpha5 subunit-like immunoreactivity in human hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 80: 228-232.

10 Watanabe Y, Gould E, McEwen BS (1992) Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588: 341-345.

15 Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacol (Berl)* 93: 358-364.

Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA et al (2006). A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63: 856-864.

20 Zarate CA, et al. (2012) Replication of ketamine's antidepressant efficacy In bipolar depression: a controlled add-on trial. *Biol Psychiatry*. 71:939-946.

REIVINDICACIONES

1. Un modulador negativo de un receptor GABA_A, para su uso en un método para tratar o prevenir o mejorar al menos un síntoma de una afección médica en un individuo, comprendiendo el método la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador negativo de un receptor GABA_A, en donde la afección médica se selecciona del grupo que consiste en un trastorno relacionado con la depresión; tendencias suicidas; y una combinación de los mismos, en donde el modulador negativo del receptor GABA_A es un agonista inverso parcial de un receptor GABA_A que comprende una subunidad $\alpha 5$.
2. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el comienzo de la mejora de uno o más síntomas relacionados con la depresión se produce en horas, días o semanas.
3. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el trastorno relacionado con la depresión es el trastorno depresivo mayor (MDD); distimia; trastorno ciclotímico; trastorno afectivo estacional/depresión estacional; depresión después de una lesión cerebral traumática; depresión posparto; trastorno disfórico premenstrual; síntomas depresivos asociados con la menopausia; depresión después de abuso/abstinencia de sustancias; trastorno bipolar; trastorno bipolar en remisión; o episodios depresivos del trastorno bipolar.
4. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el individuo tiene un trastorno de la personalidad por evitación; trastorno antisocial de la personalidad; trastorno límite de la personalidad; trastorno de conducta; trastorno dependiente de la personalidad; trastorno depresivo de la personalidad; trastorno histriónico de la personalidad; trastorno narcisista de la personalidad; trastorno negativista de la personalidad; trastorno obsesivo-compulsivo de la personalidad; trastorno paranoide de la personalidad; trastorno esquizoide de la personalidad; o trastorno esquizotípico de la personalidad.
5. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el individuo ha sido diagnosticado con la afección médica.
6. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el individuo no ha sido diagnosticado con la afección médica.
7. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el agonista inverso parcial de un receptor GABA_A que comprende una subunidad $\alpha 5$ es L-655,708, RO4938581, CP-457,920, MRK-016, RG-1662, o una combinación de los mismos.
8. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el agonista inverso parcial es L-655,708.
9. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el agonista inverso parcial es RO4938581.
10. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el agonista inverso parcial es CP-457,920.
11. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el agonista inverso parcial es MRK-016.
12. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde la afección médica es un trastorno relacionado con la depresión.
13. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde la afección médica es tendencias suicidas.
14. Un modulador negativo de un receptor GABA_A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para su uso como se define en dicha reivindicación, comprendiendo además dicho método la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de otra terapia, en donde la otra terapia se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (SNRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), inhibidores de triple recaptación, moduladores de la función de la acetilcolina del SNC, estimulantes, antiglucocorticoides, antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, antidepresivos tricíclicos (TCA) y una combinación de los mismos.

15. Un modulador negativo de un receptor $GABA_A$ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para su uso como se define en dicha reivindicación, comprendiendo además dicho método la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de otra terapia, en donde la otra terapia es un antidepresivo.

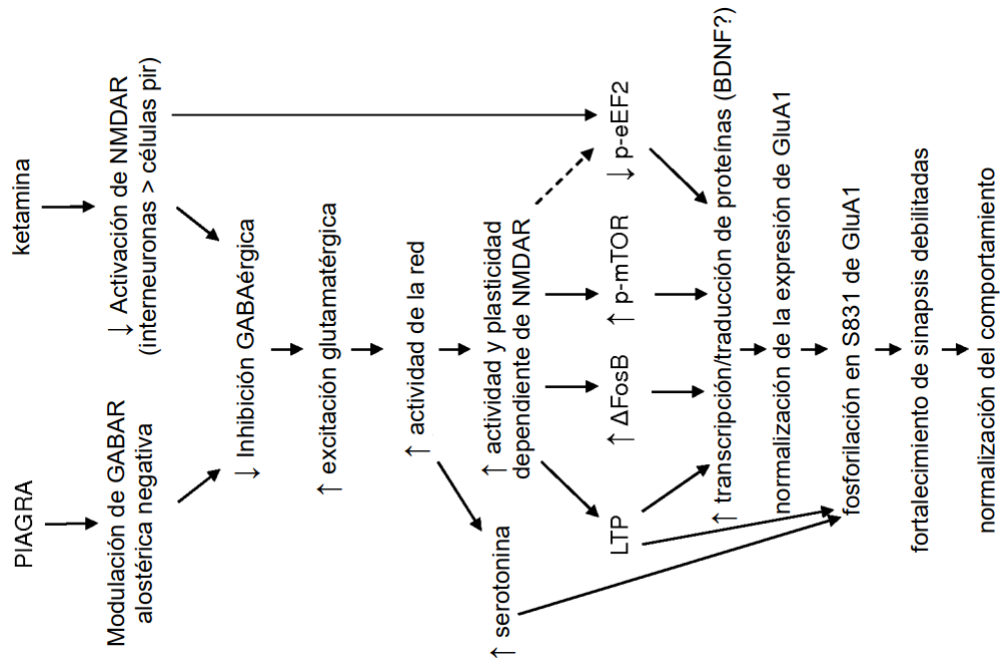


FIG. 1

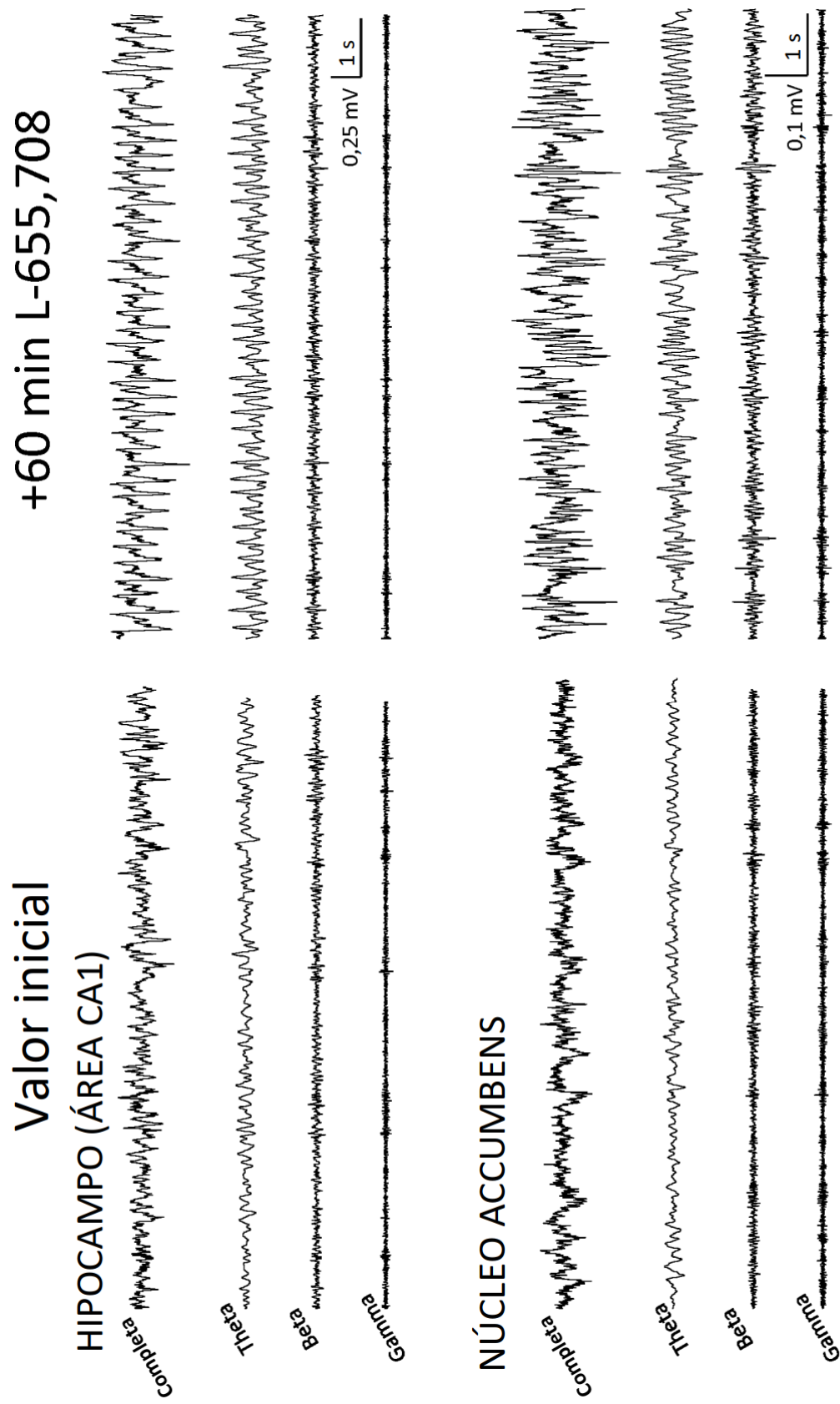


FIG. 2

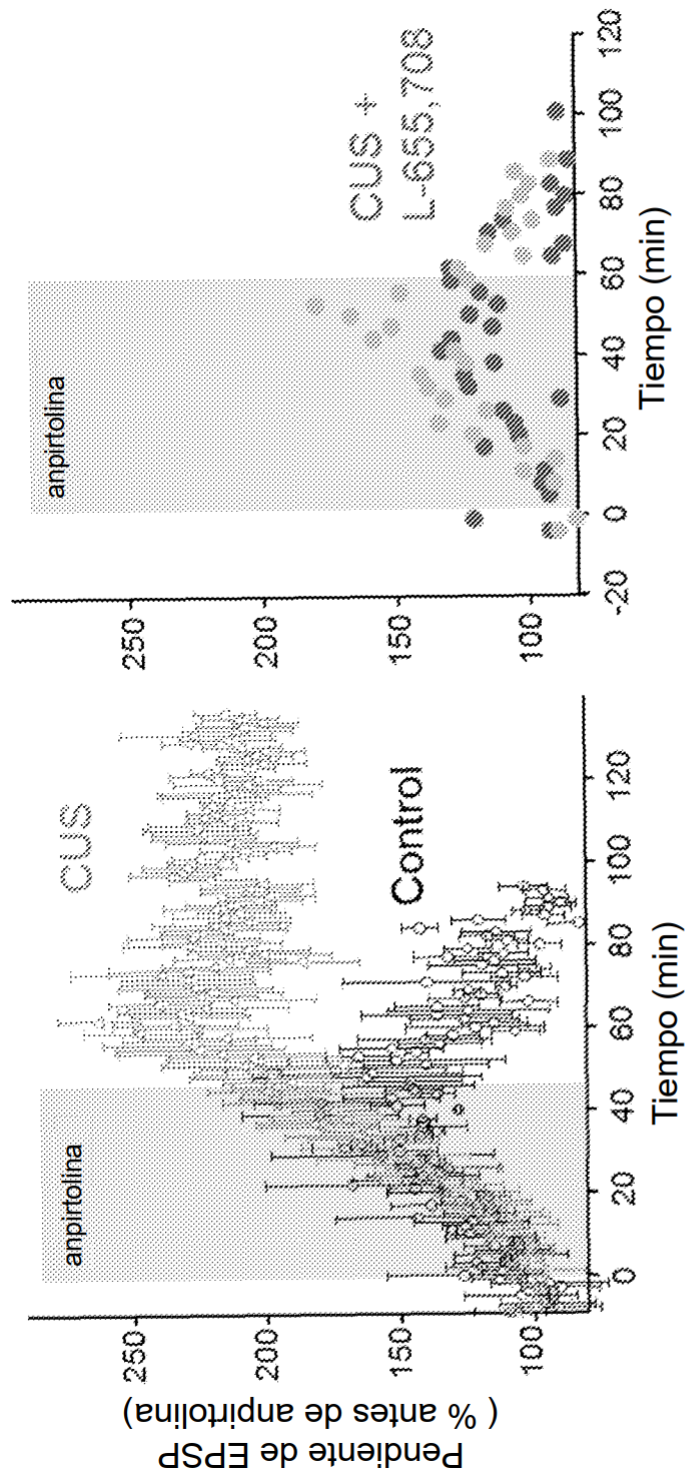


FIG. 3B

FIG. 3A

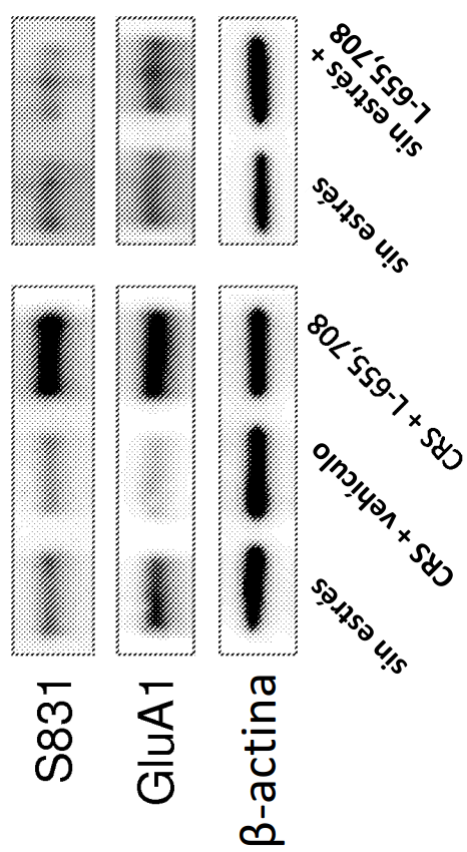


FIG. 4

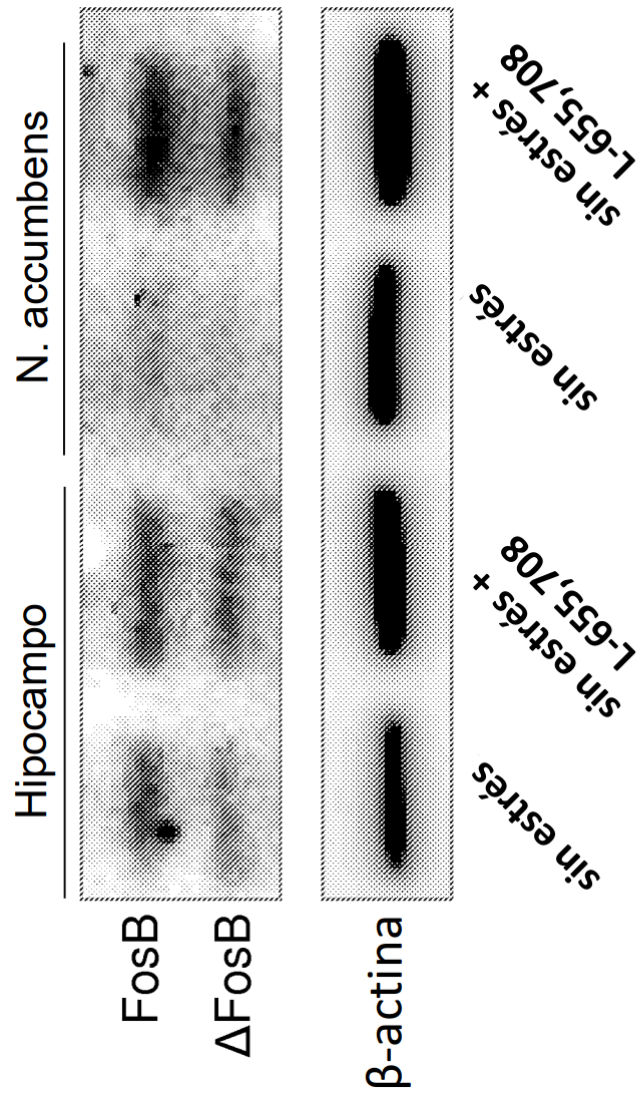
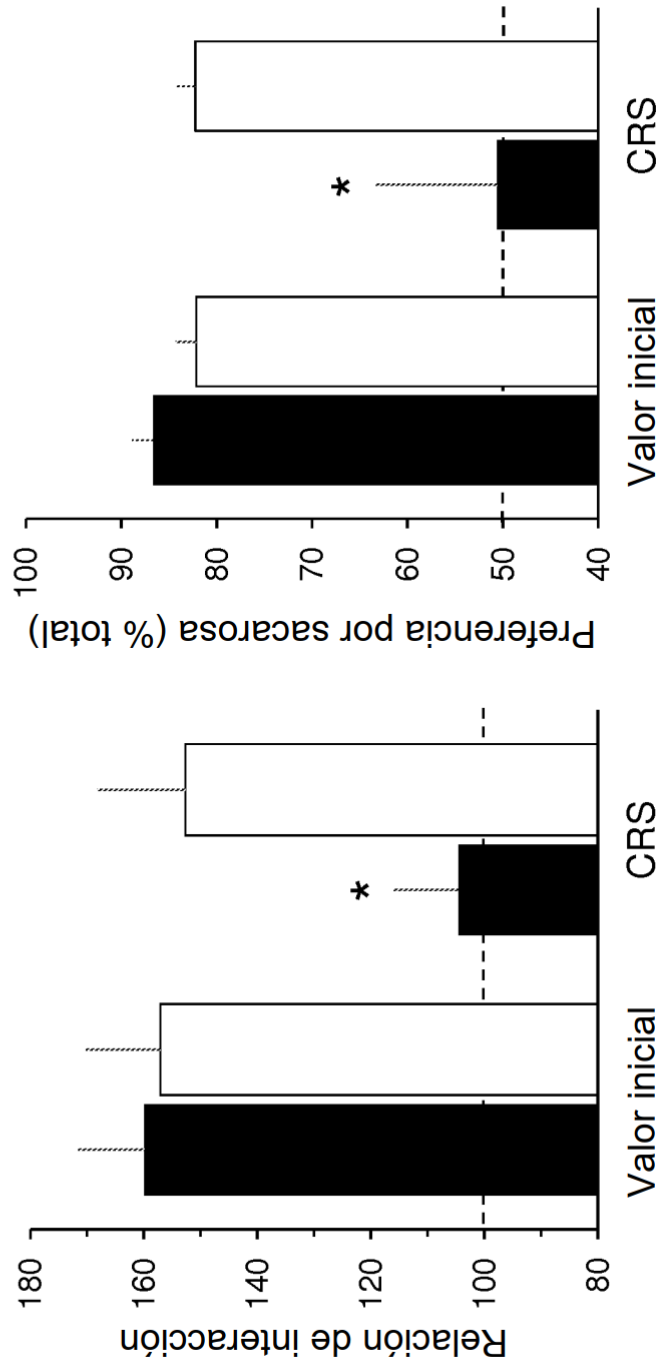
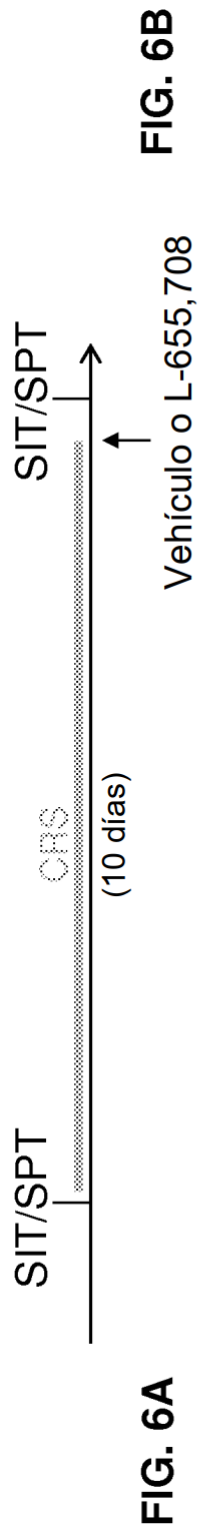


FIG. 5



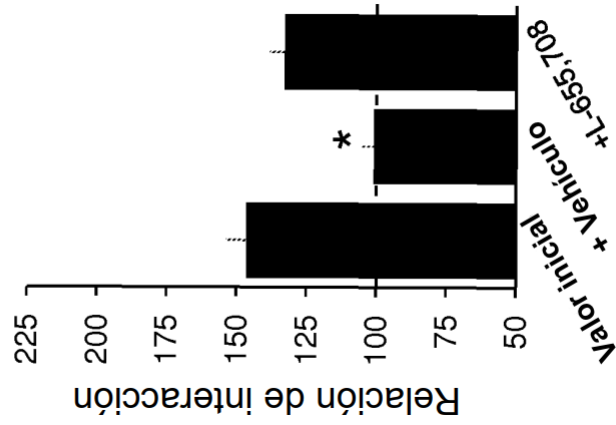


FIG. 7A

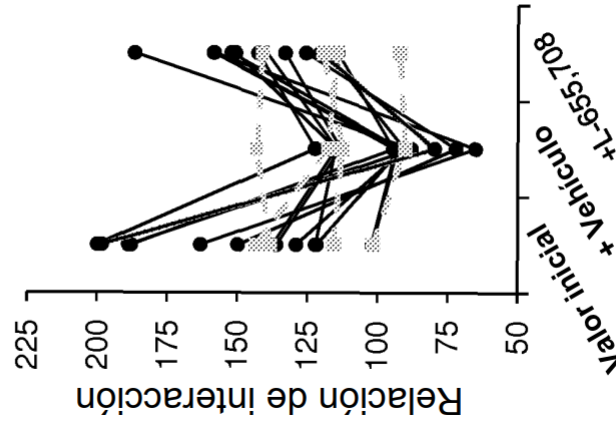


FIG. 7B

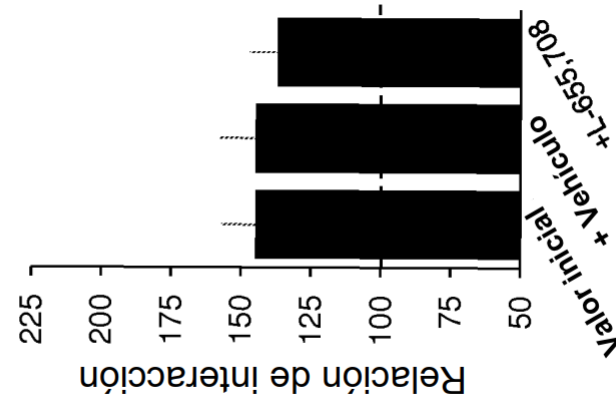


FIG. 7C

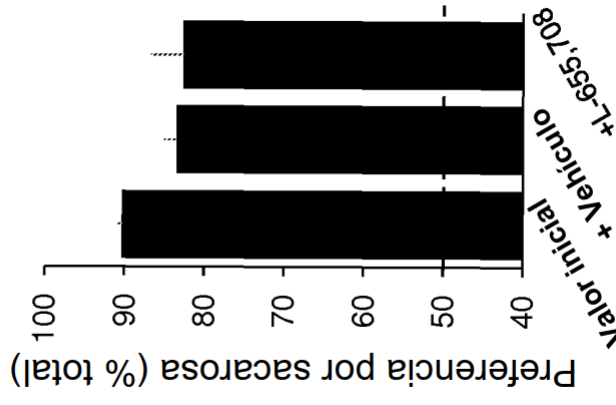


FIG. 7D

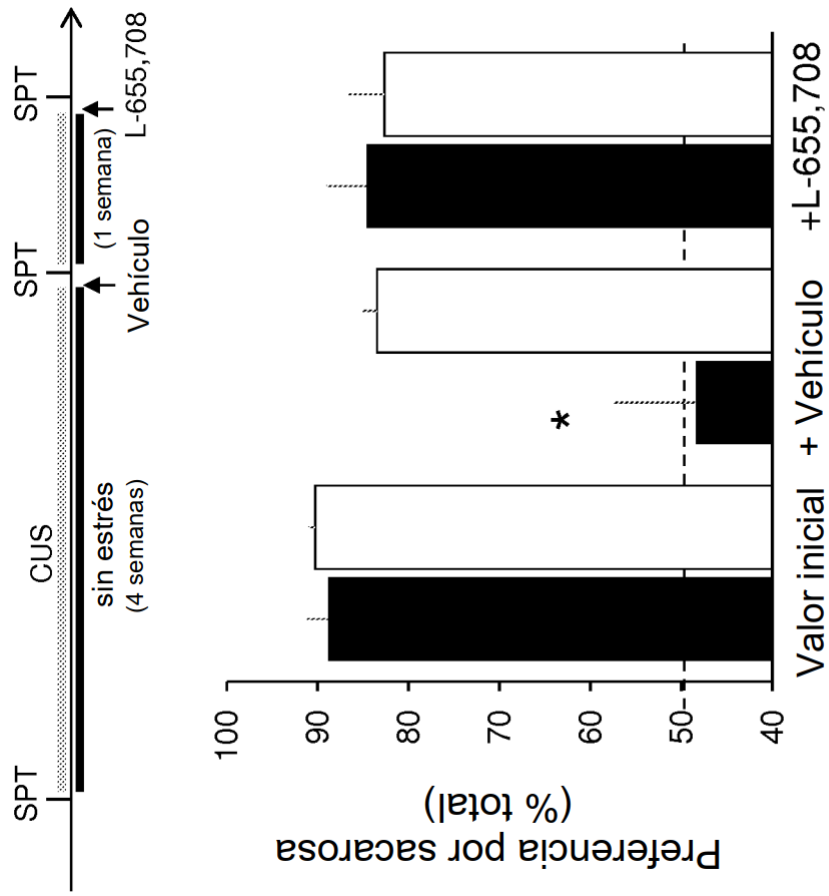


FIG. 8

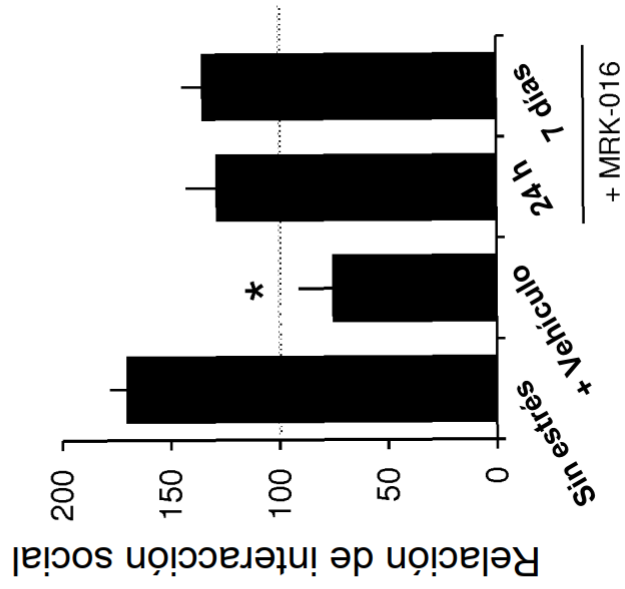
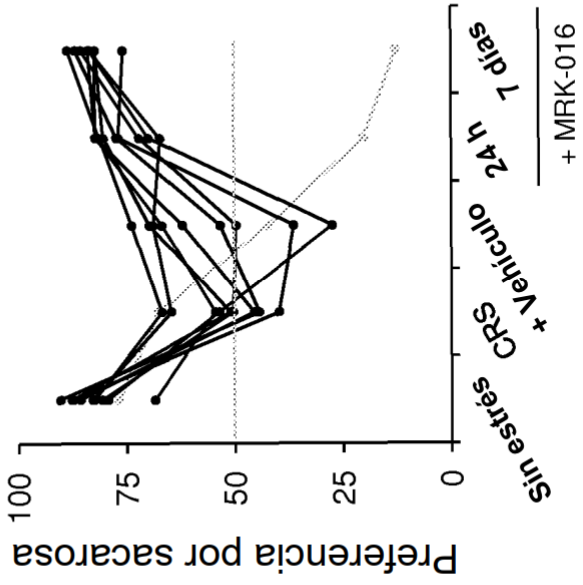
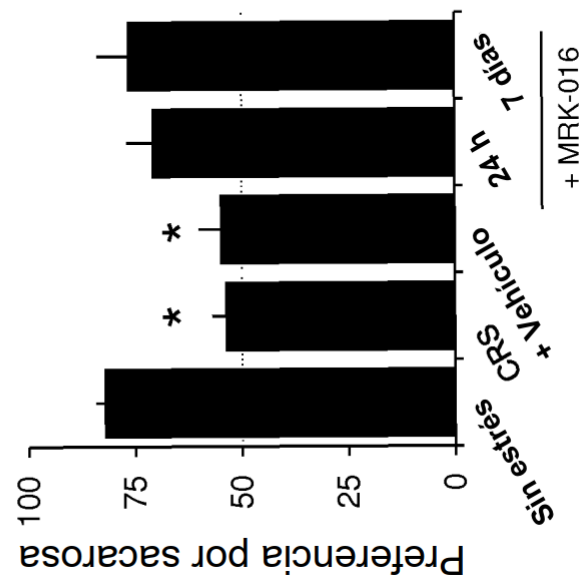
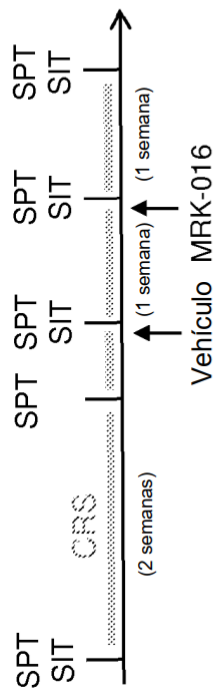
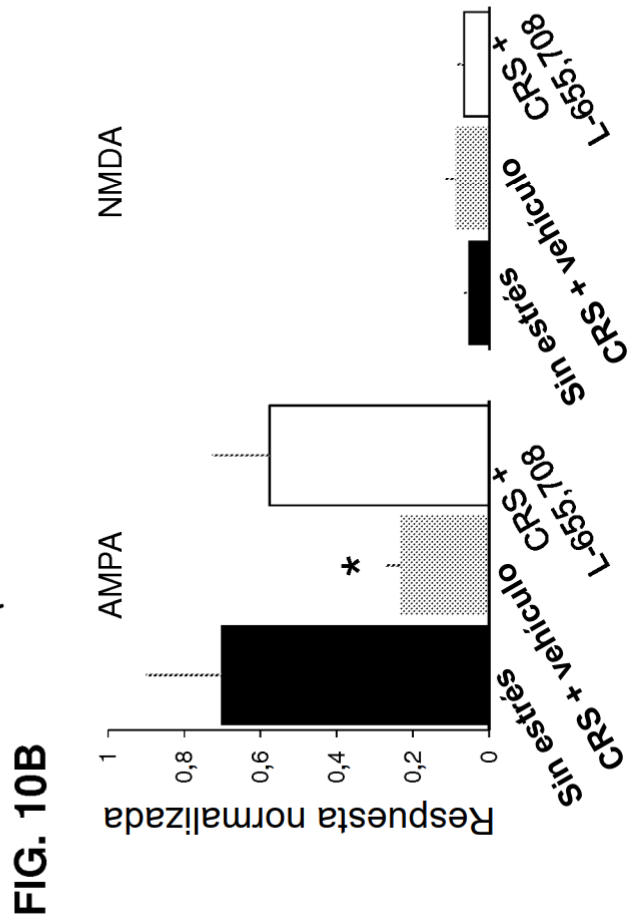
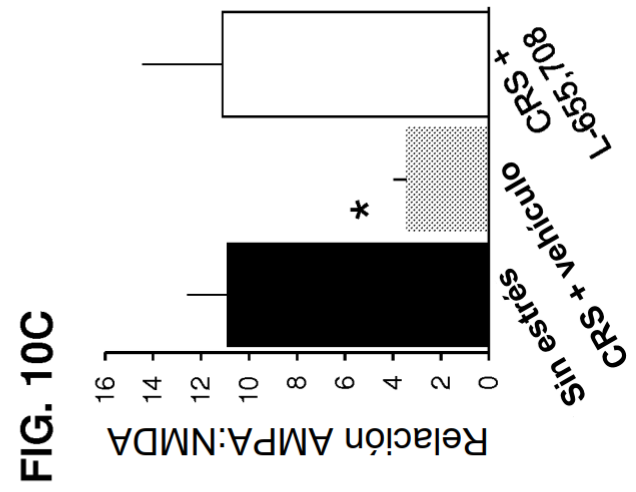
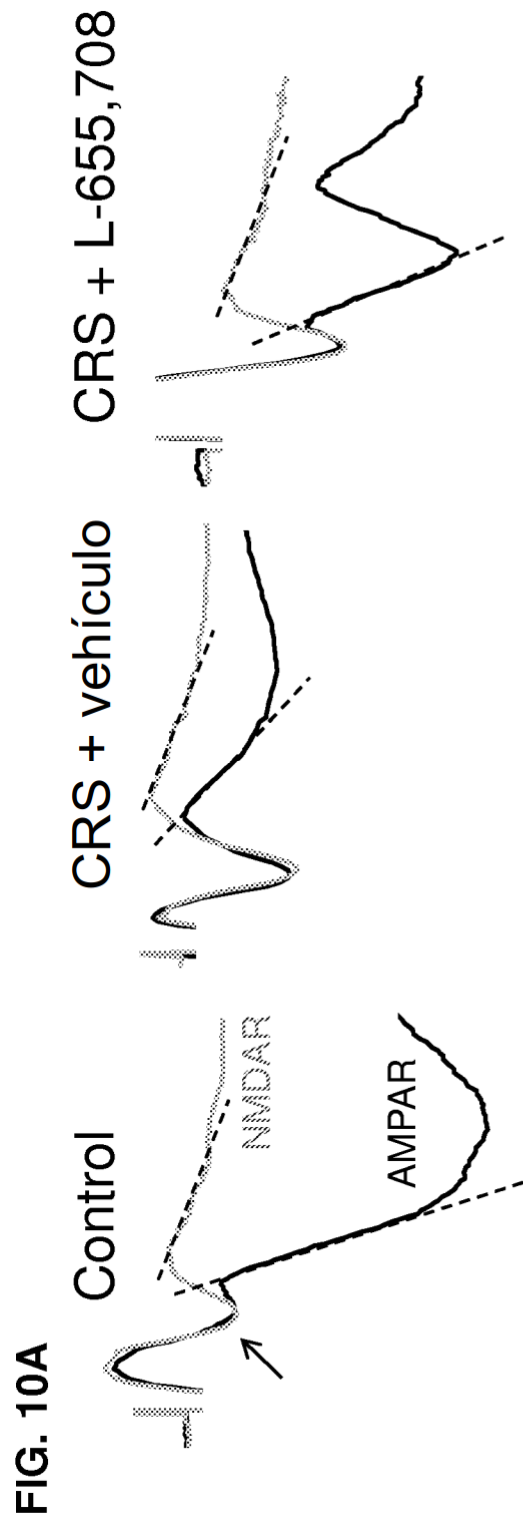


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C



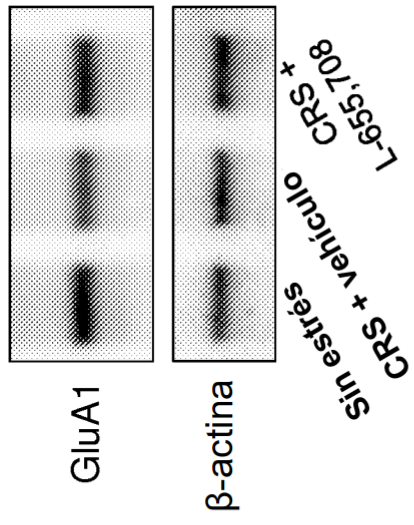


FIG. 11A

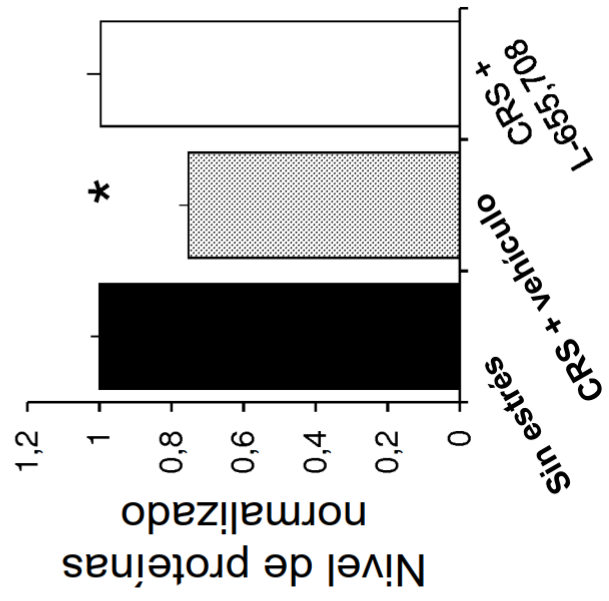


FIG. 11B

FIG. 12A

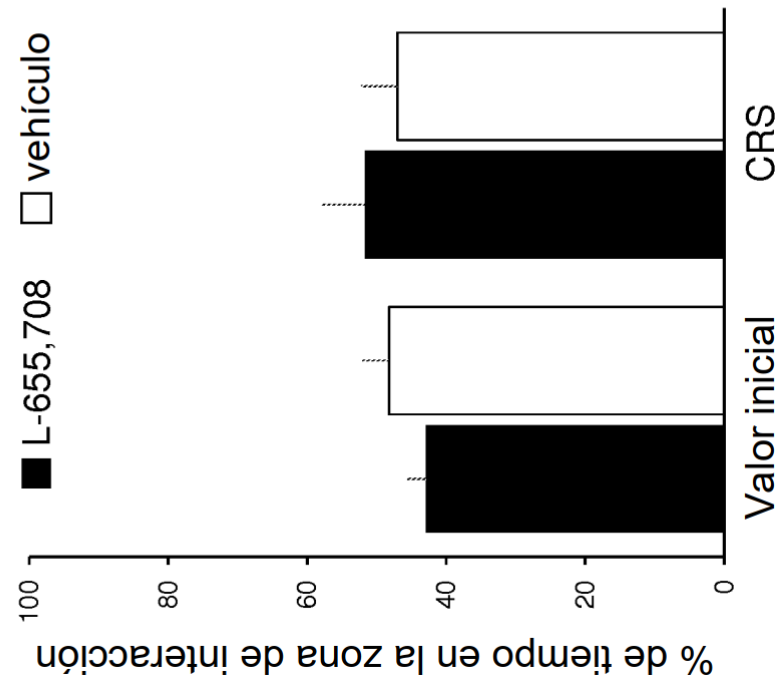


FIG. 12B

