



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO

UNIDAD COAPA

Departamento de Farmacobiología

Caracterización del efecto tipo antidepresivo del extracto acuoso de *Púnica granatum L.* en un modelo de menopausia en ratas Wistar

Tesis que presenta

Brenda Guadalupe Valdés Sustaita

Para Obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

En la Especialidad de

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de la Tesis:

Dra. Carolina López Rubalcava

Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena

Agradecimientos al CONACYT

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 17 del departamento de Farmacobiología del Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados (Cinvestav- Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Carolina López Rubalcava y en el laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” dirigido por la Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena. De antemano, se ofrece un destacado agradecimiento al CONACYT debido a que durante la realización de este trabajo se contó con su apoyo económico a través de la beca de doctorado número 337839.

Agradecimientos

Al Cinvestav-Unidad Coapa por el espacio y los recursos físicos y académicos.

A mis asesoras de tesis, Dra. Carolina López y Dra. Erika Estrada Camarena, muchas gracias por estos años de valiosa enseñanza y experiencia académica, por su apoyo, comprensión, compañerismo y muy buenos momentos.

A mi sínodo, Dr. Alonso Fernández Guasti, Dra. Gabriela Rodríguez, Dra. Eva González Trujano y Dra. Nelly Vega Rivera, les agradezco mucho por el tiempo invertido en enriquecer este proyecto con sus valiosas y críticas observaciones y aportaciones.

A Isabel Beltrán, por su apoyo y excelente trabajo, pero sobretodo, por la cálida compañía y amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 17, gracias por su compañerismo y apoyo, y por siempre procurar un increíble ambiente de trabajo.

A mis grandes amigas: Val Cohen, Helena Papacostas, Ale Hernández, Brenda Estrada, Silvia Cañaz

A mi familia, Mamá y papá, ustedes tienen mi mayor y más profundo agradecimiento, los amo. Carlos, gracias por estar siempre; Mari y Javier, mis segundos padres, gracias por su cariño y cobijo.

A Isabella, a Laia y a Javo, a quienes dedico el esfuerzo de este trabajo y de todos mis días, los amo mucho, gracias por esta felicidad.

ÍNDICE

Resumen.....	11
Abstract.....	12
Sección I	13
Introducción.....	13
Sección II	19
2. Marco teórico	19
2.1. Trastorno mental.....	19
2.2. Depresión	20
2.3.1. Factores genéticos y epigenéticos de los trastornos depresivos.....	23
2.4. Neurobiología de los trastornos depresivos	24
2.4.1. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión.....	26
2.4.1.1. Teoría monoaminérgica.....	26
2.4.1.1. Teorías GABAérgica y Glutamatérgica	29
2.4.2. Inflamación crónica (Teoría neuroinmune).....	30
2.4.3. Desregulación del eje HHA (Teoría neuroendócrina).....	32
2.4.4. Alteraciones en la expresión de BDNF (Teoría neurotrófica)	34
2.4.5. Alteración de la microbiota intestinal	35
2.5. Modelos animales para el estudio de los trastornos depresivos.....	37
2.5.1. La prueba de nado forzado.....	38
2.6. Tratamientos para los trastornos depresivos	39
2.6.1. Tratamientos farmacológicos.....	40
2.6.2. Tratamientos no farmacológicos.....	43
2.7. Prevalencia de la depresión en hombres y mujeres	44
2.8. Trastornos depresivos en la menopausia	46
2.8.1. Fluctuación estrogénica y desarrollo de trastornos depresivos.....	49

2.9. Modelos animales para el estudio de la menopausia	53
2.10. Tratamientos de los trastornos depresivos en la menopausia.....	55
2.11. Tratamientos alternativos para la depresión en la menopausia.....	56
2.12. El fruto de la granada como antidepresivo en la menopausia	57
Sección III	65
3.1. Justificación	65
3.2. Hipótesis	65
3.3. Objetivo general.....	65
3.3.1. Objetivos particulares	66
3.4. Materiales y métodos.....	67
3.5. Sujetos Experimentales	67
3.6. Fármacos.....	68
3.7. Procedimientos quirúrgicos	69
3.7.1. Ovariectomía (Modelo de menopausia).....	69
3.7.2. Cirugía estereotáxica.....	69
3.8. Pruebas conductuales	69
3.8.1. Prueba de nado forzado (Determinación del efecto tipo antidepresivo) ...	69
3.8.1.1. Registro conductual.....	70
3.8.2. Prueba de locomoción en campo abierto	70
3.9. Análisis estadístico	71
SECCIÓN IV	72
4. Diseño experimental y resultados.....	72
4.1. Objetivo 1. Determinar el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.72	
4.1.1. Resultados del objetivo 1.....	73

4.2. Objetivo 2: Comparar cuantitativamente el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía oral y por vía i.p. en la PNF.	75
4.2.1. Resultados del objetivo 2.....	76
4.3. Objetivo 3: Determinar la participación de los ERs en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.....	80
4.3.1. Resultados del objetivo 3.....	81
4.4. Evaluación del efecto tipo antidepresivo del EA-PG en esquema subcrónico	84
4.4.1. Resultados.....	84
4.5. Objetivo 4. Determinar la participación de ER α y ER β en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.....	86
4.5.1. Resultados del objetivo 4.....	87
4.6. Objetivo 5. Determinar el rol del sistema serotoninérgico en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG en la PNF.....	92
4.6.1. Resultados del objetivo 5.....	93
4.7. Objetivo 6. Determinar el efecto tipo antidepresivo de un extracto acuoso de granada de un cultivo local en la PNF	96
4.7.1. Resultados del objetivo 6.....	98
4.8. Objetivo 7. Analizar el efecto tipo antidepresivo de punicalagina y de ácido elágico como posibles metabolitos bioactivos del EA-PG, en la PNF.....	103
4.8.1. Resultados del objetivo 7.....	104
SECCIÓN V	107
5.1. Discusión.....	107
5.1.2. El EA-PG produce un efecto tipo antidepresivo por vía i.p. mayor que por la vía oral.....	107
5.1.2. El efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. está mediado por los ERs	113
5.1.3. El ER β participa en el efecto tipo antidepresivo el EA-PG	114

5.1.4. El sistema serotoninérgico está implicado en el efecto tipo antidepresivo del AE-PG	115
5.1.5. La punicalagina contribuye al efecto tipo antidepresivo del EA-PG	117
SECCIÓN VI	122
6.1. Conclusiones.....	122
6.2. Perspectivas.....	122
6.3. Referencias	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Sección I	13
Sección II	19
Figura 1. Desregulación emocional y control cognitivo en la depresión mayor.....	25
Figura 2. Circuito funcional de las neuronas monoaminérgicas.....	26
Figura 3. Filtración de mediadores inflamatorios a través de la barrera hematoencefálica (BHE) que sobreactivan a la microglía y a los astrocitos y generan daños estructurales y funcionales	32
Figura 4. Factores genéticos, epigenéticos, psicosociales y culturales que interactúan para dar lugar a mecanismos patofisiológicos que causan la expresión fenotípica de la depresión	36
Figura 5. Prueba de nado forzado. Tomada y modificada de Cryan et al., 2002 ..	39
Figura 6. Mecanismo de acción de los ISRS	42
Figura 7. Prevalencia a nivel mundial de los trastornos depresivos por región.....	45
48	
Figura 9. Estructura química de los estrógenos.....	49
Figura 10. Estructura proteica de los subtipos de ERs (α y β).....	51
Figura 11. Tractos reproductivos femeninos de humano y de roedor	53
Figura 12. Comparación de niveles hormonales en roedores y humanos durante la senescencia reproductiva	54
Figura 13. Clasificación general de los polifenoles	58
Figura 14. Mecanismos de acción antidepresiva de algunos polifenoles.....	59
Figura 15. Principales compuestos del fruto de la granada.	60
Figura 16. Metabolismo de la punicalagina en el TGI.	63
Sección III	65
Figura 17. Objetivos particulares.....	67
SECCIÓN IV	72

Figura 18. Esquema del diseño experimental del objetivo 1.	73
Figura 19. Efecto de la administración crónica del EA-PG (0.1, 1 y 10 mg/kg; i.p.) en la PNF	74
Figura 20. Esquema del diseño experimental del objetivo 2.	76
Figura 21. Efecto de la administración crónica del EA-PG (0.1, 1 y 10 mg/kg) por vía oral y por vía i.p. en la PNF	77
Figura 22. Porcentaje de cambio de las conductas de inmovilidad y de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p. (1 y 10 mg/kg) en la PNF	80
Figura 23. Esquema del diseño experimental del objetivo 3.	81
Figura 24. Efecto de la administración crónica de Tmx (14 mg/kg; s.c.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) en la PNF	82
Figura 25. Esquema del diseño experimental del experimento para evaluar el EA-PG en esquema subcrónico.	84
Figura 26. Efecto de la administración subcrónica del EA-PG (1mg/kg) por vía i.p. en la PNF	85
Figura 28. Efecto de la administración subcrónica de TPBM (50 µg/kg; s.c.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) (Panel A) y de PHTPP (25 µg/kg; s.c.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) (Panel B) en la PNF	89
Figura 33. Análisis cromatográfico por UPLC del: EA-PG (Panel A), Extracto Inicial (Panel B) y Extracto Final (Panel C)	100
Figura 34. Análisis cromatográfico por UPLC de: Extracto Inicial (Panel A), Punicalagina (Panel B), Ácido elágico (Panel C) y Extracto Final (Panel D).....	101
Figura 35. Efecto de la administración crónica del Extracto Final en la PNF	102
Figura 36. Diseño experimental de la determinación del efecto tipo antidepresivo del Extracto final de la fracción acuosa del extracto de granada del cultivo local.	103
Figura 37. Efecto de la administración crónica de ácido elágico en la PNF.....	104
Figura 38. Efecto de la administración crónica de punicalagina en la PNF.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

Sección I	13
Sección II	19
Tabla 1. Clasificación de los Trastornos Depresivos y sus características principales de acuerdo con el DSM-V.	20
Tabla 2. Criterios de validación de los modelos animales de trastornos psiquiátricos.....	37
Tabla 3. Distribución de los ERs en el SNC.	52
Tabla 4. Polifenoles de la granada con actividad estrogénica.	62
Sección III	65
SECCIÓN IV	72
Tabla 5. Efecto de la administración crónica del EA-PG por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.	74
Tabla 6. ANOVA de dos vías del número de cuentas de la conducta de inmovilidad de los grupos Vía oral y Vía i.p.	77
Tabla 7. ANOVA de dos vías del número de cuentas de la conducta de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p.	77
Tabla 8. Efecto de la administración crónica del EA-PG por vía oral y por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.	78
Tabla 9. Porcentaje de cambio y valor de p (Tukey posthoc) de las conductas de inmovilidad y de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p. en la PNF.	79
Tabla 10. ANOVA de dos vías del porcentaje de cambio de las conductas de inmovilidad y de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p.	79
Tabla 11. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista ERs (Tmx) y con el EA-PG en la PNF.	83
Tabla 12. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista a ERs (Tmx) y con el EA-PG en la prueba de locomoción en campo abierto.	83

Tabla 13. Efecto de la administración crónica del EA-PG por vía i.p. en esquema subcrónico en la prueba de locomoción en campo abierto.	85
Tabla 14. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista ERa y con el EA-PG en la PNF.	90
Tabla 15. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista ERb y con el EA-PG en la PNF.	91
Tabla 16. ANOVA de dos vías del tratamiento con los antagonistas a ER (ERa y ERb) y con el EA-PG en la prueba de locomoción en campo abierto.	91
Tabla 17. ANOVA de dos vías del tratamiento con la neurotoxina 5,7 DHT y con el EA-PG en la PNF.	95
Tabla 19. Efecto de la administración crónica del Extracto Final por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.	102
Tabla 20. Efecto de la administración crónica de ácido elágico por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.	105
Tabla 21. Efecto de la administración crónica de punicalagina por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.	106
SECCIÓN V	107
Tabla 22. Estudios preclínicos del efecto tipo antidepresivo asociado a la acción de extractos y compuestos aislados de plantas administrados por vía i.p.	109

RESUMEN

En un estudio preliminar, el extracto acuoso de *Punica granatum* (EA-PG) demostró inducir un efecto tipo antidepresivo a través de los receptores a estrógenos (ERs) en ratas ovariectomizadas (OVX), lo cual sugiere su potencial como tratamiento para la depresión en la menopausia. Sin embargo, se requiere mayor evidencia acerca de su mecanismo de acción, como posibles blancos terapéuticos, para identificar compuestos activos y/o determinar las condiciones en las que podría utilizarse como tratamiento. El objetivo de este proyecto fue corroborar los efectos antidepresivos del EA-PG, identificar al menos un metabolito bioactivo y un posible mecanismo de acción en un modelo animal de menopausia. Para ello, ratas hembra Wistar OVX se utilizaron en la prueba de nado forzado (PNF) para evaluar el efecto tipo antidepresivo de compuestos del EA-PG asociados con los ERs. Primeramente, el efecto del EA-PG (1 y 10 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) se evaluó en un esquema crónico (14 días: 1 admón. /día) en comparación con la vía oral, y en presencia del antagonista a ERs, tamoxifen (EA-PG: 1 mg/kg; i.p. Tmx:15 mg/kg; s.c.). Además, el efecto del EA-PG (1 mg/kg; i.p.) se evaluó en esquema subcrónico (3 admon. /24 hrs.) en presencia de los antagonistas selectivos a ER α (TPBM: 50 μ g/rata; s.c.) y a ER β (PHTPP: 25 μ g/rata; s.c.) y de la neurotoxina 5,7-DHT (200 μ g/rat; i.c.v.). Adicionalmente, un extracto de granada de cultivo local se obtuvo mediante extracciones con los solventes orgánicos: hexano/diclorometano, para aislar e identificar metabolitos bioactivos. Tanto el extracto (0.01 y 0.1 mg/kg) como los compuestos puros, punicalagina (0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/kg; i.p.) y ácido elágico (0.01, 0.1, 1 y 10 mg/kg; i.p.), se analizaron por la técnica de UPLC y se evaluó su efecto en la PNF. Los resultados mostraron que el EA-PG indujo efecto tipo antidepresivo en esquema crónico por la vía i.p., el cual fue significativamente mayor en comparación con la vía oral. Además, la administración subcrónica de EA-PG indujo efecto tipo antidepresivo, el cual fue bloqueado por el PHTPP y por la neurotoxina 5,7-DHT. Por otro lado, el extracto de cultivo local presentó contenido de ácido elágico, pero no de punicalagina y no produjo efecto significativo a las dosis probadas en la PNF. No obstante, la administración individual de punicalagina, pero no de ácido elágico, indujo un efecto tipo antidepresivo sugiriendo que su ausencia podría explicar la falta de efecto del extracto local. Ningún tratamiento afectó la locomoción de los animales. En conclusión, el EA-PG produce efecto tipo antidepresivo en los esquemas crónico y subcrónico, donde participan el ER β y el

sistema serotoninérgico para producirlas. La punicalagina fue parcialmente responsable del efecto tipo antidepresivo observado en la PNF con ratas OVX.

ABSTRACT

Recently, an aqueous extract of *Punica Granatum* (AE-PG) showed an antidepressant-like effect mediated by estrogen receptors (ERs) in ovariectomized rats (OVX), suggesting its therapeutic potential in menopause-related depression. Nevertheless, more evidence about its mechanism of action is required to identify bioactive compounds and/or possible therapeutic targets and determine the conditions in which it could be used as a depression treatment. This study was aimed to characterize the mechanism of action of the antidepressant-like action of the AE-PG in an animal model of menopause. For this, the antidepressant-like effect of the AE-PG in different conditions was analyzed in female Wistar OVX rats using the Forced Swimming Test (FST). Firstly, the effect of the AE-PG (1 and 10 mg/kg) administered by the intraperitoneal route (i.p.) in comparison with the oral route was analyzed following a chronic scheme (14 days: 1 admin. /day), and in the presence of the non-selective estrogen receptor antagonist, tamoxifen (EA-PG: 1 mg/kg; i.p. Tmx:15 mg/kg; s.c.). Moreover, the effect of the AE-PG (1 mg/kg; i.p.) was analyzed following a subchronic scheme (3 admin. /24 hrs.), in the presence of specific ER-subtype antagonists (ER α y ER β) (TPBM: 50 μ g/rat; s.c./PHTPP: 25 μ g/rat; s.c.) and after treatment with the neurotoxin 5,7-DHT (200 μ g/rat; i.c.v.). Additionally, a locally grown pomegranate extract was obtained, which was analyzed by UPLC and evaluated in the FST (.01 y 0.1 mg/kg). Finally, the antidepressant-like effect of punicalagin (0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/kg; i.p.) and ellagic acid (0.01, 0.1, 1 y 10 mg/kg; i.p.) was evaluated individually in a chronic scheme. Results showed that AE-PG induced an antidepressant-like effect in a chronic scheme by the i.p. route, which was significantly greater than by the oral route. Also, the AE-PG induced an antidepressant-like effect in a subchronic scheme, which was blocked by PHTPP and by treatment with the neurotoxin 5,7-DHT. On the other side, the pomegranate extract (local cultivation) was found to contain ellagic acid but not punicalagin and did not produce relevant effects in the FST. Finally, the individual administration of punicalagin, but not ellagic acid, induced antidepressant-like effects. No treatment affected the animals' locomotion. In conclusion, the AE-PG induces antidepressant-like actions with both chronic and subchronic schemes and requires the participation of the ER β and the serotonergic system to produce these actions. Punicalagin exerts antidepressant-like effects in the FST in OVX rats.

SECCIÓN I

INTRODUCCIÓN

La depresión es un trastorno mental que se caracteriza por la presencia de tristeza, sensación de vacío, irritabilidad, incapacidad para disfrutar actividades que antes eran placenteras (anhedonia), que está acompañado de cambios somáticos, cognitivos y psicológicos que empobrecen la calidad de vida del individuo (DSM V, 2013). En su forma más severa puede conducir al suicidio (Berenzon et al., 2013). Es una enfermedad psiquiátrica multifactorial, y en su desarrollo intervienen factores genéticos, biológicos, psicológicos y sociales (Gressier et al., 2014). Con relación a su etiología, varias teorías han establecido la participación de mecanismos fisiopatológicos que incluyen: alteraciones en la neurotransmisión, desregulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), estrés crónico, procesos inflamatorios, disminución de la neuroplasticidad y disfunción en la red neuronal (cognitivo-emocional) (Dean y Keshavan, 2017). Los tratamientos farmacológicos más utilizados se enfocan principalmente en el restablecimiento de los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica (serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico). En particular, la disfunción del sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central es considerado el principal riesgo neurobiológico para el desarrollo de la depresión, y por ello, el principal blanco terapéutico (Nestler et al., 2002; Willner et al., 2013). La serotonina (5-HT) es una monoamina que funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC) y como hormona en el sistema gastrointestinal, e interviene en la regulación de procesos como procesamiento sensorial, control cognitivo, la conducta sexual, el control autonómico, de la actividad locomotriz y la regulación del estado de ánimo (Dean & Keshavan, 2017) . De acuerdo con la teoría monoaminérgica de la depresión, una disminución en los niveles de 5-HT, noradrenalina (NA) y dopamina (DA) en el sistema límbico puede promover la aparición de síntomas depresivos; en este caso, los ISRS inducen que la 5-HT permanezca más tiempo disponible para ejercer su acción. De hecho, los fármacos antidepresivos más prescritos son los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS); de éstos, fluoxetina, sertralina y citalopram son los más utilizados (Luo et al., 2020). La

investigación en busca de nuevos tratamientos farmacológicos es de suma importancia con la finalidad de encontrar terapias más eficaces y seguras. En este sentido, el uso de modelos animales ha sido de gran utilidad en el proceso de identificación de moléculas con utilidad terapéutica y sus posibles mecanismos de acción antidepressivos (Razafsha et al., 2013)

Se estima que alrededor de 322 millones de personas (4.4% de la población mundial) padecen depresión, siendo la región del Pacífico occidental (27%) y la región del sudeste de Asia (21%) las regiones con mayor prevalencia (WHO, 2017). La depresión se presenta de dos a tres veces más frecuentemente en mujeres (5.1%) que en hombres (3.6%) (WHO, 2017). Algunos grupos de investigación sugieren que las fluctuaciones de las hormonas gonadales en las mujeres están relacionadas con esta diferencia de prevalencia (Borrow and Cameron, 2014; Deecher et al., 2008; Kessler et al., 1993). En particular, la fluctuación hormonal en la perimenopausia (transición a la menopausia) y la disminución de estrógenos y progesterona en la menopausia (cese de la menstruación por disfunción ovárica) representan los periodos de mayor vulnerabilidad para desarrollar trastornos depresivos (Berent-Spillson et al., 2017; Borkoles et al., 2015; Borrow y Cameron, 2014b; Deecher et al., 2008; Duval et al., 2010; Freeman et al., 2004). Esto debido a que los estrógenos participan en muchos procesos en el SNC, incluyendo una potente función reguladora del estado de ánimo (Douma et al., 2005).

Los estrógenos son moléculas esteroideas que intervienen en la regulación de varios procesos fisiológicos y celulares como son el metabolismo, la activación y regulación del sistema reproductor y la modulación del sistema óseo, del sistema cardiovascular y del SNC. Los estrógenos llevan a cabo sus acciones a través de la activación de receptores a estrógenos nucleares (ERs) y de receptores a estrógenos membranales (GPR30 y mER α) (Hewitt et al., 2016). Con relación a los ERs, hasta el momento se conocen dos subtipos: ER α y ER β , los cuales comparten un alto grado de homología en su estructura, aunque pueden tener ligandos con distinta afinidad porque presentan diferencias importantes en la región de unión a ligando (Krolick et al., 2018). En este sentido, el ER α y el ER β producen efectos fisiológicos distintos, e incluso opuestos, dependiendo del tejido donde se expresen (Dahlman-Wright et al.,

2006; Heldring et al., 2007). El ER α tiene una mayor densidad de expresión en ovarios, útero, glándula mamaria, riñón, hueso, tejido adiposo e hígado (Paterni et al., 2014) y se ha asociado principalmente a procesos de proliferación celular, al control del apetito y a la regulación de la función reproductiva y cardiovascular. Por otro lado, el ER β se expresa mayormente en pulmón, tracto gastrointestinal, células hematopoyéticas, células inmunes y en el SNC (Paterni et al., 2014), y se ha asociado principalmente a la regulación del sistema inmune y a la regulación de procesos de aprendizaje, memoria y del estado de ánimo (Horst, 2010; Vargas et al., 2016). La fluctuación estrogénica durante la transición a la menopausia está relacionada con cambios importantes en el SNC, particularmente en el sistema serotoninérgico; esto debido a que existe una relación muy estrecha entre la activación del ER β y el sistema serotoninérgico (Suzuki et al., 2013)

Los tratamientos de primera línea para la depresión en la menopausia consisten principalmente en ISRS y en inhibidores de la recaptura de serotonina y de noradrenalina (ISRN) o antidepresivos duales. Durante esta etapa de vida, los antidepresivos que mas efectivos son paroxetina, citalopram, escitalopram y los antidepresivos duales venlafaxina y desvenlafaxina. De acuerdo a estudios clínicos, la paroxetina, el citalopram y el escitalopram son los que producen menos efectos adversos, y el citalopram el que menos interacción farmacológica con otros medicamentos prescritos para otros padecimientos médicos aunados a la edad durante la menopausia (Handley y Williams, 2015). Por otra parte, debido al papel tan importante que tienen los estrógenos en la regulación del estado de ánimo durante la vida reproductiva, la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos (TRE) es una estrategia ampliamente utilizada, ya que ha resultado eficaz para disminuir los síntomas de depresión hasta en un 76% (Ancelin et al., 2007; Beyer et al., 2018; Soares et al., 2001; Worsley et al., 2012). Finalmente, el uso concomitante de antidepresivos ISRS y de TRE es una estrategia terapéutica efectiva para potenciar el efecto de los ISRS en mujeres que no responden al tratamiento con antidepresivos solos (Soares, 2013).

El mecanismo de acción antidepresiva de los compuestos estrogénicos es complejo. Diversos estudios han sugerido que se debe principalmente a la interacción

entre los ERs y los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos, en particular con el sistema serotoninérgico (Bethea et al., 2002; Borrow y Cameron, 2014a; Di Paolo et al., 1983; Estrada-Camarena et al., 2006; 2004), el cual sigue siendo uno de los principales objetivos de las acciones terapéuticas en el tratamiento de la depresión (Beyer et al., 2018). Por otro lado, de acuerdo con estudios preclínicos, la regulación estrogénica del estado de ánimo se ha asociado principalmente a la activación del ER β (Chhibber et al., 2017; Suzuki et al., 2013; Walf et al., 2004; Walf y Frye, 2007; Yang et al., 2014).

Es importante mencionar que las opciones farmacológicas para el tratamiento de la depresión en la menopausia si bien producen cierta eficacia, éstas presentan desventajas importantes. Por un lado, los ISRS frecuentemente producen interacciones farmacológicas con medicamentos prescritos para el tratamiento de otros padecimientos médicos asociados a la edad durante la menopausia (Handley y Williams, 2015). Además, existe una población significativa que no responde al tratamiento con ISRS durante la menopausia (Pinto-Meza et al., 2006). Por otro lado, el uso de la TRE ha sido sumamente controversial debido a los riesgos que conlleva. Actualmente la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos y el Colegio Americano de Endocrinología (ACCE/ACE) respalda las advertencias emitidas por la Iniciativa de Salud de la Mujer (WHI) y por otros estudios clínicos controlados aleatorizados respecto al aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer (endometrial y mamario) y de enfermedades cardiovasculares como infarto o tromboembolismo venoso (principalmente durante la postmenopausia y/o al ser utilizado por un periodo mayor a 5 años) (Crandall et al., 2017). Por consiguiente, el uso de tratamientos alternativos ha incrementado considerablemente, y con ello, la necesidad de determinar cómo funcionan y las condiciones adecuadas para su administración.

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos de origen vegetal que han sido de especial interés debido a su efecto atenuante de los síntomas asociados a la menopausia (Davinelli et al., 2017; Hirose et al., 2016). Éstos se obtienen de alimentos como uvas, cítricos, brócoli, granada, moras, tomate, manzana, leguminosas y vino tinto, entre otros; la fuente de fitoestrógenos más conocida es la soya y sus derivados (Patisaul y Jefferson, 2010). La principal característica de estos compuestos es que

presentan una estructura química similar al estradiol y, por lo mismo, presentan acción estrogénica y antiestrogénica por su capacidad de interactuar con los diferentes tipos de receptores a estrógenos (ERs), tanto nucleares (ER α , y ER β) como membranales (mER α , GPR30) (Cederroth y Nef, 2009; Clark et al., 2012; Moreira et al., 2014). Es por esto que los fitoestrógenos son denominados moduladores selectivos de los receptores a estrógenos (SERMs), sus efectos son dependientes de factores como la concentración, la densidad de ERs en el tejido, el estado de los receptores y la presencia o ausencia de estradiol endógeno (Moreira et al., 2014b; Setchell et al., 2003; Sun et al., 2012). No obstante, a diferencia de los estrógenos que se unen y activan a ambos ERs, los fitoestrógenos tienen mayor afinidad por el ER β (Kostelac et al., 2003; Kuiper et al., 1997; Manas et al., 2004; Zand et al., 2000; Zava et al., 1997a), lo cual representa una alternativa más segura que la TRE al reducir significativamente los efectos secundarios relacionados con la activación de ER α como la proliferación celular. Los fitoestrógenos han sido utilizados principalmente para tratar síntomas vasomotores relacionados con la menopausia como las olas de calor y la sudoración (Lethaby et al., 2013). Se ha determinado que algunos fitoestrógenos como las isoflavonas tienen acción en el SNC mejorando la función cognitiva, confiriendo protección ante enfermedades neurodegenerativas y, de interés para este proyecto, produciendo efectos antidepresivos (Kawabata et al., 2015).

Los fitoestrógenos se pueden encontrar en muchas fuentes vegetales, sin embargo, el fruto de granada (*Punica granatum L.*) ha sido de particular interés ya que, además de un alto valor nutricional, este fruto produce varios efectos terapéuticos que se han asociado con su alto contenido de polifenoles, muchos de ellos con actividad estrogénica (Choi et al., 2006; Dellafiora et al., 2013; Papoutsi et al., 2005; Schmitt y Stopper, 2001; Sreeja et al., 2012; van Elswijk et al., 2004) y con actividad antidepresiva (Pathak et al., 2013). El fruto de la granada contiene principalmente polifenoles como elagitaninos (compuestos más abundantes), flavonoides (antocianinas, flavonoles, catequinas, isoflavonas), esteroides, ácidos grasos y ácidos fenólicos (Wu y Tian, 2017). En particular, al ser ingeridos, los elagitaninos como la punicalagina (α y β) son, en su mayoría, hidrolizados a ácido elágico (AE) por el pH estomacal y, posteriormente, biotransformados a moléculas activas llamadas urolitinas por la microbiota intestinal (Gaya et al., 2016; Landete, 2011; Seeram et al., 2007,

2004). Las urolitinas son moléculas con mucho significado biológico (Espín et al., 2013) y, de acuerdo con estudios *in vitro*, las urolitinas pueden ejercer acciones en el SNC (Yuan et al., 2016) y acciones estrogénicas y antiestrogénicas (Larrosa et al., 2006).

El fruto de la granada es considerado un alimento funcional y, desde tiempos antiguos, todas sus partes han sido utilizadas con fines terapéuticos (Ismail et al., 2012). Actualmente se sabe que la granada tiene propiedades antioxidantes (Zhang et al., 2011), antiinflamatorias, antitumorígenicas, antimicrobianas (Lipińska et al., 2014) y de protección contra la obesidad y la diabetes (Al-Muammar y Khan, 2012). En experimentos previos, se demostró que un extracto acuoso de granada (EA-PG) administrado por vía oral indujo un efecto tipo antidepresivo mediado por ERs en ratas jóvenes OVX, lo que sugiere su potencial para funcionar como alternativa en el tratamiento de la depresión en la menopausia (Valdés-Sustaita et al., 2017). Sin embargo, evidencia acerca de sus metabolitos bioactivos y su mecanismo de acción se requiere para comprender sus posibles ventajas sobre los tratamientos tradicionales como fitoestrógenos. Por lo tanto, este trabajo se enfocó en continuar con la caracterización del efecto tipo antidepresivo del EA-PG en ratas OVX analizando, por un lado, los posibles metabolitos bioactivos en el efecto tipo antidepresivo de EA-PG como punicalagina y ácido elágico y el posible mecanismo de acción utilizando herramientas farmacológicas en la PNF como una herramienta de exploración farmacológica para identificar efectos similares a aquellos producidos por los antidepresivos clásicos (efecto tipo antidepresivo) en ratas hembra jóvenes de la cepa Wistar, las cuales fueron OVX y utilizadas como modelo de menopausia. Cabe señalar que la ovariectomía es uno de los procedimientos quirúrgicos más empleados en la investigación preclínica para simular en condiciones de privación de hormonas gonadales (Koebele y Bimonte-Nelson, 2016a).

SECCIÓN II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Trastorno mental

De acuerdo con la 5ta Edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM V), un trastorno mental se define como:

“Un síndrome caracterizado por una alteración clínicamente significativa en la cognición, la regulación de las emociones o el comportamiento de un individuo que refleja una disfunción en los procesos psicológicos, biológicos o de desarrollo subyacentes al funcionamiento mental”.

Existen situaciones en las que un individuo puede sentirse física, mental y emocionalmente afectado pero que no necesariamente se consideran un trastorno mental, por ejemplo: una reacción exacerbada a un factor estresante, la pérdida de un ser querido o algún comportamiento socialmente desviado. Un trastorno mental implica padecer una disfunción significativa en actividades personales, sociales o laborales que discapacitan al individuo (DSM V, 2013). El diagnóstico de un trastorno mental tiene un objetivo meramente clínico en el cual se valora el tipo de tratamiento que el individuo requiere. Algunos factores que se consideran para el tipo de tratamiento son: la severidad de los síntomas, el grado de discapacitación del individuo, la presencia de ideación suicida y los riesgos y beneficios de los tratamientos (DSM V, 2013). En términos económicos, los trastornos mentales conllevan un costo social elevado, ya que, en su forma más severa, pueden conducir al individuo a condiciones de desempleo, falta por enfermedad y, por lo tanto, una baja considerable en la productividad. Por otro lado, de acuerdo con datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) los costos por atención a la salud mental pueden llegar a representar hasta un 4% del PIB.

2.2. Depresión

La depresión es un trastorno mental caracterizado por la presencia de tristeza, sensación de vacío, irritabilidad, anhedonia, y que está acompañado de cambios somáticos, cognitivos y psicológicos que empobrecen la calidad de vida del individuo (DSM V, 2013). Para facilitar su diagnóstico clínico, el DSM V clasifica la depresión en varios trastornos depresivos, los cuales comparten como característica principal dichos síntomas, pero difieren en cuanto a duración, etiología y el momento en el que se presenta el episodio depresivo (Tabla 1). El trastorno de depresión mayor (DM) es el trastorno más común y representa la condición clásica en este grupo de trastornos (DSM V, 2013).

Tabla 1. Clasificación de los Trastornos Depresivos y sus características principales de acuerdo con el DSM-V.

Trastorno depresivo	Características Principales
Trastorno de Depresión Mayor	Se presentan cinco o más de los siguientes síntomas casi todos los días durante mínimo dos semanas: 1) estados depresivos 2) pérdida de interés o placer 3) cambios en el apetito o el peso 4) insomnio o hipersomnia 5) agitación psicomotora 6) disminución de la energía 7) sentimientos de inutilidad o de culpa 8) dificultad para pensar, concentrarse o tomar decisiones 9) pensamientos de muertes, ideación suicida
Trastorno de Desregulación Disruptiva del Estado de Ánimo	Irritabilidad crónica Estallidos de mal genio frecuentes (típicamente en respuesta a la frustración) Puede ser verbal o conductual (observable por los demás) Presencia de síntomas por lo menos 12 meses consecutivos
Trastorno Depresivo Persistente (Distimia)	Estado de ánimo deprimido (la mayor parte del día, la mayor cantidad de días, durante por lo menos 2 años) Se pueden presentar dos o más síntomas del Trastorno de Depresión Mayor
Trastorno Disfórico Premenstrual	Labilidad emocional, irritabilidad, disforia y ansiedad que ocurren repetidamente durante la fase premenstrual y terminan durante la aparición de la menstruación o poco después La persona debe tener un período libre de síntomas en la fase folicular después de que comience el período menstrual. Los síntomas pueden estar estrechamente relacionados con las características de fondo social y cultural de la mujer afectada, perspectivas de la familia, y los factores más específicos como las creencias religiosas, la tolerancia social, y las cuestiones de rol de género femenino.
Depresión Inducida por Sustancias/Medicamentos	Hay presencia de los síntomas del trastorno depresivo mayor, sin embargo, están asociados con la ingestión, inyección o inhalación de una sustancia (drogas de abuso, toxina, la medicación psicotrópica u otra medicación). Los síntomas depresivos persisten más allá de la duración prevista de efectos fisiológicos, intoxicación, o período de retiro. El trastorno debe haber sido desarrollado durante o después de 1 mes después del uso de una sustancia que sea capaz de producir el trastorno depresivo.
Trastorno Depresivo Especificado	Existen síntomas característicos de un trastorno que provocan malestar clínicamente significativo o deterioro en la vida social, laboral u otras áreas importantes de la actividad predominante, pero que no cumple con todos los criterios para cualquiera de los trastornos de la clase de diagnóstico de trastornos depresivos descritos anteriormente. El clínico elige comunicar la razón específica del trastorno.

Trastorno Depresivo No especificado

Existen síntomas característicos de un trastorno que provocan malestar clínicamente significativo o deterioro en la vida social, laboral u otras áreas importantes de la actividad predominante pero que no cumple con todos los criterios para cualquiera de los trastornos de la clase de diagnóstico de trastornos depresivos descritos anteriormente.

El clínico omite la razón específica

2.3. Etiología de los trastornos depresivos

La etiología de los trastornos depresivos se puede abordar desde muchas perspectivas. Por un lado, están los factores psicosociales y culturales, los cuales determinan el ambiente del individuo y la interpretación de su experiencia; estos pueden dar pie al desarrollo del trastorno mental con base en un constructo patológico que el individuo crea de su entorno y de su interpretación. Por otro lado, están también los factores biológicos, los cuales determinan los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la depresión como son: los factores genéticos, endócrinos, inflamatorios y neurobiológicos. Por lo tanto, estos trastornos se consideran sumamente complejos, y su etiología es resultado de las interacciones de dichos factores. En este sentido, al ser un trastorno tan heterogéneo, la depresión se manifiesta a través de múltiples expresiones fenotípicas de distinta naturaleza fisiopatológica, -e.g. pensamientos fatalistas, mala gestión emocional, disfunción cognitiva, fatiga, alteraciones en el sueño y en la alimentación- los cuales, a su vez, se superponen con otras entidades de diagnóstico y dificultan su asociación con algún mecanismo biológico, es entonces que el enfoque de diagnóstico y tratamiento clínico basado en síntomas enfrenta grandes limitaciones (Dean y Keshavan, 2017; Pitsillou et al., 2020). Con relación a esto, desde la segunda mitad del siglo XX se han desarrollado varios modelos para tratar de explicar las enfermedades mentales, entre ellas la depresión. Éstos podrían diferenciarse, por un lado, entre los que explican la enfermedad a través de factores psicológicos y socioculturales y, por el otro, los que se enfocan en los factores biológicos. No obstante es necesario realizar esfuerzos por integrar los diferentes abordajes para explicar de manera integral los fenómenos psicopatológicos, de tal forma que los mecanismos biológicos tengan sentido dentro del contexto social y cultural de individuo (Kapusta, 2013).

De acuerdo con análisis de estudios epidemiológicos, los principales factores psicosociales relacionados positivamente con el desarrollo de síntomas depresivos

son: el sexo, ya que la tasa de depresión mundial es mayor en mujeres que hombres; el estado civil, pues la tasa de depresión es mayor en personas divorciadas/separadas; los problemas de salud física, dado que los padecimientos crónicos incrementan el riesgo de depresión hasta en un 50%; el desempleo y el abuso de drogas. Otros factores que se han relacionado indirectamente con el desarrollo de síntomas depresivos, pero que dependen de cada región son: un estatus socioeconómico bajo y un nivel educativo bajo, los cuales se asocian con el aumento de factores relacionados con el desarrollo de la depresión como el abuso de drogas y una menor salud física (Gutiérrez-Rojas et al., 2020). Las experiencias traumáticas a lo largo de la vida pueden ser también un factor de riesgo importante para el desarrollo de la depresión. En la vida adulta, los más comunes son situaciones de pérdida -e.g. muerte de un ser querido o una pérdida material importante-, violencia de pareja o de género. Por otra parte, las experiencias traumáticas a temprana edad son particularmente relevantes, ya que pueden afectar el desarrollo del sistema cerebral encargado del procesamiento de la información y de la regulación de emociones. En consecuencia, los pensamientos, creencias y actitudes de las personas afectadas tienden a ser disfuncionales (Gutiérrez-Rojas et al., 2020; Pitsillou et al., 2020)

Cabe mencionar que, a pesar de que dichos factores afectan de manera global, la interpretación de los trastornos mentales es dependiente de cada región y va evolucionando a lo largo del tiempo. En la Edad Media, por ejemplo, la depresión era considerada como un tipo de locura que se explicaba y se trataba a través de la superstición, la magia y la religión (Eguíluz-Uruchurtu, 2010). Hoy en día, la depresión es considerada como un trastorno mental a nivel mundial. A pesar de ello, la percepción e interpretación de los síntomas sigue siendo muy distinta entre culturas occidentales y orientales. Por ejemplo, la somatización de los síntomas es más frecuente en culturas orientales. Concretamente, en China la prevalencia de los trastornos depresivos es muy baja, por el contrario, hay una alta prevalencia de neurastenia, la cual consiste en presentar fatiga extrema, dolor muscular e incomodidad física inespecífica, y se ha sugerido que esta condición puede considerarse análoga a la depresión occidental (Pérez-Sales, 2004).

2.3.1. Factores genéticos y epigenéticos de los trastornos depresivos

Se ha estimado que los trastornos depresivos tienen una heredabilidad del 31-42% y que alrededor del 80% de los episodios depresivos están precedidos por algún evento estresante (Shapero et al., 2014; Sullivan et al., 2000). En este sentido, existen algunas variantes genéticas asociadas al desarrollo de síntomas depresivos, ya que se han determinado polimorfismos en genes de sistemas relacionados con su neurobiología como son el sistema serotoninérgico (transportador de serotonina: gen *SLC6A4* y *5HTT*, enzima TPH2: gen *TPH2* enzima MAO-A: gen *MAOA* y el receptor 5HT2A: gen *HTR2A*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF: gen *BDNF*), el eje HHA: gen *NR3C1* y el sistema opioide (receptor μ : gen *OPRM1*), entre otros (Chmielewska et al., 2019; Lohoff, 2010; Yu et al., 2005). Es importante mencionar que, por sí mismo, ningún polimorfismo individual confiere un riesgo directo para desarrollar un trastorno depresivo, ya que el impacto genético de su desarrollo recae en la actividad de muchos genes distribuidos en todo el genoma. Más bien, el riesgo de desarrollo de síntomas depresivos se establece a través de un mecanismo de evaluación llamado puntuación de riesgo poligénico, el cual determina un resultado de riesgo acumulado que es calculado a partir de la suma de cada variante de un alelo, ponderado por su impacto en el riesgo de desarrollo del trastorno (Fang et al., 2020). No obstante, a pesar de poder identificar algunos perfiles genéticos que confieren cierta susceptibilidad a desarrollar depresión, no se ha determinado ningún marcador genético que esté relacionado directamente con su desarrollo.

La epigenética estudia la modulación de la expresión génica que se lleva a cabo por factores externos como el estrés, la alimentación y los xenobióticos, entre otros. Los mecanismos epigenéticos no se refieren a la alteración directa de la secuencia del ADN, sino a la modificación de los nucleosomas (ADN e histonas) por medio de reacciones de metilación y acetilación/deacetilación, las cuales pueden establecer cambios a largo plazo en la expresión génica y, con ello, aumentar la vulnerabilidad del desarrollo de ciertas condiciones. La identificación de modificaciones epigenéticas en pacientes con trastornos mentales ha sido útil tanto para determinar marcadores biológicos como para establecer predictores de respuesta a los tratamientos farmacológicos (Chmielewska et al., 2019). Un elemento importante que ha sido

identificado para estos fines es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), ya que la metilación de su gen promotor SLC6A4 sirve como un marcador biológico importante de los niveles periféricos de BDNF. Se han encontrado niveles bajos de BDNF en pacientes depresivos sin tratamiento (Molendijk et al., 2010). Además, el nivel de metilación de este gen promotor ha sido directamente relacionado con la respuesta terapéutica a varios antidepresivos -e.g. escitalopram, paroxetina, fluvoxamina y milnacipram- (Castrén y Kojima, 2017; Lee y Park, 2014; Tadi et al., 2011). Por otra parte, los procesos de acetilación de histonas también han tomado un rol importante en el uso de la epigenética para el tratamiento de trastornos mentales. En este sentido, se ha sugerido que el uso de inhibidores de deacetilasas de histonas puede ser un tratamiento novedoso para el tratamiento para los trastornos depresivos, ya que ha presentado efectos tipo antidepresivos en modelos animales (Iii et al., 2009).

2.4. Neurobiología de los trastornos depresivos

Los trastornos depresivos son entidades muy complejas por lo que es difícil establecer una etiopatogenia específica. Hasta el momento, su neurobiología ha sido fundamentada en la determinación de procesos anormales en mecanismos y estructuras cerebrales asociados a la regulación de las emociones y del estado de ánimo. La DM ha sido el trastorno depresivo más estudiado y sus hallazgos han servido como referencia para los demás tipos de trastornos. Al respecto, cambios en el funcionamiento de las regiones corticales, del sistema límbico y del tallo cerebral se encuentran involucrados en el desarrollo de DM (Figura 1). El sistema límbico es un conjunto de estructuras implicadas en la regulación de la actividad neuroendócrina, de funciones autonómicas, de homeostasis metabólica, de la cognición, de las emociones y del estado de ánimo. Algunas estructuras descritas como parte del sistema límbico son el hipocampo, el hipotálamo, la amígdala, el tálamo anterior, y la corteza cingulada. De acuerdo con reportes de imagenología, el hipocampo, la amígdala, la corteza prefrontal y la corteza cingulada son las áreas con daño en pacientes con depresión mayor (Zhang et al., 2018). En este sentido, algunos estudios han reportado disminución de la materia gris en el hipocampo y en la corteza prefrontal, lo cual se ha relacionado con síntomas cognitivos como la falta de memoria y sentimientos de inutilidad, desesperanza, culpa y suicidio (Nestler et al., 2002). En el caso del

hipocampo, esta reducción puede ser revertida con antidepresivos (Campbell y MacQueen, 2004). Asimismo, la corteza del cíngulo, específicamente la corteza subgenual, presenta una reducción significativa tanto en la materia gris como en el número de células gliales en pacientes con depresión; esto afecta la capacidad de integrar la información desde las áreas de asociación sensorial para generar la conducta emocional y afectiva (Drevets et al., 1997). Por el contrario, la amígdala, estructura relacionada con las respuestas emocionales más primitivas -e.g. miedo, agresión y placer-, presenta un incremento en su volumen y actividad provocado, en parte, por la exposición a niveles elevados de cortisol (hormona del estrés) que se encuentran exacerbados por una hiperreactividad del eje HHA (Korgaonkar et al., 2013; Zorumski et al., 2013). En conjunto, todos estos cambios contribuyen a una desregulación global en el procesamiento de las emociones y en el estado de salud general.

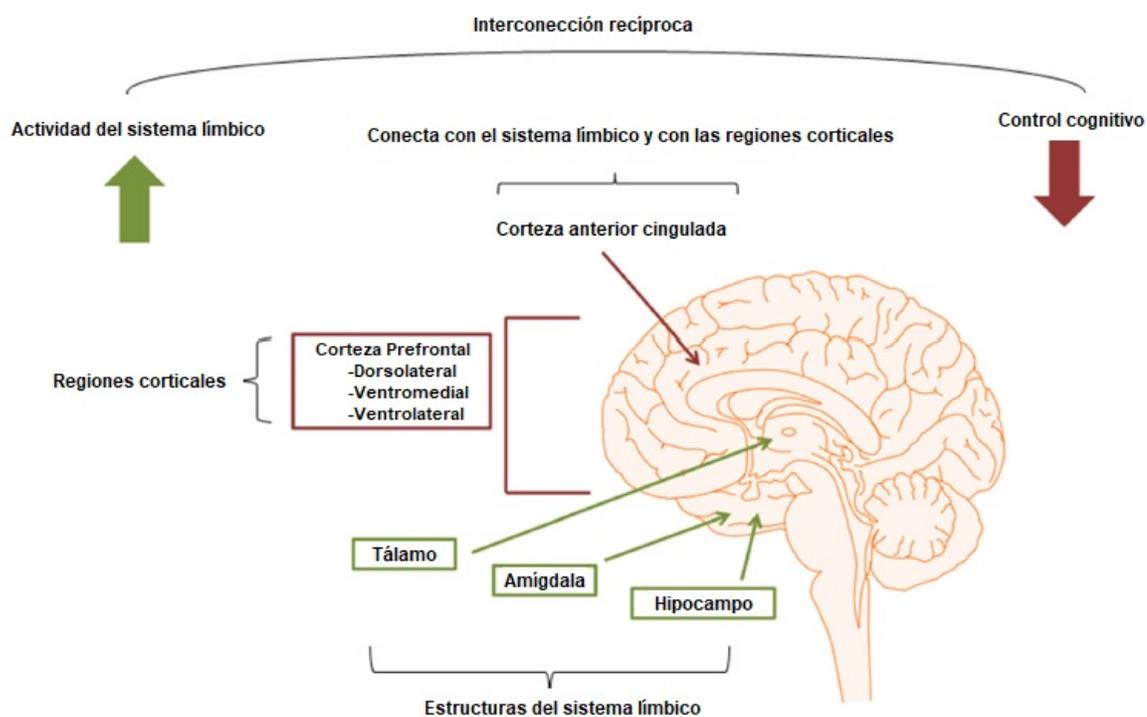


Figura 1. Desregulación emocional y control cognitivo en la depresión mayor. Tomada y modificada de Pitsillou et al., 2020

Las bases biológicas de los trastornos depresivos no han sido completamente dilucidadas, y a lo largo del tiempo se han ido determinado elementos y mecanismos patofisiológicos que contribuyen a su desarrollo, los cuales deben ser comprendidos como procesos interconectados. A continuación, se describen brevemente las principales teorías que constituyen los fundamentos biológicos de la DM.

2.4.1. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión

2.4.1.1. Teoría monoaminérgica

Una de las teorías predominantes en la neurobiología de la DM es la hipótesis monoaminérgica, la cual postula que la depresión es causada por una alteración en los niveles de monoaminas i.e.- 5-HT, NA, DA. Uno de los principales fundamentos de esta teoría es el hecho de que los pacientes con depresión presentan niveles disminuidos de dichos neurotransmisores, y que la administración de fármacos que los reestablecen, como son los ISRS, ISRN y los tricíclicos, producen la remisión de la mayoría de los síntomas de la depresión en aproximadamente el 60% de la población. A pesar de que a cada neurotransmisor se les ha atribuido funciones específicas es importante no perder de vista que los tres sistemas de neurotransmisión están interconectados y que la alteración de uno de ellos afecta indirectamente a los demás (El Mansari et al., 2010) (Figura 2).

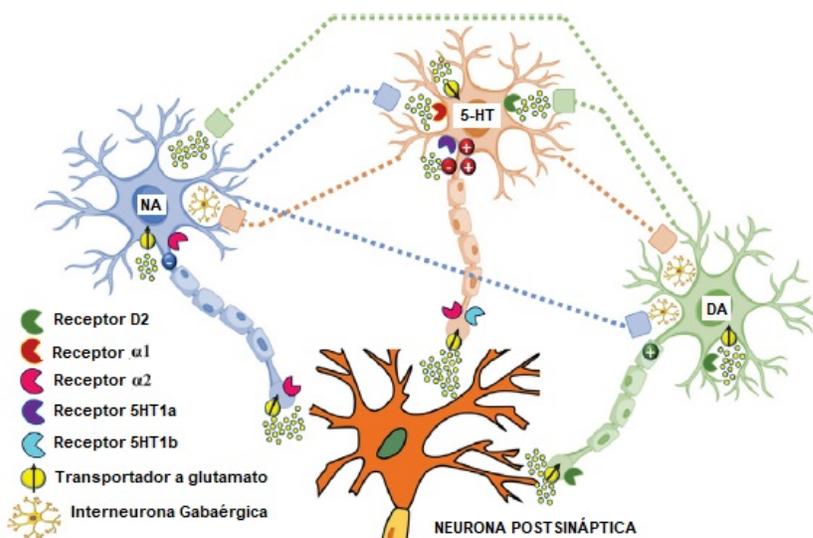


Figura 2. Circuito funcional de las neuronas monoaminérgicas. Tomado y modificado de Villas Boas et al., 2019

La 5-HT es una indolamina sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del SNC y en las células enterocromafines del sistema gastrointestinal, en donde se encuentra la mayor parte de la 5-HT del organismo (Chávez-León et al., 2008; McCorvy y Roth, 2015). La 5-HT funciona como neurotransmisor y como hormona en diversos procesos fisiológicos como el procesamiento sensorial, control cognitivo, regulación emocional, conducta sexual, control autonómico y la actividad locomotriz entre otros (Andrews et al., 2015a). La 5-HT lleva a cabo su acción a través de la activación de los 14 distintos tipos y subtipos de receptores a 5-HT (5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F; 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 y 7), de los cuales todos, excepto el 5-HT₃, están acoplados a proteínas G. El 5-HT₃ es un canal iónico dependiente de voltaje (Olivier, 2015). Como parte de la regulación de la transmisión, las neuronas serotoninérgicas cuentan con un transportador de 5-HT (SERT) que se encarga de la recaptura de la 5-HT al interior de la célula presináptica; esto con el fin de regular su concentración en la hendidura sináptica (Hardman et al., 2001). En el cerebro, la mayor densidad de neuronas serotoninérgicas se encuentra en el núcleo de rafé dorsal, en el tallo cerebral (Chávez-León et al., 2008; Michelsen et al., 2007). Estas neuronas tienen proyecciones hacia la corteza prefrontal y al hipocampo, donde regulan procesos integradores de cognición y memoria; al sistema límbico, para el control del estado ánimo; y al tálamo e hipotálamo, para la regulación de la homeostasis energética, del control de la conducta alimentaria y la saciedad, del estrés y de la conducta sexual (Krolick et al., 2018)

El papel de la 5-HT en el mantenimiento del estado de ánimo y en la respuesta a los tratamientos antidepresivos se ha reportado clínicamente. Por ejemplo, el tratamiento con antidepresivos no tiene efectos en pacientes con privación de triptófano, un aminoácido esencial a partir del cual se sintetiza la 5-HT (Bell et al., 2001). También, ciertos polimorfismos en el SERT y en el autorreceptor 5HT_{1A} se han asociado con una reducción en los niveles de serotonina (Lohoff, 2010).

Si bien el sistema serotoninérgico ha sido el principal foco de investigación debido a la efectividad de los ISRS, la NA y la DA también tienen un rol importante en la patofisiología y en el tratamiento de la DM. La noradrenalina y la dopamina son neurotransmisores catecolaminérgicos con funciones fisiológicas similares que han

sido ampliamente relacionados con la regulación del estado de ánimo (El Mansari et al., 2010). Ambos son sintetizados a partir de tirosina, un aminoácido esencial. Primero, la L-tirosina es transformada en L-DOPA por acción de la enzima tirosina hidroxilasa. Posteriormente, la L-DOPA es convertida en dopamina por acción de la enzima DOPA descarboxilasa. En el SNC la noradrenalina es producida por las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC), y del área tegmental lateral, y participa en procesos de respuesta al estrés, miedo, motivación, regulación del sueño y del apetito, la conducta sexual, mecanismos de recompensa, aprendizaje y memoria a través de sus receptores (α y β), todos ellos acoplados a proteínas G (Tellez-Vargas, 2000). En este sentido, existe evidencia clínica que señala el rol de la NA en los trastornos depresivos, por ejemplo, en estudios post-mortem de pacientes con depresión mayor se determinó una menor densidad del transportador de NA en las terminales sinápticas de neuronas que provienen del locus coeruleus en respuesta a una baja disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica. Asimismo, otro estudio reportó un aumento en la densidad de receptores α_2 -adrenérgicos, autorreceptores encargados de la regulación negativa de la biosíntesis del NE (Klimek et al., 1997; Ordway et al., 2003).

Por otra parte, la DA es producida en las terminales sinápticas de las neuronas dopaminérgicas que provienen del área tegmental ventral (VTA) y de la sustancia nigra. La DA participa en la locomoción, en los mecanismos de recompensa y motivación, en la afectividad, en la regulación neuroendócrina y en la alimentación, entre otros, a través de sus receptores del tipo D1 y D2, acoplados a proteínas G (Bahena-Trujillo et al., 1998). Con relación a este neurotransmisor, se sabe que alteraciones en la vía mesolímbica, principal vía de regulación de los procesos de recompensa y de motivación, forman parte importante de la patofisiología de la depresión. En particular, los síntomas de anhedonia y falta de motivación, letargo y suicidio han sido relacionados con el malfuncionamiento de esta vía (Pettorruso et al., 2020). Similar a lo que ocurre con la serotonina, el uso de antidepresivos que aumentan los niveles de noradrenalina y dopamina como los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores de las monoaminoxidasas (iMAOs) y el inhibidor del DAT, bupropión, reducen en gran medida los síntomas depresivos (Willner et al., 2013).

A pesar de que ya existen opciones de fármacos con otros mecanismos de acción, los fármacos que regulan la neurotransmisión de monoaminas siguen siendo el tratamiento de primera línea en la clínica. Cabe mencionar que estos tratamientos tienen un largo periodo de latencia y un porcentaje de respuesta de alrededor del 30-40%, además de estar asociados a varias reacciones adversas, por lo que frecuentemente se prescriben dosis menores a las dosis efectivas para disminuir su incidencia (Pandarakalam, 2018).

2.4.1.1. Teorías GABAérgica y Glutamatérgica

El ácido γ -aminobutírico (GABA) y el glutamato son los principales neurotransmisores inhibitorio y excitatorio, respectivamente, del SNC. De hecho, el funcionamiento óptimo del cerebro requiere de un balance específico de estos dos neurotransmisores. Las neuronas que sintetizan glutamato son mucho más abundantes y se encuentran prácticamente en todo el SNC, a diferencia de las interneuronas que sintetizan GABA que se encuentran en mucho menor proporción y en áreas más localizadas como el hipocampo, el tálamo, los ganglios basales, el hipotálamo y el tallo cerebral (Ochoa-de la Paz et al., 2020). En un cerebro adulto, la proporción de neuronas GABAérgicas/glutamatérgicas es de 1/5 (Sahara et al., 2012). El glutamato es un aminoácido no esencial que, además de funcionar como neurotransmisor, funciona como precursor para la biosíntesis de GABA por acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en las interneuronas. Por lo tanto, los procesos de excitación e inhibición que llevan a cabo son interdependientes (Duman et al., 2019). El glutamato lleva a cabo sus acciones excitatorias a través de tres tipos principales de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y Kainato) y ocho receptores metabotrópicos (mGluR1-mGluR8). La sobreestimulación de estos receptores puede fácilmente provocar daño neuronal (excitotoxicidad), por lo que existen mecanismos para regular su actividad. El principal mecanismo para evitar la excitotoxicidad es a través de la acción de los astrocitos, los cuales se encargan de transformar el glutamato en glutamina a través de la vía glutamina sintetasa. Posteriormente, la glutamina es recapturada por las neuronas glutamatérgicas para ser reutilizada y reconvertida en glutamato (Niciu et al., 2014). Por su parte, el GABA es un aminoácido

no proteico cuyas funciones son llevadas a cabo a través de sus receptores de tipo iónico (GABA A) y de tipo metabotrópico (GABA B).

Con relación al papel de los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos en el desarrollo de trastornos depresivos, se ha sugerido que el malfuncionamiento de los sistemas de excitación e inhibición cerebral puede contribuir a establecer patrones de conectividad neuronal aberrantes (Duman et al., 2019; Lener et al., 2017; Niciu et al., 2014). Por ejemplo, existe evidencia clínica que ha encontrado alteraciones en la actividad de los sistemas glutamatérgico y GABAérgico en pacientes con DM a través de estudios de resonancia magnética funcional, electroencefalografía y magnetoencefalografía (Duman et al., 2019). De hecho, dos de los tratamientos para la depresión más novedosos, eficaces y con menos efectos adversos de la última década son la ketamina, un antagonista de los receptores a glutamato NMDA, y la alopregnanolona, un modulador alostérico positivo del receptor GABA A (Duman et al., 2019)

2.4.2. Inflamación crónica (Teoría neuroinmune)

La inflamación es una respuesta inmune constituida por fenómenos moleculares, celulares y vasculares que tienen como principal objetivo reparar el daño producido por agentes físicos, químicos y biológicos. Un proceso inflamatorio es inmediato, focalizado y específico y, a grandes rasgos, está conformado por cinco etapas principales: 1) liberación de mediadores inflamatorios; moléculas de origen celular y plasmático que son liberadas ante estímulos específicos como citocinas, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , eicosanoides, histamina, 5-HT y óxido nítrico, entre otros. 2) acción de mediadores inflamatorios; alteraciones vasculares que favorecen la llegada de células inmunes al foco inflamatorio. 3) llegada y acción de células inmunes como macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos. 4) regulación del proceso inflamatorio; mecanismos inhibidores que regulan, finalizan o equilibran el proceso. 5) reparación del tejido; fase en la cual se lleva a cabo la reparación total o parcial de los tejidos dañados. Normalmente los procesos inflamatorios se desencadenan ante eventos aislados -e.g.-traumatismos, infecciones, quemaduras o intoxicaciones- aunque existen condiciones específicas que pueden provocar estados inflamatorios crónicos como el estrés crónico, el estrés oxidativo, la

obesidad y algunas enfermedades metabólicas, autoinmunes y alérgicas. En la inflamación crónica, los procesos de daño y reparación tisular pueden coexistir durante tiempos indeterminados, no sólo manteniendo y exacerbando el daño sino ampliando la respuesta inflamatoria a otros tejidos (Froldi et al., 1990)

De acuerdo con la hipótesis neuroinmune de la DM, algunos procesos inflamatorios, principalmente crónicos, pueden tener un fuerte impacto en la estructura y función neurobiológica que conlleva al desarrollo de síntomas depresivos como anhedonia, fatiga y cognición deteriorada. La primera asociación entre síntomas conductuales y procesos de inflamación fue establecida en 1988 por Hart, la cual describe que dichos síntomas depresivos se presentan como una estrategia adaptativa para favorecer un proceso inflamatorio a través de la conservación de energía, es decir, a menor gasto de energía mayor puede ser el grado de recuperación de algún daño o infección (Rosenblat et al., 2014). No obstante, esta teoría se limita a procesos inflamatorios agudos, ya que en un proceso inflamatorio crónico esta estrategia resultaría contraproducente.

Hasta el momento, la relación más directa entre la inflamación y la depresión se ha establecido a través de las citocinas proinflamatorias ya que se han encontrado niveles altos de IL-1 β , IL-2 e IL-6, TNF α y proteína C reactiva en pacientes con depresión mayor, lo cual también se asocia con una menor respuesta a tratamientos con antidepresivos (Majd et al., 2019). Las citocinas proinflamatorias tienen varias funciones, por un lado, su liberación activa la vía de factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$), el cual activa agentes inflamatorios como ciclooxigenasa-2 (COX-2) que intensifican aún más la respuesta inflamatoria (Pitsillou et al., 2020). Por otro lado, en condiciones patológicas, estos mediadores proinflamatorios periféricos pueden modificar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y filtrarse al cerebro, en donde pueden modificar los niveles de serotonina y producir la desregulación del eje HHA aumentando los niveles de cortisol, lo cual está estrechamente relacionado con el desarrollo de la depresión (Rosenblat et al., 2014). Además, las citocinas proinflamatorias activan la microglía y los astrocitos, células inmunes en cerebro (Figura 3). Por ejemplo, se ha sugerido que la activación prolongada de la microglía, está relacionada con apoptosis, con una disminución en la plasticidad sináptica y la

neurogénesis y con la destrucción de vías neuronales funcionales, fenómenos que participan en la generación de algunas conductas comunes en pacientes con trastornos psiquiátricos como la dificultad para adaptarse a su ambiente (Almutairi et al., 2016).

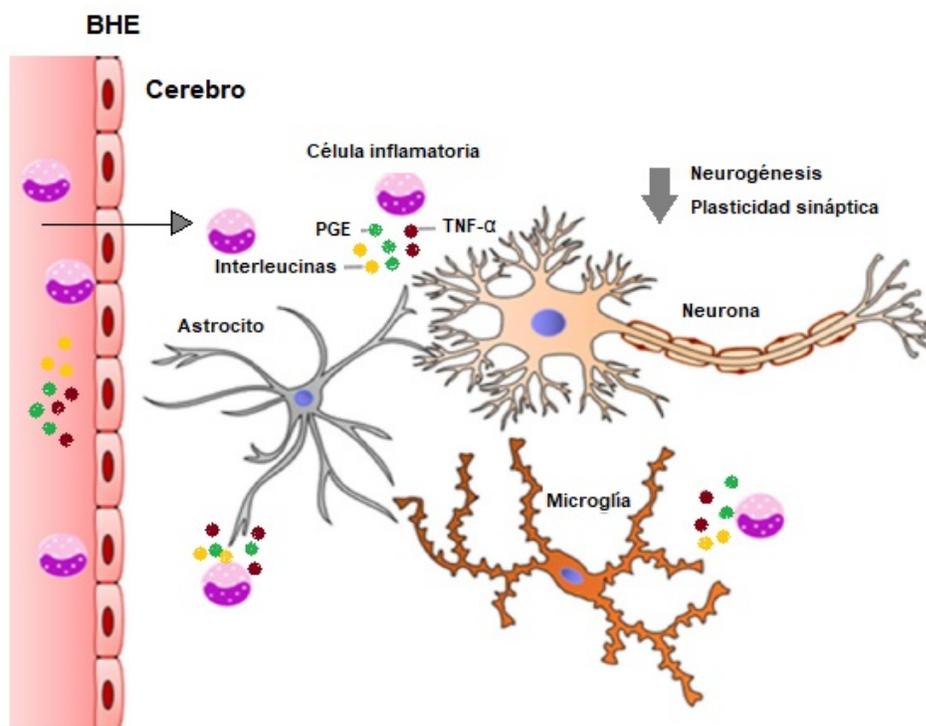


Figura 3. Filtración de mediadores inflamatorios a través de la barrera hematoencefálica (BHE) que sobreactivan a la microglía y a los astrocitos y generan daños estructurales y funcionales. Tomado y modificado de Pitsillou et al., 2020

2.4.3. Desregulación del eje HHA (Teoría neuroendócrina)

El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal es una vía del sistema neuroendócrino que regula las respuestas al estrés y participa en la modulación de otros procesos del organismo -e.g. la inflamación, la digestión, las emociones, el metabolismo energético- (Tsigos & Chrousos, 2002). En esta vía, el núcleo paraventricular del hipotálamo secreta el factor liberador de corticotropina (CRH) hacia la adenohipófisis para inducir la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) la cual, a su vez, estimula la secreción de corticosteroides desde la corteza adrenal al torrente sanguíneo. La

regulación negativa del eje HHA está dada principalmente por los corticosteroides en el hipotálamo, a través de los receptores a glucocorticoides (GC), sin embargo, otros circuitos cerebrales también pueden modular su actividad. Por ejemplo, áreas del sistema límbico como la amígdala y el hipocampo pueden disminuir o aumentar, respectivamente, la actividad del eje HHA (Jankord & Herman, 2008). Es importante mencionar que el estrés es un proceso natural y necesario para el bienestar de cualquier organismo, sin embargo, la exposición sostenida al estrés puede producir cambios irreversibles en la homeostasis de varios sistemas, lo cual puede contribuir en gran medida al desarrollo de trastornos depresivos. Algunas de las respuestas del organismo ante la exposición al estrés crónico son: aumento en la presión sanguínea, alteraciones en el metabolismo de la insulina, cambios en la percepción del dolor, cambios en la calidad del sueño y disminución del volumen cerebral, atrofia hipocampal y daño en el entorno celular en regiones implicadas en la depresión como el área subgenual del cíngulo anterior (Thase ,2018).

De acuerdo con la teoría neuroendócrina de la DM, la desregulación de este eje contribuye significativamente a su desarrollo. En primer lugar, la disfunción del circuito límbico generada por una hiperreactividad de la amígdala provocada por eventos traumáticos a edades tempranas, puede resultar en la sobreestimulación del eje HHA en la etapa adulta (Nestler et al., 2002). Por otra parte, se ha reportado que, en pacientes con depresión, el eje HHA presenta una hiperactividad relacionada con varias causas como hiperactivación de las neuronas que liberan CRH y aumento en la expresión de los GC en el hipotálamo, lo cual puede conducir al aumento de cortisol en sangre y a daños en procesos cerebrales importantes como la neurogénesis en el hipocampo (Bao et al., 2008). El hipocampo, a su vez, ejerce un control inhibitorio sobre la actividad del eje HHA, por lo que su alteración conduce a incrementar aún más la activación del eje (Willner et al., 2013).

Adicionalmente, se ha demostrado que el sistema neuroendócrino está estrechamente relacionado con otros sistemas importantes como los sistemas de neurotransmisión y el sistema inmunológico. En general, el estrés crónico puede alterar de manera indirecta todos estos sistemas; por ejemplo, conduce a un aumento en la actividad de la tirosina hidroxilasa, la enzima involucrada en la síntesis de NE, en

las terminales de neuronas del locus coeruleus. El estrés también estimula la producción y liberación de NE al provocar un aumento en la secreción de la CRH del hipotálamo, que a su vez desencadena la liberación de ACTH de la hipófisis y posteriormente estimula la glándula suprarrenal para liberar NE y cortisol. El aumento de los niveles de cortisol y NE aumenta la actividad del sistema nervioso simpático y la liberación de citocinas, cuyos efectos se retroalimentan mutuamente (Pitsillou et al., 2020). Finalmente, el estrés crónico también tiene efectos sobre los sistemas glutamatérgico y GABAérgico de la corteza prefrontal. Por un lado, altera el metabolismo del glutamato y por otro, disminuye los niveles de GABA (Duman et al., 2019).

2.4.4. Alteraciones en la expresión de BDNF (Teoría neurotrófica)

Las neurotrofinas son proteínas que participan en el crecimiento, diferenciación, supervivencia celular, en la neurogénesis y en la plasticidad neuronal. El factor neurotrófico más expresado en el SNC es el BDNF, aunque también se han identificado otras neurotrofinas importantes como las neurotrofinas 3, 4 y 5 y el factor de crecimiento nervioso. EL BDNF se sintetiza a partir de su precursor pro-BDNF, tanto en el SNC como el SNP en condiciones normales, de inflamación y en respuesta a la administración de antidepresivos (Castrén y Kojima, 2017).

Las áreas del SNC con mayor expresión de BDNF en humanos son aquellas que participan en la función emocional y cognitiva, por ejemplo: el hipocampo, la corteza frontal, parietal y entorrinal, etc. Los somas de las las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafé y las noradrenérgicas del locus coeruleus que no sintetizan BDNF, y que son capaces de transportarlo desde sus proyecciones axónicas en otras áreas por mecanismo retrógrado (Castrén y Kojima, 2017). El BDNF y el pro-BDNF producen efectos fisiológicos distintos y hasta opuestos, a través de los receptores TrkB y los receptores de neurotrofinas, respectivamente. Por un lado, la activación de los receptores TrkB incrementa la supervivencia y diferenciación neuronal, la arborización dendrítica y la potenciación a largo plazo. Por el contrario, los receptores de neurotrofinas activados por el pro-BDNF reducen la complejidad y densidad de las espinas dendríticas, promueven la muerte celular e inducen depresión a largo plazo (LTD) (Phillips, 2017) .

El BDNF ha sido estrechamente relacionado con la patofisiología de los trastornos, principalmente debido a que se han encontrado niveles periféricos de BDNF disminuidos en personas con DM (Lee y Park, 2014; Molendijk et al., 2010). De hecho, existe una correlación entre el aumento en las concentraciones séricas de BDNF y la disminución de síntomas depresivos por acción de fármacos antidepresivos, (Tadi et al., 2011). Asimismo, en estudios post-mortem de personas con depresión, también se han determinado niveles reducidos de BDNF en el hipocampo; estructura ampliamente relacionada con la neurobiología de la depresión. En este sentido, también se sabe que la administración de fármacos antidepresivos promueve la neurogénesis en el hipocampo. Por otro lado, la evidencia preclínica ha demostrado que los síntomas tipo-depresivos están relacionados con la disminución de la síntesis de BDNF y de la actividad del receptor TrkB en el hipocampo y en la corteza prefrontal. De hecho, la administración directa de BDNF en el hipocampo y en el mesencéfalo produce efectos tipo antidepresivos. En conjunto, estos datos sugieren que la disminución de la actividad del BDNF en ciertas regiones puede dar lugar a cambios importantes en los circuitos neurales implicados en la depresión.

2.4.5. Alteración de la microbiota intestinal

La microbiota es una comunidad compleja de microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios, y otros microbios) que habitan simbióticamente en un ambiente específico, como el tracto gastrointestinal (TGI). En el humano, la microbiota está determinada principalmente por la leche materna, al nacer, y por la dieta. No obstante, otros factores como la edad, la región y el uso de medicamentos también pueden influir en ella. Los principales microorganismos que habitan el TGI humano pertenecen al orden de las bacterias, entre las que predominan las *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (70-75%), y en menor medida, otras poblaciones como *Prevotella*, *Bacteroides* o *Ruminoccus* (Quigley, 2017). Se sabe que, para una buena salud, debe existir cierto equilibrio microbiológico, ya que se han determinado algunas condiciones patológicas asociadas a desequilibrios en la microbiota.

La microbiota intestinal, en particular, tiene funciones importantes como constituir una barrera intestinal, estimular la regeneración celular del epitelio intestinal y la producción de moco, proporcionar nutrientes a la mucosa intestinal, así como

activar al sistema inmune. Además de sus funciones locales, la microbiota intestinal es parte de una compleja red de comunicación con el SNC, las evidencias de esta relación han dado pie al modelo llamado eje microbiota-TGI-cerebro. De hecho, se ha propuesto que las alteraciones en la microbiota intestinal contribuyen al desarrollo de la depresión, debido a que dichas alteraciones pueden desregular indirectamente funciones cerebrales alterando los sistemas de neurotransmisión, el eje HHA y los sistemas neurotróficos (Foster y McVey Neufeld, 2013). Lo anterior a través de cambios en la permeabilidad de la barrera epitelial y de la activación de la inflamación y las respuestas inmunes. Algunos estudios también han determinado la relación entre la disminución de ciertas familias de bacterias como *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* con una función cognitiva disminuida y depresión (Du et al., 2020).

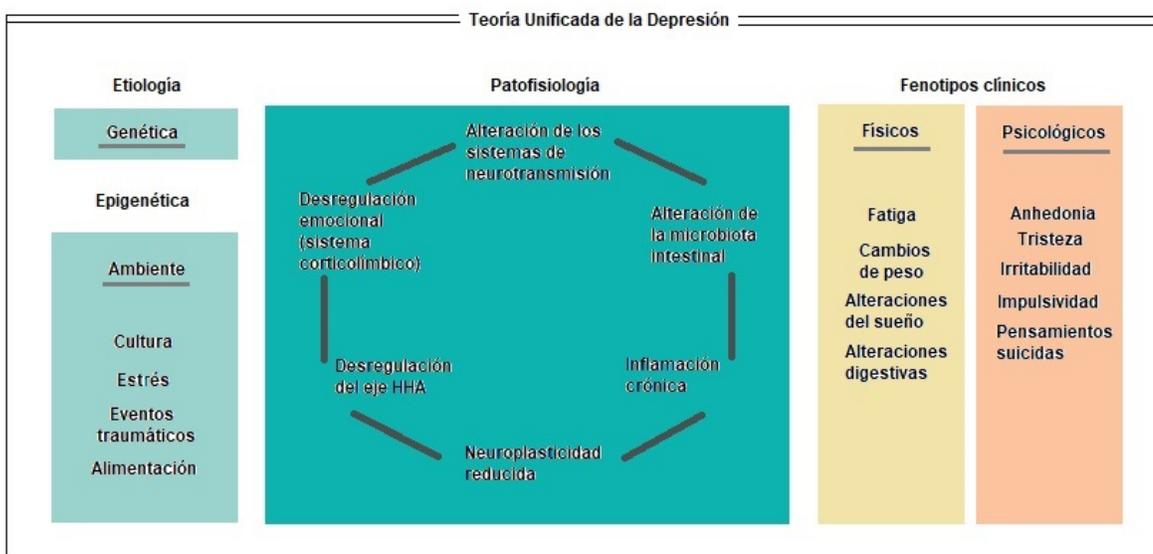


Figura 4. Factores genéticos, epigenéticos, psicosociales y culturales que interactúan para dar lugar a mecanismos patofisiológicos que causan la expresión fenotípica de la depresión. Tomada y modificada de Dean y Keshavan, 2017

2.5. Modelos animales para el estudio de los trastornos depresivos

El estudio de mecanismos específicos de la patofisiología de las enfermedades en humanos es limitado. En este sentido, el uso de modelos animales ha sido de gran utilidad para expandir el entendimiento tanto de la fisiología natural del organismo como de condiciones patológicas, incluyendo las enfermedades psiquiátricas. Los modelos animales son herramientas de estudio que permiten profundizar en la investigación de procesos genéticos, moleculares, celulares y conductuales de las entidades nosológicas (Valvassori et al., 2013). Esto, a través de intentar mimetizar el mayor número posible de cambios fisiológicos observados comúnmente en una enfermedad. En el caso del estudio de los trastornos mentales, los modelos animales han permitido el desarrollo de varias teorías conductuales y psicofarmacológicas (Razafsha et al., 2013). No obstante, una de las principales limitantes del uso de modelos animales en la neuropsiquiatría es la imposibilidad de mimetizar por completo las características biopsicosociales del trastorno mental, por lo que se han establecido criterios de validación que avalan el grado de confiabilidad de los modelos para sustentar las teorías, de la evidencia y de la interpretación del modelo (Tabla 2). En la neuropsiquiatría los modelos animales tienen dos principales objetivos; 1) la determinación de los mecanismos que subyacen a los trastornos psiquiátricos y; 2) la evaluación precisa de los tratamientos farmacológicos y conductuales en el modelo animal (Razafsha et al., 2013).

Tabla 2. Criterios de validación de los modelos animales de trastornos psiquiátricos.

Criterio	Características Principales
Validez de apariencia	Grado en el que el modelo animal refleja la sintomatología de la enfermedad en cuestión.
Validez de constructo	Grado en el que la prueba o el modelo animal mide lo que se pretende evaluar.
Validez predictiva	Grado de respuesta que se obtiene de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad en cuestión en el modelo animal.
Validez de contenido	Evalúa si el modelo animal está considerando todos los factores del trastorno que se pretende estudiar.

Razafsha et al., 2013

2.5.1. La prueba de nado forzado

El estudio de los trastornos depresivos en modelos animales no está enfocado en modelar la depresión como tal, sino en mimetizar algún aspecto central de su sintomatología y en evaluar los efectos antidepresivos de fármacos. Para ello, se utilizan pruebas conductuales que generen fenotipos de comportamientos que se asemejen al trastorno (Razafsha et al., 2013). Una de las conductas más utilizadas en el estudio de la depresión es la desesperanza aprendida, cuyo fundamento se basa en que los animales dejan de “luchar por su vida” en condiciones donde no hay escape. La prueba conductual más representativa de la desesperanza aprendida es la prueba de nado forzado (PNF). Esta prueba, desarrollada originalmente por Porsolt en 1977, consiste en analizar el comportamiento del animal al ser introducido en un cilindro con agua templada durante un determinado tiempo. Normalmente, al inicio presenta un comportamiento de escape intenso, lo cual incluye conductas activas de nado y escalamiento. Llegamos a un momento en el que muestran un comportamiento pasivo conocido como conducta de inmovilidad, la cual se asocia a una conducta de desesperanza. Se piensa que la conducta de inmovilidad refleja alguna alteración en el comportamiento natural de escape o el desarrollo de un comportamiento pasivo que desasocia al animal de la conducta activa de escape (Castagné, Moser, Roux y Porsolt, 2010). Lo relevante de esta prueba es que, sistemáticamente, la administración de fármacos antidepresivos clásicos (moduladores de la neurotransmisión monoaminérgica) disminuye significativamente la conducta de inmovilidad, a lo que se le conoce como efecto tipo antidepresivo. La efectividad de los fármacos antidepresivos correlaciona con su potencia en la clínica (Borsini y Meli, 1988).

Inicialmente, la prueba de Porsolt sólo se enfocaba en evaluar el tiempo de la conducta de inmovilidad, sin embargo, tiempo después, se observó que los antidepresivos catecolaminérgicos incrementan el comportamiento de escalamiento, mientras que los antidepresivos serotoninérgicos incrementan el nado (Detke et al., 1995). Por esta razón, se implementaron modificaciones a la PNF que permitieron subclasificar la conducta activa en “conducta de nado” y “conducta de escalamiento” con el objetivo de caracterizar el sistema de neurotransmisión en la acción de los

compuestos antidepresivos. La PNF ha sido utilizada tanto en esquemas de administración aguda como crónica y, si bien esta prueba no es un buen modelo de depresión debido a que no refleja algún síntoma de la enfermedad como tal, es una excelente herramienta para identificar compuestos con posible actividad antidepresiva por su capacidad de identificarla entre otros compuestos con actividad en el SNC, lo que sustenta su validez predictiva (Borsini y Meli, 1988).

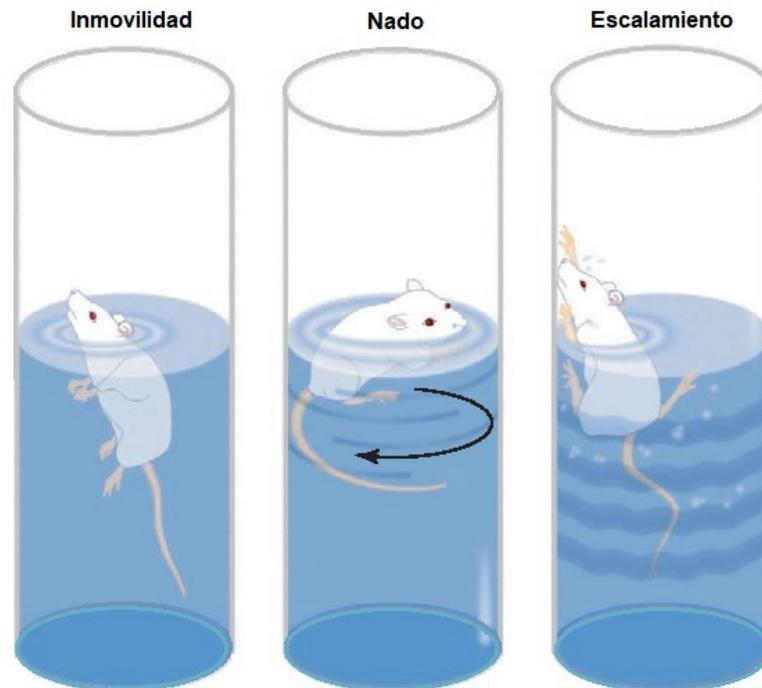


Figura 5. Prueba de nado forzado. Tomada y modificada de Cryan et al., 2002

2.6. Tratamientos para los trastornos depresivos

Los tratamientos actuales para los trastornos depresivos son variados y dependen principalmente de la severidad de los síntomas depresivos. Al ser un trastorno mental, la atención psicológica es clave ante cualquier tipo de depresión. No obstante, ante una depresión moderada o severa, existen opciones farmacológicas y no farmacológicas que, en conjunto con la psicoterapia y las medidas generales de salud (ejercicio regular, alimentación balanceada, sueño adecuado), han demostrado ser eficaces para tratarla (Gartlehner et al., 2017).

2.6.1. Tratamientos farmacológicos

Los fármacos antidepresivos más utilizados actúan mediante la modulación de los sistemas de neurotransmisión serotoninérgica, noradrenérgica y dopaminérgica y se clasifican en inhibidores selectivos de la monoaminoxidasa (iMAOs), antidepresivos tricíclicos (TCAs), inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y de noradrenalina (ISRN), inhibidores duales de la recaptura de serotonina y noradrenalina (5-HT/NA) y los antidepresivos atípicos, como por ejemplo, el bupropión, inhibidor de la recaptura de DA y, en menor grado, de NA y de acetilcolina, indicado en pacientes que no responden a tratamiento con los antidepresivos clásicos (Contreras, 2010).

Los iMAOs son medicamentos antidepresivos que inhiben la acción de las enzimas monoaminoxidasas, las cuales se encargan de la oxidación de las aminas de la serotonina, la noradrenalina, y en menor grado, la dopamina. Estas enzimas se encuentran localizadas en la membrana externa de las mitocondrias de varios tipos de células. Existen 2 subtipos principales de enzimas monoaminoxidasas: MAO-A, la cual tiene como principal sustrato la serotonina, la noradrenalina y la adrenalina, y la MAO-B, que tiene acción en moléculas como dopamina, tiramina, feniletilamina, feniletanol amina y benzilamina (Chockalingam et al., 2019). En el cerebro la isoenzima que predomina es la MAO-B (70-95%). La acción terapéutica de los iMAOs se debe a tres posibles mecanismos principales: la inhibición del metabolismo de las monoaminas, el incremento de la liberación de los neurotransmisores y el bloqueo de otras enzimas involucradas en la producción de otros neurotransmisores (Tobergte y Curtis, 2013). Los iMAOS se pueden clasificar dependiendo de su estructura (hidracinas o no hidracinas), mecanismo de acción (reversible irreversible) y de su selectividad por las isoenzimas MAO-A y MAO-B (Youdim et al., 2006). Los iMAOs son prescritos con muy poca frecuencia debido a que producen un flujo noradrenérgico muy prominente y pueden provocar efectos adversos muy peligrosos como agitación, convulsiones, sudoración, hiperventilación, movimientos anormales, rigidez muscular, taquicardia, hipertensión arterial, etc. (Willner et al., 2013).

Los TCAs fueron denominados así debido a que son moléculas conformadas por tres anillos, dos de ellos bencénicos y el anillo central con estructura variable. Los sustituyentes de la estructura pueden ser aminas terciarias o aminas secundarias y éstas les confieren actividades distintas. Los antidepresivos tricíclicos con cadenas laterales amina secundaria -e.g. desipramina, amoxapina y maprotilina-, y los metabolitos N-demetilados (nor) con porciones de amina terciaria como la norclomipramina, nordoxepina y nortriptilina actúan principalmente a través de la inhibición del transporte de noradrenalina. Por otro lado, los tricíclicos con amina terciaria como imipramina, amitriptilina y doxepina, además de inhibir el transporte de noradrenalina, inhiben también la recaptación de serotonina (Hardman et al., 2001; Tobergte y Curtis, 2013). Los TCAs pueden interaccionar también con receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ adrenérgicos y, en mucho menor medida, con receptores β adrenérgicos. Estas interacciones también contribuyen al mejoramiento del estado de ánimo (Cottingham et al., 2014).

Los ISRS son los antidepresivos más utilizados en la actualidad debido a que son mejor tolerados, producen menos efectos colaterales y tienen un esquema de dosificación más sencillo que los demás tipos de antidepresivos (Chávez-León et al., 2008; Luo et al., 2020). Como su nombre lo dice, los ISRS son fármacos con una alta selectividad por el SERT localizado en las terminales sinápticas de las neuronas serotoninérgicas que proyectan del núcleo del rafé. Su acción antidepresiva es a través de la inducción de cambios tanto a corto como a largo plazo. Uno de los principales cambios a corto plazo es que, al comienzo de su administración, producen una inhibición inmediata de la recaptura de serotonina mediante el bloqueo del SERT, lo cual, en respuesta al incremento de 5-HT en la sinapsis, promueve la activación del autorreceptor presináptico a serotonina 5HT1A. Este receptor se encarga de la regulación de la actividad general del sistema serotoninérgico a través de la regulación negativa de la síntesis de serotonina (Ohno, 2012). Por lo tanto, las concentraciones sinápticas de 5-HT se mantiene bajas durante las primeras dos semanas de tratamiento con los ISRS, lo cual explica la latencia del efecto antidepresivo de estos fármacos. Después de 2-3 semanas de administración, se produce la desensibilización del receptor 5HT1A, promoviendo la desinhibición de la neurona serotoninérgica y estableciendo su activación tónica (Figura 6) (Chávez-León et al., 2008; Ohno, 2012).

Los ISRS pueden llevar a cabo otros mecanismos que contribuyen a su acción antidepresiva como la estimulación de la neurogénesis a través de la fosforilación de CREB para la inducción de los genes que codifican para el BDNF y su receptor (Banar y cols.,2004); la estimulación de la síntesis del neuroesteroide alopregnanolona, que promueve la actividad GABAérgica (Pinna y cols., 2009) y la normalización de la actividad de los receptores a glucocorticoides al estimular la liberación de CRH a través de la activación de los receptores 5HT2, 5HT1A y 5HT1C (Tobergte y Curtis, 2013). Los fármacos antidepresivos más utilizados son fluoxetina, citalopram, escitalopram, paroxetina, fluvoxamina y setralina, de los cuales, el escitalopram es el compuesto con mayor selectividad por el SERT.

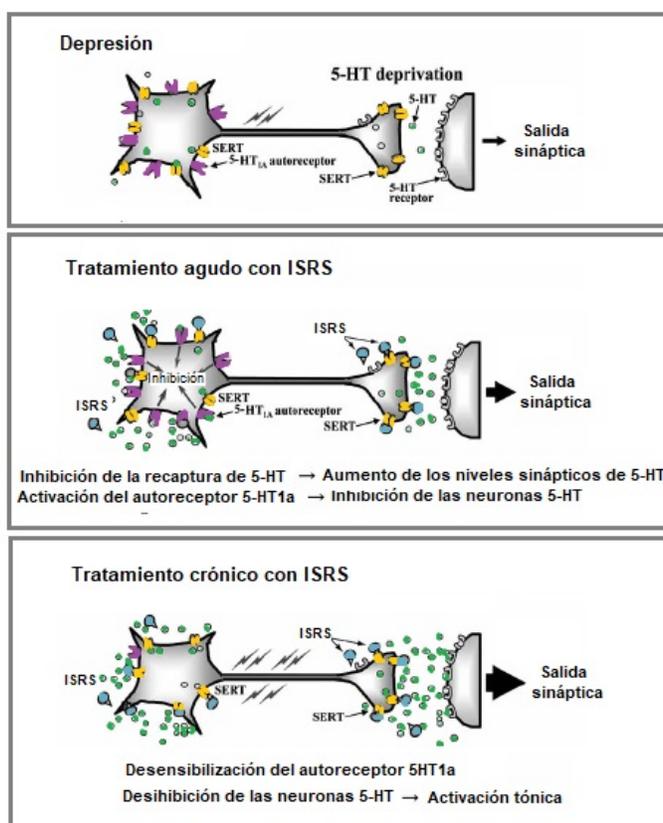


Figura 6. Mecanismo de acción de los ISRS. Tomada y modificada de Ohno, 2010

Los antidepresivos duales (5-HT/NA) tienen afinidad tanto por el SERT como por el transportador de NA (NET). Ejemplos de estos compuestos son venlafaxina,

duloxetina, desvenlafaxina, milnacipram y levomilnacipram, de los cuales la venlafaxina es el más utilizado. Asimismo, existen otros antidepresivos con otros mecanismos de acción como la mirtazapina, inhibidor de los autorreceptores alfa 2 a NA, y el bupropión, inhibidor de la recaptura de NA y DA, el cual normalmente se utiliza en casos de síntomas depresivos en el trastorno bipolar (Dear y Bateman, 2016).

Dado que los trastornos depresivos no se limitan a la disfunción de los sistemas monoaminérgicos, actualmente existen fármacos dirigidos a otros blancos terapéuticos como el sistema glutamatérgico y GABAérgico, el sistema opioide y el sistema inmune. En primer lugar, se encuentra el receptor a glutamato NMDA, el cual se considera como el receptor blanco de la segunda década del siglo XXI y cuyo principal fármaco antidepresivo es la ketamina. La ketamina es un antagonista de receptores NMDA que se utiliza normalmente como anestésico, tiene propiedades psicomiméticas significativas y ha demostrado ser un potente fármaco antidepresivo (Lener et al., 2017). El sistema GABAérgico ha sido uno de los blancos terapéuticos más novedosos para el tratamiento de la depresión. La alopregnanolona es un modulador alostérico positivos del receptor GABA A, y es ahora un tratamiento para la depresión posparto (Meltzer-Brody y Kaner, 2020). Por otra parte, existe una alta comorbilidad entre depresión y dependencia a compuestos opioides y, dado que el sistema opioide endógeno es un modulador del estado de ánimo y del sistema de recompensa, agonistas de receptores a opioides delta como la buprenorfina han demostrado inducir acciones antidepresivas en pacientes resistentes a tratamiento y con ideación suicida (Serafini et al., 2018). Finalmente, la inflamación forma parte importante de la patofisiología de la depresión, por lo tanto, en pacientes con procesos inflamatorios, algunos agentes antiinflamatorios como los inhibidores de citocinas proinflamatorias han demostrado ser eficaces para disminuir síntomas depresivos (Adzic et al., 2017).

2.6.2. Tratamientos no farmacológicos

Los tratamientos no farmacológicos consisten en la estimulación cerebral o somática y se aplican, generalmente, en casos de resistencia a los tratamientos farmacológicos y a la psicoterapia. Un ejemplo muy representativo de este tipo de tratamientos es la terapia de neuroestimulación, la cual consiste en el suministro personalizado de energía eléctrica/electromagnética al cerebro con el objetivo de

alterar la actividad neuronal con fines terapéuticos en trastornos mentales incluyendo el trastorno de depresión mayor resistente a tratamiento. Este tipo de terapia puede ser de manera no invasiva -e.g. estimulación magnética transcraneal y terapia electroconvulsiva, o de manera invasiva -e.g. estimulación cerebral profunda y estimulación del nervio vago (Malhi y Mann, 2018). Más recientemente, se ha utilizado la estimulación transcraneal “Theta-Burst”, en la cual se induce la plasticidad cortical con mayor precisión que la técnica convencional mediante la emisión de frecuencias “Theta” muy similares a aquellas producidas por el cerebro (Voineskos et al., 2020). Para llevar a cabo este tipo de terapias, es fundamental comprender y clarificar ciertos puntos importantes como; la elegibilidad del paciente, tipo de terapia de neuroestimulación, las ventajas de utilizar esta terapia sobre otros tipos de tratamientos, en qué región cerebral aplicar la terapia, el tipo de estimulación cerebral (incremento/disminución de la actividad cerebral), cómo llevar a cabo la estimulación (continua, intermitente, etc.).

2.7. Prevalencia de la depresión en hombres y mujeres

Debido a su alta prevalencia a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a los trastornos depresivos como trastornos mentales “comunes”, ya que se estima que alrededor del 4.4% de la población (322 millones de personas) padece algún trastorno depresivo. Se estima que entre el 2005 y el 2015, la depresión tuvo un incremento global del 18.4%. De acuerdo con las Estimaciones Mundiales y Regionales de Prevalencia de la OMS (2017), los principales factores sociales asociados con el desarrollo de esta enfermedad son: pobreza, desempleo, eventos adversos, enfermedad y problemas relacionados con el consumo de alcohol y drogas.

Como en varias otras patologías, las diferencias por sexo (hormonas gonadales, carga genética y otros factores biológicos) y por género (roles sociales y normas culturales) son importantes, ya que intervienen en la predisposición que tiene un individuo para desarrollar determinado trastorno, en los síntomas manifestados, e incluso, en los síntomas reconocibles por el mismo (DSM V, 2013). En este caso, a pesar de que el riesgo de desarrollar algún trastorno incrementa con la edad para ambos sexos, los trastornos depresivos se presentan de 2 a 3 veces más

frecuentemente en mujeres que en hombres. La prevalencia a nivel mundial de la depresión en mujeres es de 5.1%, mientras que en hombres es de 3.6% (Figura 7).

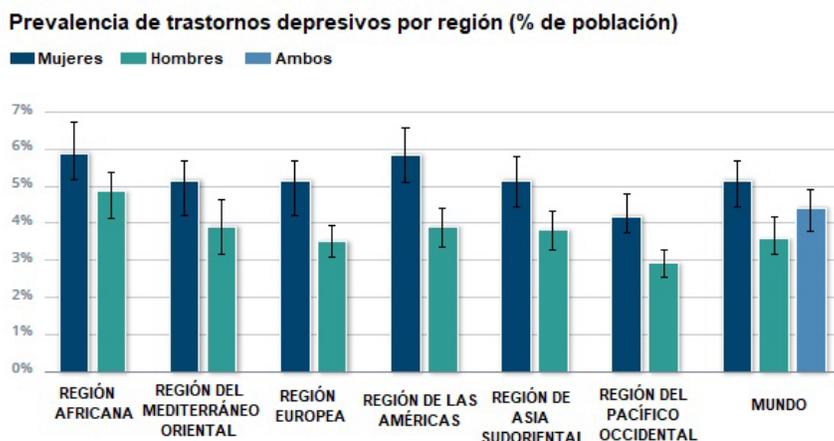


Figura 7. Prevalencia a nivel mundial de los trastornos depresivos por región (OMS,2017).

En México, el estudio epidemiológico más extenso y representativo de los trastornos mentales fue un trabajo realizado por la Encuesta Nacional de Comorbilidad en México, en el cual fueron evaluados los principales trastornos mentales (trastornos de ansiedad, depresión y de control de impulsos, uso de sustancias y otros trastornos) en población mexicana (18-65 años) de ambos sexos (Medina-Mora et al., 2009). Este estudio determinó que, a principios del año 2000, la prevalencia de los trastornos depresivos en México era del 11.1%, siendo el trastorno de depresión mayor (8.7%) y el trastorno depresivo por uso de sustancias (7.3%) los más frecuentes. Con relación a las diferencias por sexo, al igual que en la escala mundial, en México las mujeres también presentan trastornos depresivos más frecuentemente que los hombres (3.7% vs 1.6% respectivamente). Los hombres en cambio padecen mayor cantidad de trastornos por abuso de sustancias. En las mujeres, el rango de edad en el cual existe una mayor vulnerabilidad para presentar episodios depresivos es de los 45 a los 50 años (Rafful et al., 2012). La diferencia en la prevalencia de la depresión entre hombres y mujeres ha sido explicada a través de varios factores. Por un lado, las cuestiones de diferencia por género que incluyen: roles sociales, normas culturales, violencia de género y la desigualdad de carga de trabajo en las labores domésticas y familiares (Rafful et al., 2012). Por otro lado, existen también las cuestiones asociadas al sexo,

las cuales están determinadas por factores biológicos como la carga genética o el estado hormonal.

2.8. Trastornos depresivos en la menopausia

El ciclo reproductivo femenino involucra un complejo sistema de retroalimentación entre el cerebro, la hipófisis y el tracto reproductivo y se ve reflejado en los ciclos menstruales. El inicio de los ciclos menstruales se da en la pubertad como resultado de la maduración del eje Hipotalámico-Hipófisis-Gonadal (HHG), cuyo principal objetivo es inducir la ovulación regular que permita, en un momento dado, la concepción para la creación de un nuevo organismo. El ciclo reproductivo de la mujer implica cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales en los órganos que lo componen. De esta manera, la función del eje HHG comienza en el núcleo paraventricular del hipotálamo, el cual secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el sistema portal de la adenohipófisis. Dependiendo de la amplitud y frecuencia de los pulsos que genere la GnRH, la adenohipófisis sintetiza y libera a la circulación sistémica las hormonas gonadotrópicas, folículo estimulante (FSH)- por pulsos lentos, o luteinizante (LH)- por pulsos rápidos. La FSH estimula a la maduración del óvulo/secreción de estradiol (fase folicular), y la LH estimula la ovulación/ formación del cuerpo lúteo/secreción de progesterona y estradiol/ engrosamiento del endometrio (fase lútea); ambas a nivel ovárico. El aumento en los niveles de estradiol durante la fase folicular estimula la secreción de LH y con ello se da la ovulación. La función de la FSH está regulada por el complejo proteico activina e inhibina; las cuales, como su nombre lo indica, activan e inhiben la síntesis y secreción de FSH, respectivamente. Al final de la fase lútea, sino se produce un embarazo, el endometrio se descama como menstruación, reiniciando entonces un nuevo ciclo menstrual (Henriet et al., 2012) (Figura).

La menopausia se define como el cese permanente de la menstruación, y se determina a partir de presentar amenorrea durante por lo menos 12 meses sin alguna causa aparente (Gyllstrom et al., 2007). Esta etapa marca el término de la etapa reproductiva de la mujer y conlleva varios cambios somáticos y psicológicos que afectan en gran medida la calidad de vida de las mujeres. Dentro de estos cambios, se destaca un aumento considerable en el riesgo de padecer episodios depresivos

(Borrow y Cameron, 2014b; Gyllstrom et al., 2007; Rajewska y Rybakowski, 2003; Sassarini, 2016). El proceso de la menopausia está conformado por: la perimenopausia, periodo de transición a la menopausia que se divide en perimenopausia temprana (ciclos irregulares) y en perimenopausia tardía (amenorrea); y por la postmenopausia, que comprende el primer año siguiente al último periodo menstrual. En general, la perimenopausia se considera el periodo con la mayor carga de síntomas abrumadores como bochornos, sudoraciones, insomnio y cambios en el estado de ánimo, los cuales son una manifestación de disfunción ovárica. En particular, el periodo de mayor vulnerabilidad para padecer depresión es la perimenopausia tardía y la postmenopausia (Bromberger y Epperson, 2018; Maki et al., 2018; Monteleone et al., 2018). La postmenopausia se caracteriza por síntomas derivados de la privación definitiva de estrógenos como atrofia urogenital, envejecimiento de la piel, osteoporosis, redistribución de la grasa corporal hacia la región central y alteraciones metabólicas (Monteleone et al., 2018)

La prevalencia de la depresión en la perimenopausia es de alrededor del 40% (Maki et al., 2018). Algunos grupos de investigación han sugerido que esto se debe principalmente a las fluctuaciones de las hormonas gonadales a las que las mujeres están expuestas a lo largo de su vida (Borrow y Cameron, 2014b; Deecher et al., 2008; Freeman et al., 2006; Gordon, Eisenlohr, et al., 2016; Kessler, McGonagle, Swartz, Blazer, 1993). En la mayoría de los casos, la prevalencia de depresión en mujeres coincide con las fases reproductivas asociadas a una fluctuación en los niveles de estradiol; por ejemplo, el trastorno disfórico premenstrual durante los ciclos menstruales, depresión postparto al finalizar el embarazo y distimia y episodios de depresión mayor durante la perimenopausia (Borrow y Cameron, 2014; Cameron et al., 2014; Douma et al., 2005; Duval et al., 2010) (Figura 8). Cabe destacar que el haber padecido episodios depresivos durante la etapa reproductiva es un factor de riesgo alto para desarrollar depresión durante la perimenopausia (Soares, 2014).

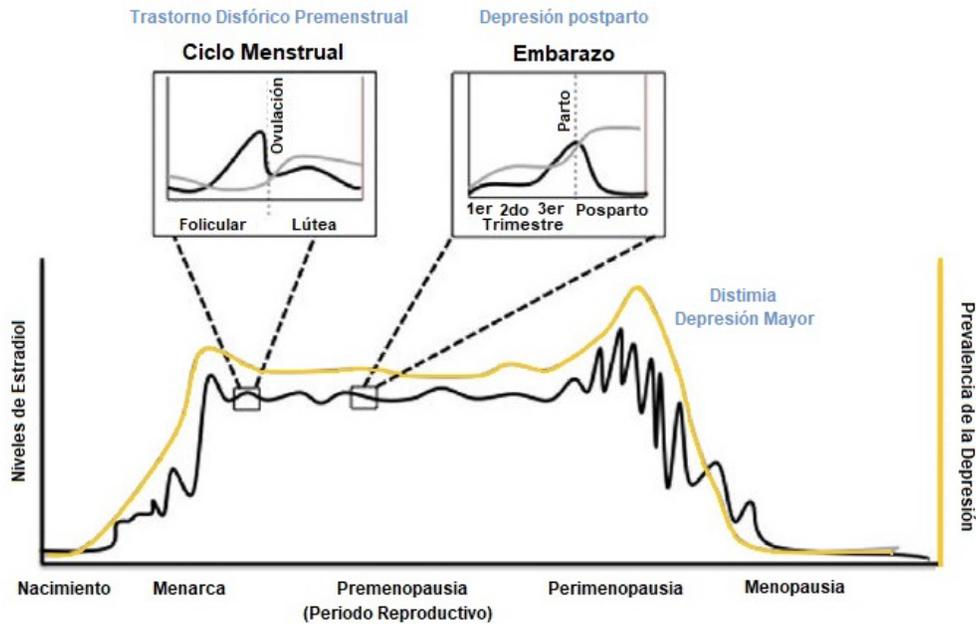


Figura 8. Prevalencia de la depresión en la vida reproductiva de la mujer y su relación con los niveles de estradiol. Tomada y modificada de Borrow y Cameron, 2014b

Fisiológicamente, la perimenopausia comienza con una disminución de inhibina B, proteína que regula negativamente a la FSH, lo cual provoca un aumento en los niveles séricos de FSH (marcador común en la clínica para determinar la perimenopausia; $FSH >10$ mUI/ml). En consecuencia, se producen periodos menstruales de duración muy variable, fluctuaciones en las concentraciones de estradiol y una disminución en las concentraciones de progesterona debido a que la fase folicular comienza a superponerse con la fase lútea. Asimismo, la disminución de inhibina B y de progesterona produce una desregulación de la retroalimentación negativa por el aumento sostenido de FSH ($>25-40$ mUI/ml) desde la hipófisis. De esta manera, el ovario pierde sensibilidad a la estimulación de dichas gonadotropinas y la producción de estradiol disminuye. Por ende, la estimulación de la LH resulta insuficiente para inducir la ovulación. La anovulación disminuye aún más la producción de progesterona y el ovario, por su parte, continúa la secreción de testosterona, cuyas concentraciones aumentan considerablemente durante la postmenopausia (Bocchino Castro, 2006; Hale et al., 2014; Monteleone et al., 2018).

2.8.1. Fluctuación estrogénica y desarrollo de trastornos depresivos

La fluctuación estrogénica que ocurre durante la perimenopausia y su relación con el desarrollo de síntomas depresivos ha sido objeto de investigación desde hace décadas. En este sentido, estudios clínicos y preclínicos han evaluado este fenómeno con el objetivo de identificar marcadores biológicos que sumen a la intervención tanto preventiva como terapéutica de los trastornos depresivos en esta etapa (Avis et al., 2001; Bromberger et al., 2007; Freeman et al., 2004, 2006; Gordon et al., 2015; Gordon, Eisenlohr, et al., 2016; Gordon, Rubinow, et al., 2016; Okada et al., 1997; Rachman et al., 1998). Los estrógenos son compuestos esteroideos -e.g. estradiol, estriol, estrona- secretados por los ovarios, la placenta (durante el embarazo), las glándulas adrenales (en muy baja proporción) y por el sistema nervioso central (SNC). El estradiol es el estrógeno más potente y el predominante durante el periodo reproductivo de las mujeres, mientras que el estriol y la estrona se incrementan durante el embarazo y la menopausia, respectivamente (Fuentes y Silveyra, 2019).

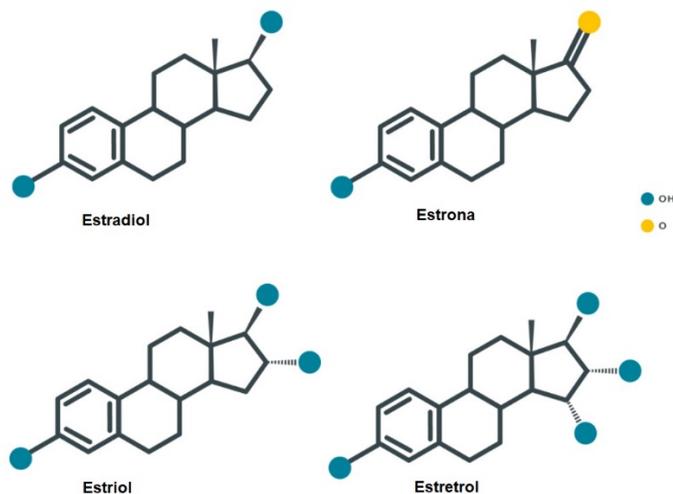


Figura 9. Estructura química de los estrógenos.

Los estrógenos intervienen en la regulación de varios procesos fisiológicos y celulares como el metabolismo, activación y regulación del sistema reproductor, modulación del sistema óseo, cardiovascular y del SNC. Estas acciones se llevan a cabo a través de la activación de receptores nucleares (ERs) y de receptores membranales a estrógenos (GPR30; mER α), los cuales al ser activados dan lugar a

las vías genómicas y no genómicas. La vía no genómica involucra principalmente a los receptores a estrógenos membranales, los cuales inducen una cascada de señalización de segundos mensajeros y proteínas intracelulares como fosfolipasa C (PLC), proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), fosfoinositol-3 cinasa (P3IK), RAS y proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Estas cascadas de señalización ocurren en segundos o minutos después de la activación de los receptores membranales, por lo que esta vía ha sido asociada con los efectos rápidos de los estrógenos (Hewitt et al., 2016). Por otro lado, la vía genómica se lleva a cabo a través de los ERs, los cuales se encuentran en el citosol en forma de homodímeros y, ante la unión del estrógeno, forman el complejo estrógeno-ER el cual se trasloca al núcleo celular y funciona como factor de transcripción al unirse a elementos de respuesta a hormona en el ADN induciendo cambios en la expresión génica. Debido a esto, la vía genómica ha sido asociada con los efectos a largo plazo de los estrógenos (Hewitt et al., 2016).

Hasta el momento se han descrito dos subtipos de ERs -i.e. ER α y ER β . Estos receptores se consideran homólogos ya que ambos presentan una estructura proteica compuesta por 5 dominios: 1) dominio N-terminal, 2) dominio de unión al ADN, 3) dominio de bisagra, 4) dominio de unión a ligando y 5) dominio C-terminal. A pesar de dicha similitud, los ER α y ER β pueden tener ligandos diferentes debido a que presentan diferencias importantes en el dominio de unión a ligando (Figura 10), y por consiguiente, producen efectos fisiológicos distintos (Krolick et al., 2018). Por ejemplo, en tejidos como mama y útero, el ER β generalmente contrarresta el efecto hiperproliferativo del ER α (Dahlman-Wright et al., 2006; Heldring et al., 2007; Paterni et al., 2014). Los ERs (α y β) se expresan en tejidos diferentes y su efecto está determinado por su densidad de expresión. El ER α presenta mayor densidad de expresión en ovarios, útero, glándula mamaria, riñón, hueso, tejido adiposo, hígado y en el SNC. Mientras que el ER β se expresa mayormente en pulmón, tracto gastrointestinal, células hematopoyéticas, células inmunes y en el SNC (Paterni et al., 2014). Es por esto que el ER α tiene un rol predominante en la regulación de la función ovárica y uterina, en la preservación de la homeostasis del esqueleto, en la regulación del metabolismo, y de algunas conductas como la conducta sexual, mientras que el ER β tiene mayor efecto en procesos relacionados con el sistema inmune y en el SNC.

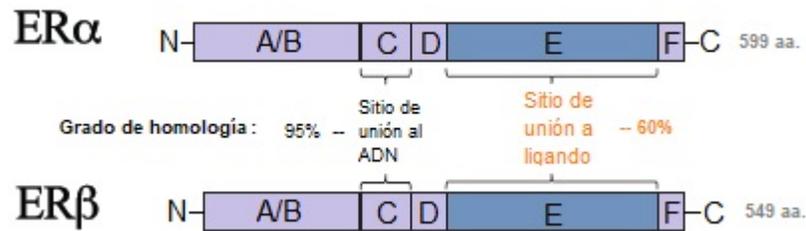


Figura 10. Estructura proteica de los subtipos de ERs (α y β). El grado de homología en el sitio de unión al ADN es del 95%, mientras que en el sitio de unión al ligando es solo del 60%.

En el SNC, los estrógenos también participan en muchos procesos como son la regulación del eje hipotalámico gonadal, la plasticidad neuronal, la neurogénesis hipocampal, el control del apetito y en la modulación de los sistemas de neurotransmisión (Willner et al., 2010). Dichos procesos son modulados, en su mayoría, a través de la activación de los ERs que se expresan particularmente en la corteza prefrontal y en estructuras subcorticales del sistema límbico (hipotálamo, hipocampo, la amígdala, tallo cerebral y el giro cingulado). Al igual que en el resto del organismo, en el SNC se expresan tanto el ER α como el ER β pero con perfiles de expresión independientes (Warfvinge et al., 2020) y presentan ciertas diferencias en su distribución (Tabla 3). Asimismo, la regulación de la expresión de los ERs es específica en cada área cerebral y depende de las condiciones endócrinas (fase del ciclo, menopausia natural o inducida), de los niveles endógenos de estradiol de la presencia de compuestos estrogénicos exógenos (Shima et al., 2003). Con relación a esto, se ha determinado que los ER α y ER β regulan diferentes procesos en el cerebro, el ER α ha sido principalmente asociado a la regulación de la función reproductiva, control del apetito y función cardiovascular. Por otra parte, el ER β ha sido más asociado a la regulación de procesos de aprendizaje, memoria, ansiedad, depresión y regulación del estado de ánimo (ter Horst, 2010; Vargas et al., 2016). La regulación del estado de ánimo por estrógenos se lleva a cabo a través de la modulación de los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, glutamatérgico y GABAérgico y a través de modular procesos de neurogénesis en el hipocampo (Borrow y Cameron, 2014b; ter Horst, 2010).

Tabla 3. Distribución de los ERs en el SNC.

Colocalización del ER α y del ER β	
Núcleo de la base de la estría terminal Amígdala (medial y cortical) Área preóptica Habénula lateral Sustancia gris periacueductal Locus coeruleus Hipocampo Corteza	
ER α	ER β
Núcleo hipotalámico: Ventromedial Órgano subfornical Núcleo arcuato	Hipocampo Corteza Bulbos olfatorios Área tegmental ventral Zona Incerta Cerebelo Glándula pineal Núcleos hipotalámicos: Supraóptico Paraventricular Supraquiasmático Tuberal

ter Horst, 2010; Warfvinge et al., 2020

El sistema serotoninérgico es uno de los sistemas neuronales que recibe mayor impacto por la fluctuación estrogénica durante la menopausia. Se sabe, por ejemplo, que la disminución de hormonas gonadales se relaciona con cambios en la afinidad del receptor 5HT1A presináptico y postsináptico en los núcleos del rafé y en el hipocampo, respectivamente (Stein et al., 2014). Por otra parte, en estudios preclínicos, se ha determinado que la depleción de estrógenos por ovariectomía en roedores produce una disminución de las neuronas serotoninérgicas, así como una menor expresión de genes relacionados con la serotonina (Bethea et al., 2002). Asimismo, en ratas periropáusicas, se encontró un número reducido de células TPH positivas en el hipocampo y la amígdala, que fue restaurada por la terapia con estrógenos (Pestana-Oliveira et al., 2018) (Pestana-Oliveira et al., 2017). Se ha propuesto que la disminución de actividad del sistema serotoninérgico se debe a los cambios en la activación del ER β que ocurren durante la perimenopausia y que

afectan el funcionamiento del sistema serotoninérgico y, por ende, el estado de ánimo (Suzuki et al., 2013).

2.9. Modelos animales para el estudio de la menopausia

Existen muchas condiciones en las que es difícil evaluar la menopausia en humanos, por lo que es común recurrir también a modelos animales para explorar de una manera más sistemática todos sus procesos y órganos involucrados. En particular, el uso de roedores en el estudio de la menopausia ha sido la práctica más común y fructífera, a pesar de las diferencias endócrinas inter-especies. En primera instancia, los roedores tienen tractos reproductivos distintos (Figura 11).

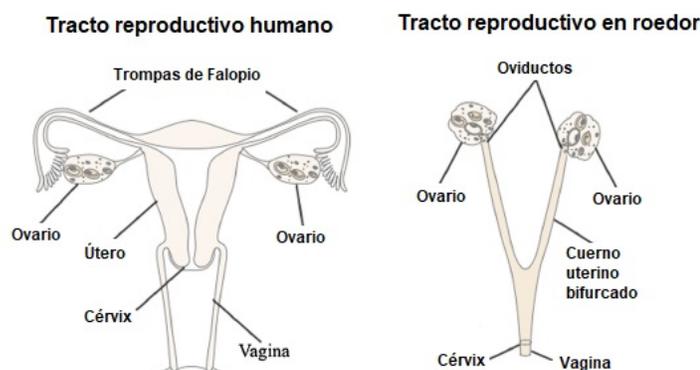


Figura 11. Tractos reproductivos femeninos de humano y de roedor. Tomado y modificado de Dellaflora et al., 2013

Por otra parte, los roedores tienen un ciclo estral que difiere en varios sentidos de un ciclo menstrual humano, por ejemplo; en el ciclo estral no hay descamación del endometrio (menstruación), ocurre cada 4-5 días y consiste en 4 fases (proestro, estro, metaestro y diestro). Mas aún, alrededor de los 9-12 meses de edad, los roedores presentan ciclos estrales irregulares que indican la senescencia reproductiva. A diferencia de la menopausia en humanos, los roedores experimentan un estado de estro persistente caracterizado por niveles altos de estradiol y niveles moderados de progesterona, LH y FSH (estropausia) (Figura 12). A pesar de dichas diferencias, los roedores se han utilizado como modelo de estudio de la menopausia para evaluar los cambios endócrinos en el cerebro y los cambios ováricos por la edad. Esto debido a que, de forma similar a lo que ocurre en mujeres, los roedores también experimentan ciclos reproductivos regulares, fluctuaciones hormonales en el ciclo estral durante la

adulthood and dysregulation of the HPG axis, ovarian changes and hormonal fluctuations during aging. Notwithstanding, through surgical techniques such as ovariectomy, it is also possible to model with precision a state of deprivation of gonadal hormones, similar to that of menopause in humans.

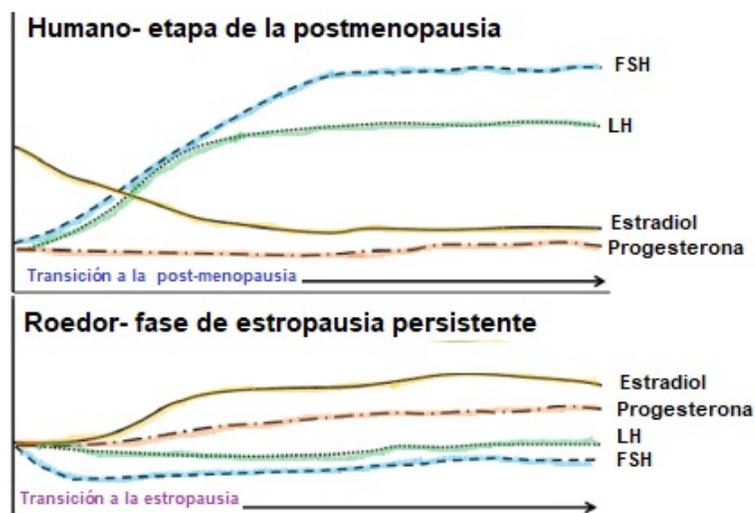


Figura 12. Comparación de niveles hormonales en roedores y humanos durante la senescencia reproductiva. Tomado y modificado de Koebele y Bimonte-Nelson, 2016b

Ovariectomy is the animal model of menopause by excellence and consists in removing the ovaries, fallopian tubes and part of the uterine horns from the peritoneal cavity. It has been determined that ovariectomy in young rats allows inducing changes similar to those that occur in menopause, such as the increase in temperature and body weight, osteopenia and, primarily, the deprivation of gonadal hormones (Okada et al., 1997). Additionally, ovariectomy also induces depressive (Okada and cols., 1997) and anxiogenic (Picazo et al., 2006) effects. At the moment of carrying out a pharmacological study in a menopause model, it is important to consider the age of the animal, since physiological conditions can differ much between young and old rats, and with that, the pharmacological effect (Récamier-Carballo et al., 2012). It is necessary to determine if in the objective of the study it is intended to consider the variables of aging in the response to the drug, or if only it is intended to know the pharmacological effect in conditions of hormonal deprivation (Koebele and Bimonte-Nelson, 2016a).

2.10. Tratamientos de los trastornos depresivos en la menopausia

El tratamiento de la depresión durante la menopausia depende de la severidad de los episodios depresivos. Para depresión leve o moderada, la terapia alternativa como las prácticas de reducción del estrés basadas en atención consciente, hipnosis clínica, respiración de ritmo y terapia cognitivo conductual resultan muy útiles (Al-Safi y Santoro, 2014; Green, Key, y McCabe, 2015). Cuando los cuadros depresivos son más severos se utiliza el tratamiento farmacológico, el cual consiste en el uso de fármacos antidepresivos, principalmente ISRS debido a que producen menos efectos adversos que otro tipo de antidepresivos como los tricíclicos o los iMAO (Gyllstrom y cols., 2007). Los ISRS más comúnmente utilizados en la menopausia son paroxetina, citalopram y escitalopram no obstante, se ha reportado que el citalopram es el antidepresivo con menos interacciones farmacológicas con otros medicamentos prescritos para otros padecimientos médicos (Handley y Williams, 2015). También, los antidepresivos duales, ISRN, como desvenlafaxina y venlafaxina son fármacos muy eficaces, especialmente en casos donde no existen complicaciones con comorbilidades médicas (Kornstein et al., 2014; Zanardi et al., 2007)

Por otra parte, en varios estudios se ha determinado que la terapia de reemplazo hormonal (TRH) para tratar los síntomas de la menopausia también contribuye a disminuir el desarrollo de los trastornos depresivos (Soares et al., 2001; Soares, 2013; Tam y Parry, 2003). La TRH está principalmente indicada para el tratamiento de los síntomas vasomotores que se producen durante la menopausia y consiste en la administración de estrógenos y progestágenos en diferentes preparaciones. De acuerdo con resultados obtenidos de estudios clínicos realizados para analizar el efecto de la terapia de reemplazo hormonal en el estado de ánimo, la tasa de depresión disminuye un 76% en mujeres con tratamiento de reemplazo hormonal, aun considerando las diferencias metodológicas y limitaciones que pudieran existir entre los estudios (Ancelin, Scali y Ritchie, 2007). Además, la terapia hormonal ha sido utilizada como estrategia para potenciar el efecto de los ISRS en mujeres que no responden al tratamiento con antidepresivos (Soares, 2013). En el área preclínica se han realizado estudios que sustentan el efecto tipo-antidepresivo de los estrógenos en ratas OVX (Estrada-Camarena, Fernández-Guasti y López-Rubalcava, 2002) y el

efecto sinérgico de la administración de estradiol con antidepresivos (Récamier-Carballo et al., 2012).

A pesar de su eficacia, tanto el uso de ISRS como de la TRH presentan muchas desventajas. Por un lado, los ISRS tienen un largo periodo de latencia, lo cual se asocia a la principal causa de abandono del tratamiento. Además, alrededor del 10% de los pacientes no tolera los efectos secundarios como insomnio o ciertos grados de ansiedad. Finalmente, alrededor del 30% de los pacientes son resistentes a tratamiento (Thase, 2018). Por otro lado, el uso de la TRH ha sido sumamente controversial debido a los riesgos que conlleva. Actualmente la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos y el Colegio Americano de Endocrinología (ACCE/ACE) respalda las advertencias emitidas por la Iniciativa de salud de la mujer (WHI) y por otros estudios clínicos controlados aleatorizados, respecto al aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer (endometrial y mamario) y de enfermedades cardiovasculares (infarto o tromboembolismo venoso), principalmente al utilizar esta terapia durante la postmenopausia y/o al ser utilizado por un periodo mayor a 5 años (Crandall et al., 2017). Debido a esto, el uso de alternativas para el tratamiento de la depresión en la menopausia ha aumentado considerablemente y, con ello, la necesidad de determinar cómo funcionan y las condiciones adecuadas para su administración.

2.11. Tratamientos alternativos para la depresión en la menopausia

Las plantas han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de muchas enfermedades desde tiempos antiguos. Actualmente, alrededor del 25% de los medicamentos prescritos en el mundo son de origen vegetal (Pandey et al, 2011). Por ello, la investigación científica ha retomado interés en el estudio de los mecanismos de acción de las plantas medicinales, ya sea a través de la evaluación de extractos o a través de la identificación y aislamiento de fitocompuestos de interés terapéutico (Mohamed et al, 2012).

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos de origen vegetal que han sido de especial interés debido a su efecto atenuante de los síntomas asociados a la menopausia. (Moreira et al., 2014). Éstos se obtienen de alimentos como uvas, cítricos, brócoli, granada, moras, tomate, manzana, leguminosas y vino tinto entre

otros. La fuente de fitoestrógenos más conocida es la soya y sus derivados (Patisaul y Jefferson, 2010). La principal característica de estos compuestos es que presentan una estructura química similar al estradiol y, por lo mismo, presentan acción estrogénica y antiestrogénica por su capacidad de interaccionar con los diferentes tipos de receptores a estrógenos (ERs), tanto nucleares (ER α , y ER β) como membranales (mER α , GPR30) (Cederroth y Nef, 2009; Clark et al., 2012; Moreira et al., 2014). Es por esto que los fitoestrógenos son denominados moduladores selectivos de los receptores a estrógenos (SERMs). Cabe resaltar que los fitoestrógenos tienen mayor afinidad por el ER β que por ER α (Kostelac et al., 2003; Kuiper et al., 1997; Manas et al., 2004; Zand et al., 2000; Zava et al., 1997a) Por otra parte, se sabe que algunos fitoestrógenos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y que incluso confieren protección al SNC en enfermedades como Alzheimer, Parkinson y depresión (Kawabata et al., 2015). De hecho, algunos ensayos clínicos y preclínicos han determinado que, además de reducir las olas de calor y la sudoración en mujeres menopáusicas (Lethaby et al., 2013), también disminuyen su estado depresivo. La administración del fitoestrógeno genistéina a mujeres postmenopáusicas produjo una disminución de su estado depresivo (Atteritano et al., 2014).

2.12. El fruto de la granada como antidepresivo en la menopausia

A pesar de que existen diversas fuentes de obtención de fitoestrógenos, el fruto de la granada (*Punica granatum L.*) ha resultado de particular interés puesto que tiene un alto contenido de compuestos polifenólicos (elagitaninos y flavonoides) con actividad estrogénica (Choi et al., 2006; Schmitt y Stopper, 2001; Elswijk, et al., 2004).

La granada es considerada como un alimento funcional y, desde tiempos antiguos, todas sus partes han sido utilizadas con fines terapéuticos (Ismail et al., 2012). Originalmente es nativa del norte de la India, pero actualmente es cultivada en muchas partes alrededor del mundo. Se sabe que la granada tiene propiedades antioxidantes (Zhang et al., 2011), antiinflamatorias (González-Trujano et al., 2015), antitumorígenicas, antimicrobianas (Lipińska et al., 2014) y de protección contra la obesidad y la diabetes (Al-Muammar y Khan, 2012); éstos beneficios han sido asociados con su alto contenido de polifenoles (González-Trujano et al., 2015).

Los polifenoles son compuestos antioxidantes muy potentes producidos por los organismos vegetales como protección contra el estrés oxidativo debido a su alta capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta capacidad está dada principalmente por sus múltiples grupos hidroxilo que funcionan como aceptores de radicales libres, evitando así la oxidación dañina de la maquinaria celular (Tsao, 2010). De manera general, los polifenoles se clasifican en compuestos flavonoides y compuestos no flavonoides. Ambos tipos de polifenoles cuentan con grupos hidroxilo, en el caso de los compuestos flavonoides se caracterizan por tener el núcleo flavano (C6-C3-C6) en su estructura química, mientras que los no flavonoides pueden presentar estructuras químicas diversas (Figura 13). Es relevante mencionar que, muchos polifenoles han sido propuestos como posible terapia adyuvante en el tratamiento de la depresión mayor debido a su actividad antidepressiva en estudios preclínicos; cuyo principal mecanismo de acción es a través de la modulación de los sistemas neurotransmisión y el BDNF (Pathak et al., 2013) (Figura 14).

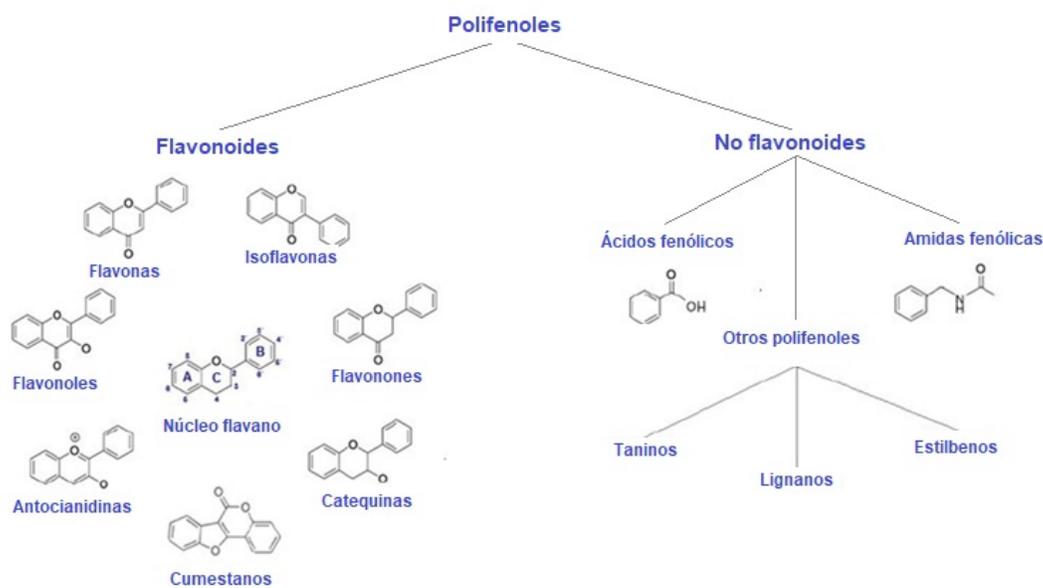


Figura 13. Clasificación general de los polifenoles. Tomado y modificado de Erika Estrada-Camarena et al., 2017

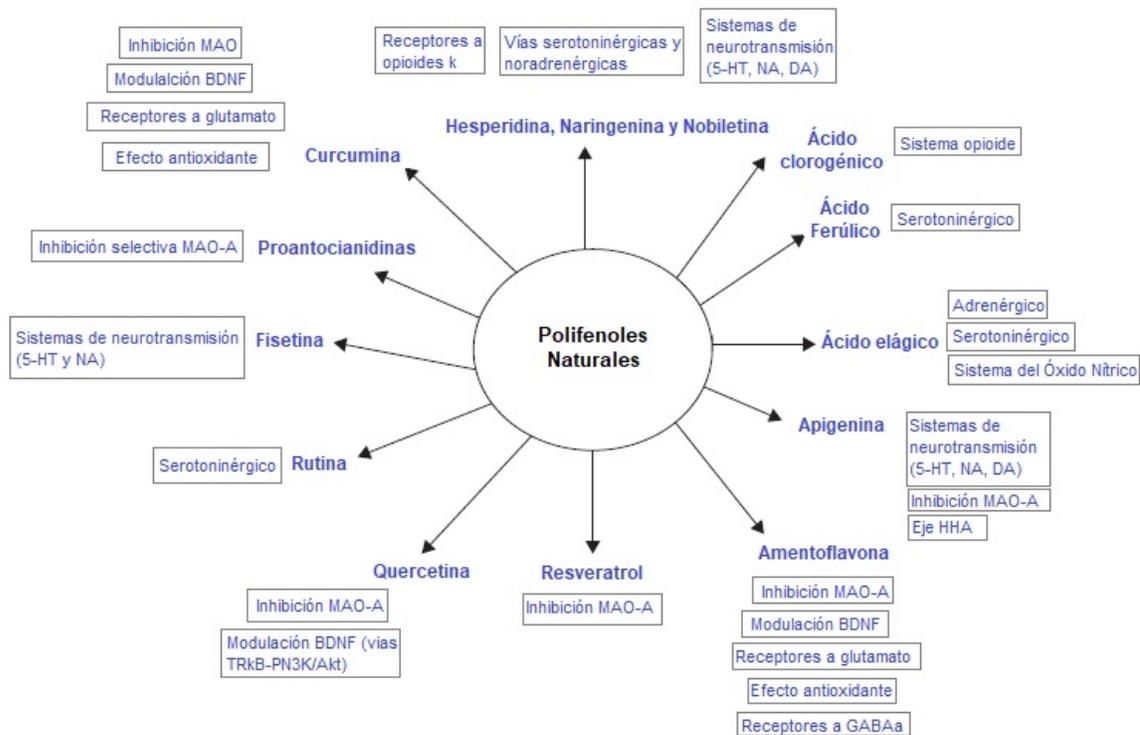


Figura 14. Mecanismos de acción antidepresiva de algunos polifenoles. Tomado y modificado de Pathak et al., 2013

El fruto de la granada es rico en fitoquímicos bioactivos que pueden variar en cantidad dependiendo de factores como la región de cultivo, la práctica de cultivo, la madurez del fruto, el clima y circunstancias de almacenamiento (Fadavi et al., 2005). Los estudios fitoquímicos se han dedicado a caracterizar su composición química específica, los cuales han reportado la presencia de diferentes compuestos en las diferentes partes del fruto de la granada. Por ejemplo, en la cáscara de granada (50% del peso total de la fruta) se encuentran principalmente elagitaninos como punicalagina (α y β) y ácido elágico, ácidos fenólicos, flavonoides como quercetina, kaempferol, rutina, hesperidina, acacetina, luteolina, compuestos de proantocianidina, minerales y polisacáridos complejos (Akhtar et al., 2015; El-Hadary y Taha, 2020). Con respecto a la parte comestible de la fruta de granada, en los arilos se pueden encontrar agua, azúcares (fructosa y sacarosa), ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido ascórbico y ácido málico, flavonoides (principalmente antocianinas), mientras que, en las semillas se pueden encontrar aceites como ácido

púnico (70-76% de todo el aceite de semilla), tocoferoles, ácidos grasos, esteroides y esteroides (Sharma y Maity, 2010; Sreekumar et al., 2014; Viladomiu et al., 2013).

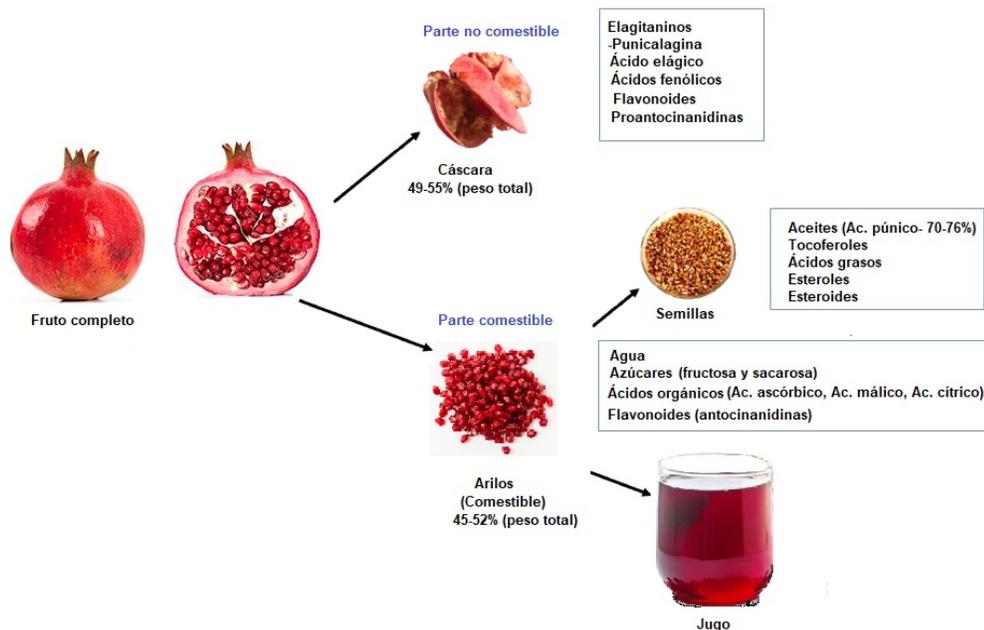


Figura 15. Principales compuestos del fruto de la granada.

Los elagitaninos son compuestos polifenólicos de alto peso molecular pertenecientes al grupo de los taninos hidrolizables ya que pueden ser fraccionados en subcomponentes en presencia agua, ácidos y bases. Los elagitaninos se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hexahidroxidifenol (HHDP) esterificados a algún azúcar (Khanbabaee y Ree, 2001). La granada contiene varios tipos de elagitaninos, los predominantes son la punicalagina (α y β) y el ácido elágico (AE) (González-Trujano et al., 2015). La punicalagina y el AE son de gran relevancia debido a que son los responsables principales de la potente actividad antioxidante de la granada (Middha et al., 2013). No obstante, la capacidad antioxidante de la punicalagina es hasta quince veces mayor que la del AE (Packová et al., 2014). Adicionalmente, se les ha atribuido otras propiedades terapéuticas -e.g. acciones antiinflamatorias, antiproliferativas, antimicrobianas, metabólicas y neuroprotectoras (García-Muñoz y Vaillant, 2014; Sharma y Maity, 2010).

De acuerdo con estudios de farmacocinética de la mayoría de los fitoquímicos, incluyendo los polifenoles, la vía de administración oral se considera como principal vía utilizada para su estudio, ya que éstos son ingeridos principalmente a través de la dieta. La biodisponibilidad de los fitoquímicos está determinada por varios factores tales como: su liberación de la matriz alimentaria; su estabilidad durante el proceso digestivo y su capacidad para traspasar el epitelio intestinal (Bohn, 2014). Como cualquier sustancia, una vez en el torrente de sanguíneo, pueden llegar a algún sitio de acción y producir efectos biológicos, ser metabolizados en el hígado o ser depurados directamente. La estabilidad de los polifenoles en el organismo está en función de su estructura química, y debido a que existen muchos tipos de polifenoles, no es posible generalizar su comportamiento a través de las diferentes etapas de la digestión.

En la granada, muchos de los polifenoles tienen actividad estrogénica (Tabla 4), algunos requieren ser biotransformados por la microbiota para llevar a cabo sus efectos estrogénicos. Por ejemplo, los elagitaninos como la punicalagina (compuesto predominante en la granada), son moléculas altamente hidrolizables que, al ser ingeridos a través de la dieta, pueden ser transformados en ácido elágico (AE) por el pH estomacal y por actividad enzimática. Debido a su estructura química altamente polar, el AE tienen una biodisponibilidad muy baja (García-Muñoz y Vaillant, 2014); no obstante, algunos estudios lo consideran altamente bioactivo (Derosa et al., 2016). Una vez en el intestino delgado, el AE es transformado en ácido gálico, pirogaliol, resorcinol y/o en moléculas activas llamadas urolitinas (Figura 16) (Landete, 2011; Romo-Vaquero et al., 2015; Seeram et al., 2004). La transformación de AE a urolitinas se lleva a cabo por la microbiota intestinal, la cual se encuentra en varios mamíferos. Se sabe que la familia de bacterias productoras de urolitinas son la *Gordonibacter* (Romo-Vaquero et al., 2015).

Tabla 4. Polifenoles de la granada con actividad estrogénica.

Compuesto	Parte de la granada	Referencia
Estrona	semilla seca	Heftmann et al., 1966 Don Woon Choi et al., 2006
Coumestrol	semillas	Moneam et al., 1988
Estriol	semillas	Abd El Wahab et al., 1998
Antocianidinas	fruto completo	Schmitt y Stopper, 2001
Campestrol	aceite de semilla	Kim et al., 2002
17 β -estradiol	aceite de semilla	Kim et al., 2002 Don Woon Choi et al., 2006
Quercetina	cáscara y semillas	van Elswik et al., 2004 Moneam et al., 1988
Luteolin Kaempferol	cáscara	van Elswik et al., 2004
Genisteína Daidzeina	semillas	Pande et al., 2009
Ácido elágico	cáscara y jugo	Papoutsi et al., 2005

Las urolitinas son moléculas conformadas por una estructura dibenzopiran-6-ona que se producen por la eliminación consecutiva de los grupos hidroxilo en diferentes fases del metabolismo (Larrosa et al., 2006). Su grado de hidroxilación está en función del tiempo de exposición y la composición de la microbiota y del tipo de hidroxilasa involucrada (González-Barrio et al., 2011). En estudios clínicos se ha identificado urolitinas en orina y en heces de humanos (Seeram et al., 2004), y en tejido intestinal, colon y próstata de ratones después del consumo de alimentos o extractos enriquecidos con elagitaninos (Seeram et al., 2007). De acuerdo con estudios *in vitro*, las urolitinas producen efectos biológicos debido a su capacidad de modular los ERs, lo cual es de interés y relevancia para este estudio. Larrosa et al. en el 2006 demostraron la capacidad de estas moléculas para unirse a los ER α y ER β a través de un ensayo de unión competitiva.

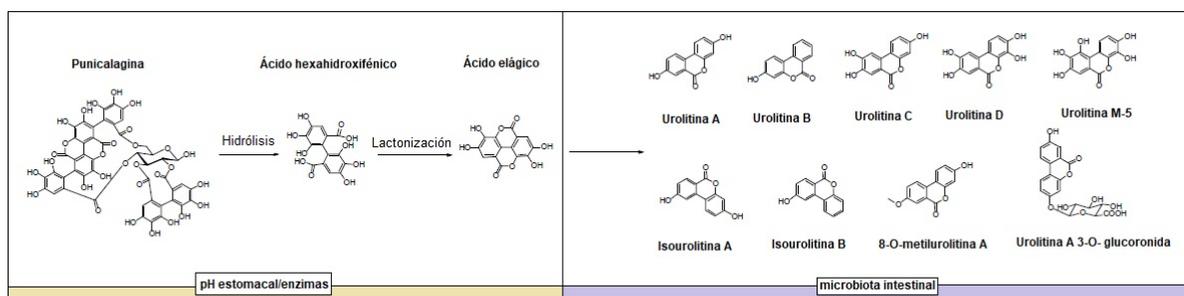


Figura 16. Metabolismo de la punicalagina en el TGI.

La granada contiene flavonoides en alta proporción, entre los más abundantes se encuentran: antocianidinas, flavonoles (quercetina y kaempferol), isoflavonas (genisteínas y daidzeina) y cumestanos (coumestrol), entre otros. A diferencia de los elagitaninos, al ser ingeridos no requieren ser biotransformados para llevar a cabo sus efectos estrogénicos. Son poco solubles tanto en solventes orgánicos como en acuosos, y por lo general se encuentran en los alimentos en forma de glicósidos (unidos a un azúcar). Su biodisponibilidad varía dependiendo de la estructura química de cada flavonoide, generalmente son resistentes al ambiente ácido del ácido del estómago y pueden ser absorbidos en el intestino solo en su forma agliconada (sin la molécula de azúcar); para ello se requiere de enzimas capaces de hidrolizar el enlace β - glicosídico como las glicosidasas microbianas o humanas. Se considera que únicamente alrededor del 1% de los flavonoides que ingresan pueden ser absorbidos (Hollman y Katan, 1997). Las agliconas absorbidas son metabolizada en el hígado (metabolismo de primer paso) y forman conjugados glucorónidos y sulfatados, los cuales pueden ser reabsorbidos en el ciclo enterohepático y excretados por la bilis para posteriormente pasar al colon, donde las enzimas microbianas pueden hidrolizar dichos conjugados, lo que permite la reabsorción de las agliconas que llevarán a cabo el efecto biológico (Hollman y Katan, 1997).

Los efectos medicinales de la granada han sido estudiados utilizando el extracto y compuestos aislados de interés terapéutico. Los componentes de la granada pueden variar en función de factores tanto intrínsecos como extrínsecos del fruto, como pueden ser: el grado de maduración del fruto al tiempo de recolección, las condiciones climáticas, el lugar de cosecha y las condiciones de almacenamiento (Wang et al., 2013). A través

de un proceso de extracción es posible separar compuestos de interés utilizando solventes con naturaleza química similar. Se ha reportado que al utilizar solventes de polaridad alta-mediana en una extracción como el agua, metanol, etanol o acetato de etilo, permite obtener principalmente polifenoles como los elagitaninos, antocianinas y algunos flavonoides, mientras que al utilizar solventes de baja polaridad como acetona, cloroformo o éter, se obtiene mayor cantidad de terpenoides, alcaloides y ácidos grasos (Masci et al., 2016). El extracto completo puede ser estandarizado para realizar estudios preclínicos y clínicos o continuar con estudios fitoquímicos de elucidación química, identificación, purificación y aislamiento de compuestos. Por ejemplo, de acuerdo con estudios preclínicos, algunos extractos metanólicos de la granada (semilla, jugo y cáscara) han probado ser efectivos para producir efectos tipo antidepresivo con ratones macho (Abdul et al., 2015). Asimismo, un extracto de granada administrado a ratones hembra ovariectomizados (modelo animal de menopausia) indujo una disminución del estado tipo depresivo e incrementó la densidad mineral ósea de los animales (Mori-Okamoto et al., 2004). Con base en lo anterior, nuestro equipo de trabajo determinó el efecto tipo antidepresivo de un extracto acuoso de granada (EA-PG) en ratas OVX utilizando la prueba de nado forzado. De manera interesante, nuestros resultados confirmaron que el EA-PG administrado por vía oral en un esquema crónico (14 días) produce un efecto tipo antidepresivo a través de la participación de los ERs. Más aún, en ese proyecto también se determinó que al administrar el extracto en combinación con un ISRS (citalopram) se produce una sumación de la acción antidepresiva individual de ambos compuestos (Valdés-Sustaita et al., 2017).

SECCIÓN III

3.1. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos farmacológicos actuales para la depresión en la menopausia (ISRS y TRE) producen efectos adversos importantes, por lo que el uso de tratamientos alternativos más eficaces y seguros se ha incrementado; por ejemplo, el uso de compuestos de origen natural con propiedades antidepresivas. El fruto de la granada tiene un alto contenido de polifenoles y fitoestrógenos que han demostrado inducir acciones antidepresivas en un modelo animal de menopausia, lo cual sugiere su potencial para funcionar como alternativa a la TRE. Debido a su alto valor nutricional y a sus múltiples beneficios terapéuticos, el fruto de la granada podría ofrecer ventajas adicionales sobre los tratamientos tradicionales con fitoestrógenos. Sin embargo, mayor evidencia se requiere acerca de los compuestos bioactivos y los mecanismos de acción como posibles blancos terapéuticos, así como también, para determinar las condiciones en las que podría utilizarse en la terapéutica de la depresión.

3.2. HIPÓTESIS

Debido al alto contenido de polifenoles, muchos de ellos con actividad antidepresiva y con actividad estrogénica, el EA-PG no requerirá del metabolismo de la microbiota intestinal para producir un efecto tipo antidepresivo en ratas Wistar OVX.

El efecto antidepresivo de EA-PG estará mediado por el ER β y por el sistema serotoninérgico.

La administración individual de punicalagina y de ácido elágico, principales compuestos del EA-PG, producirá un efecto tipo antidepresivo.

3.3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar posibles metabolitos bioactivos del EA-PG y su mecanismo de acción en el efecto tipo antidepresivo producido por el EA-PG en ratas OVX.

3.3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

En un modelo animal de menopausia (ratas OVX)

- 1) Determinar el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.
- 2) Comparar cuantitativamente el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía oral y por vía i.p. en la PNF.
- 3) Determinar la participación de los ERs en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.
- 4) Determinar la participación de ER α y ER β en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.
- 5) Determinar el rol del sistema serotoninérgico en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG en la PNF.
- 6) Determinar el efecto tipo antidepresivo de un extracto acuoso de granada de un cultivo local en la PNF
- 7) Analizar el efecto tipo antidepresivo de punicalagina y de ácido elágico como posibles metabolitos bioactivos del EA-PG, en la PNF.

Objetivos particulares

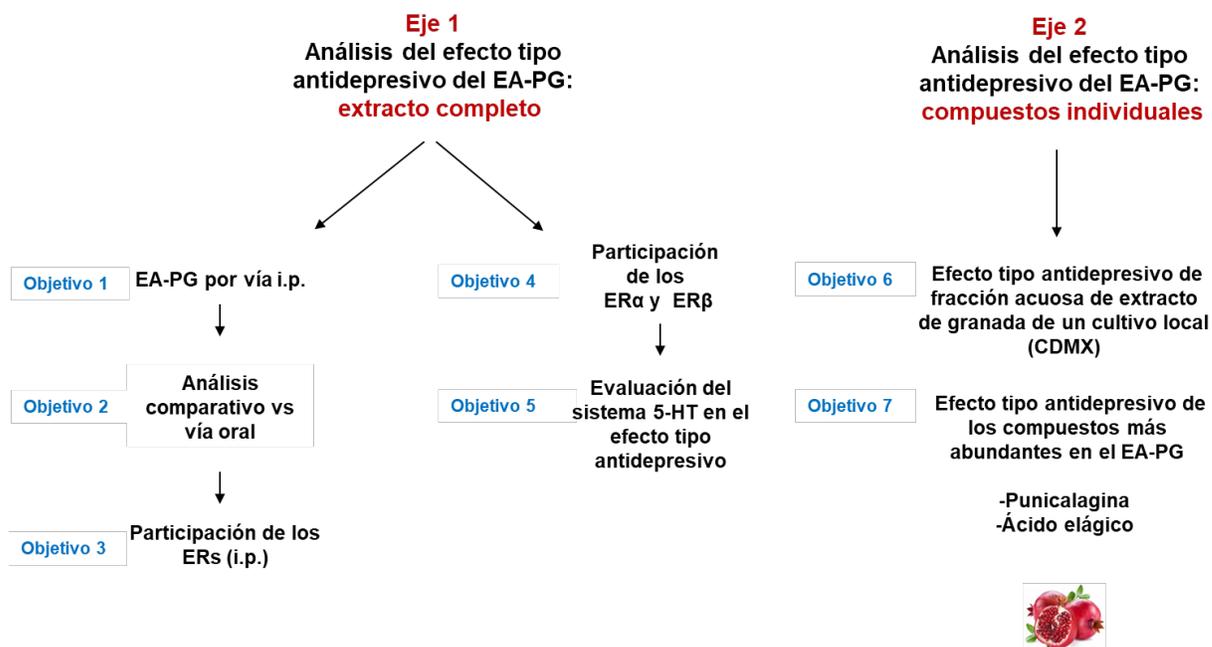


Figura 17. Objetivos particulares. El eje 1 incluye objetivos dirigidos al estudio del extracto completo mientras que el eje 2 incluye objetivos para el estudio de fracciones del extracto y sus compuestos individuales.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.5. Sujetos Experimentales

Ratas Wistar hembra OVX (12-16 semanas de edad) proporcionadas por el bioterio del "Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM)" (Ciudad de México, México). Las ratas se alojaron en grupos de cinco en jaulas de policarbonato con comida y agua *ad libitum* en un cuarto con temperatura regulada (23-25 ° C) y con un ciclo de luz / oscuridad invertida de 12/12 h (luces encendidas a las 10 h) en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Las pruebas conductuales se llevaron a cabo entre las 10.00 h y las 15.00 h en una habitación con temperatura regulada (23-25 °C). Cada sujeto experimental se evaluó una sola vez en un diseño de grupos independientes. Después de completar los experimentos, todos

los animales fueron sacrificados por exposición al CO₂ en cámaras herméticas. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicación NIH No. 8023, revisada en 1978) y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)—del CINVESTAV-IPN No. 397-07. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de sujetos.

3.6. Fármacos

El EA-PG (donado por Nutracitrus SL. -Alicante, España) se disolvió en solución salina al 0.9% y se administró por vía oral e i.p. El antagonista no selectivo del receptor de estrógenos, citrato de tamoxifeno (Sigma-Aldrich-Toluca, México) se disolvió en aceite de maíz y se administró por vía subcutánea. El antagonista selectivo para ER α , (teofilina, 8 [(benciltio) metil] - (7CI, 8CI) (TPBM) (Sigma-Aldrich-Toluca, México) y el antagonista selectivo para ER β , 4- [2-Fenil-5,7-bis (trifluorometil) pirazolo [1,5-a] pirimidin-3-il] fenol, PHTPP (Sigma-Aldrich -Toluca, México) se disolvieron en DMSO al 5% y se administraron por vía subcutánea (Santollo et al., 2010). La neurotoxina de neuronas serotoninérgicas, 5, 7-Dihidroxitriptamina (5, 7 - DHT) (Sigma-Aldrich -Toluca, México) se disolvió en 10 μ l de solución salina al 0.9%, que contenía 0.1% de ácido ascórbico y se administró en el ventrículo cerebral derecho (i.c.v.) (Furmaga et al., 2011; Vega-Rivera et al., 2013). El bloqueador de la recaptación de noradrenalina, desipramina (Sigma-Aldrich -Toluca, México) se disolvió en solución salina 0.9% y se administró por vía i.p. El compuesto punicalagina (Phytolab -Baviera, Alemania) se disolvió en Tween 80 al 2% y se administró por vía i.p. El anestésico 2,2,2-Tribromo-etanol (Sigma-Aldrich -Toluca, México) se preparó al 2% (para 25 ml; 0,5 g de Tribromo-etanol se disuelven en 2 ml de etanol y 23 ml de solución salina añadida lentamente mientras se agita) y se administró por vía i.p. La ketamina (PiSA -CDMX, México) y la xilazina (PiSA -CDMX, México) se disolvieron en solución salina al 0.9% y se administraron por vía i.p.

3.7. Procedimientos quirúrgicos

3.7.1. Ovariectomía (Modelo de menopausia)

Todos los animales utilizados en este estudio fueron OVX bajo anestesia con 2,2,2-Tribromo-etanol al 2% (0.2 mg/kg). Los ovarios se extirparon después de hacer una incisión en la cavidad abdominal media baja que se suturó y desinfectó adecuadamente con cloruro de benzalconio al 50%. Los animales permanecieron en recuperación durante tres semanas antes de llevar a cabo los experimentos (Estrada-Camarena et al., 2006)

3.7.2. Cirugía estereotáxica

Tres semanas después de la ovariectomía, el grupo de ratas destinadas para este experimento se anestesiaron con una mezcla de ketamina i.p. (0,45 ml / kg) y xilazina (0,2 ml/kg) y se colocaron en un instrumento estereotáxico. Se inyectó 5,7-DHT (200 µg en un volumen de 10 µl de vehículo) directamente al ventrículo cerebral derecho usando una cánula unida a una bomba de microinyección con un flujo de 1 µl / min. Las coordenadas para la inyección fueron: AP = -0.8 mm de Bregma, L = 1.4 mm de la línea media y H = -4.0 de la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 1998). Una vez administrado el fármaco, se retiró la cánula, se cubrió el trépano con cera ósea y se suturó y desinfectó suavemente la piel con cloruro de benzalconio al 50%. Las pruebas conductuales se realizaron una semana después de la cirugía estereotáxica. La neurotoxina 5,7-DHT (200 µg / rata, icv) se administró una vez una semana antes del esquema de administración subcrónica de la AE-PG (1 mg / kg; ip). Con el fin de proteger las neuronas noradrenérgicas de la neurotoxina, a los animales se les inyectó intraperitonealmente el inhibidor de la recaptación de noradrenalina, desipramina (25 mg / kg), 30 minutos antes de la administración de 5,7-DHT (Furmaga et al., 2011; Vega-Rivera et al., 2013).

3.8. Pruebas conductuales

3.8.1. Prueba de nado forzado (Determinación del efecto tipo antidepresivo)

Para determinar si los tratamientos producen un efecto tipo antidepresivo, los animales se colocaron individualmente en cilindros acrílicos (45 cm de altura x 20 cm de diámetro) con agua a 25±1 °C y con una profundidad de 30 cm. La PNF se realizó

en dos sesiones; una sesión de preprueba de 15 minutos (sesión que induce desesperanza conductual) y una sesión de prueba (sesión que evalúa el efecto de los tratamientos), la cual fue videograbada durante los primeros 5 minutos. En este estudio, se utilizaron dos diferentes esquemas de administración entre la sesión de preprueba y la sesión de prueba: un esquema subcrónico (24 horas- 3 administraciones por día) y un esquema crónico (14 días- 1 administración por día). Varios estudios demuestran que los cambios inducidos por la sesión de preprueba permanecen hasta por 21 días (Contreras et al., 2001; Mostalac-Preciado et al., 2011; Vega-Rivera et al., 2013), por lo tanto, los tratamientos se administraron inmediatamente después de la sesión de preprueba. Después de cada sesión de nado, las ratas se secaron con toallas de papel, se calentaron y regresaron a sus jaulas limpias (Estrada-Camarena et al., 2003; Porsolt et al., 1977).

3.8.1.1. Registro conductual

El análisis de la PNF se realizó por la técnica de muestreo de tiempo de 5 segundos. En cada periodo de 5 segundos, las conductas de inmovilidad, nado y escalamiento se registraron. La rata presenta inmovilidad cuando permanece flotando o realiza solo los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. La conducta de nado es aquella en la que la rata realiza movimientos moderados, desplazándose alrededor del cilindro o bucea. Finalmente, la conducta de escalamiento se contabiliza cuando el animal presenta movimientos vigorosos con las patas dentro y fuera del agua, usualmente contra las paredes del cilindro (Detke et al., 1995; Porsolt et al., 1977).

3.8.2. Prueba de locomoción en campo abierto

Dado que las alteraciones en la actividad locomotora por los tratamientos pueden influir en el perfil conductual de la PNF, en todos los experimentos, los animales fueron sometidos individualmente a una prueba de campo abierto videograbada durante 5 minutos justo antes de la sesión de prueba de la PNF. Para esto, las ratas se colocaron delicadamente en una de las esquinas de una jaula acrílica rectangular (43x33x20 cm) con una cuadrícula dibujada en el piso (12 cuadrados de 11x11 cm). Se evaluó el número de veces que el animal cruzó cualquier cuadrado con

sus cuatro patas (cruce). La jaula se limpió perfectamente después de cada sesión de prueba con una solución limpiadora (Estrada-Camarena et al., 2003)

3.9. Análisis estadístico

Las diferencias entre dos grupos experimentales se analizaron mediante una prueba t-student para grupos independientes. Las diferencias entre grupos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para grupos independientes, seguida de un post hoc de Tukey (comparaciones múltiples) y de Dunnet (comparaciones con el grupo control). Para establecer la interacción de los factores de tratamiento y vía de administración en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG se realizó una prueba de ANOVA de dos vías. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Sigma Plot 12.0 Systat (San José, CA, EE. UU.).

SECCIÓN IV

En esta sección se presenta el diseño experimental detallado y los resultados obtenidos por cada objetivo del proyecto.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1. Objetivo 1. Determinar el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.

De acuerdo con reportes previos de nuestro laboratorio, la administración del EA-PG por vía oral en ratas OVX produce un efecto tipo antidepresivo con la participación de los ERs (Valdés-Sustaita et al., 2017). Dado que los componentes más abundantes en la granada -i.e. elagitaninos- pueden ser biotransformados por la microbiota intestinal en metabolitos activos con actividad estrogénica (urolitinas), el objetivo de este primer experimento fue determinar si el EA-PG contiene compuestos que produzcan un efecto tipo antidepresivo sin la participación de la microbiota intestinal. Para ello, se evaluó si el EA-PG produce un efecto tipo antidepresivo por vía i.p. en esquema crónico (14 días; 1/día).

En este primer experimento, una curva dosis respuesta se construyó con 3 dosis del EA-PG (0.1, 1.0 y 10 mg/kg), las cuales fueron evaluadas utilizando la PNF. Un total de 40 ratas hembra OVX de la cepa Wistar de 12 semanas se utilizaron divididas en 4 grupos de 10 animales cada uno. El Grupo 1 (grupo control) fue tratado con solución salina, mientras que los grupos 2,3 y 4 recibieron las dosis de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg del EA-PG, respectivamente. Tres semanas después de la OVX, los animales se sometieron a la sesión de preprueba de la PNF y, 24 horas después, se inició la administración crónica (1 admón./día x 14 días) por vía i.p. Después de la última administración, las pruebas de campo abierto y la sesión de prueba del nado forzado se realizaron, las cuales fueron videograbadas para su posterior análisis (Figura 18).

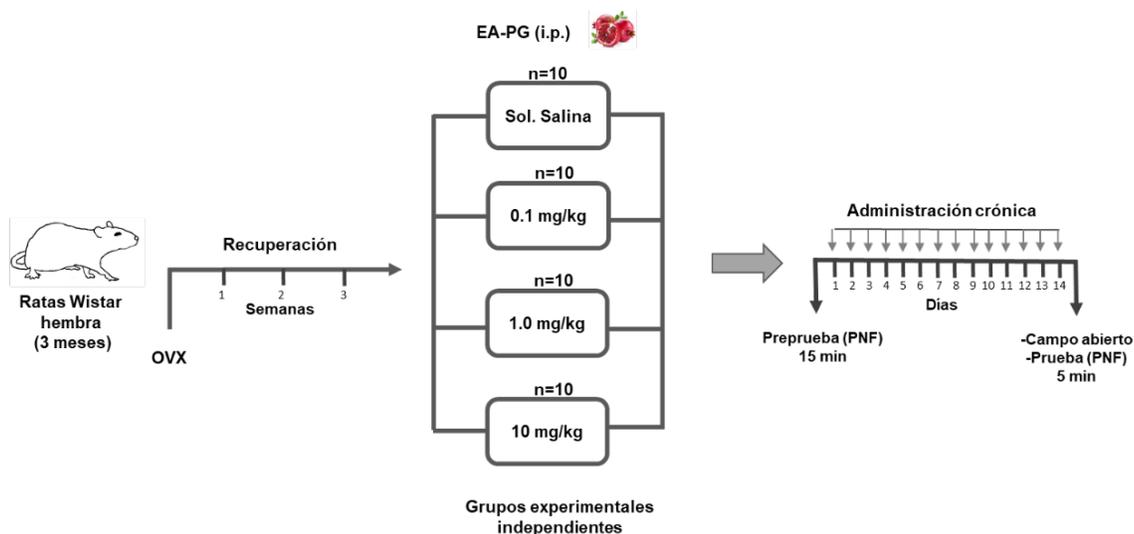


Figura 18. Esquema del diseño experimental del objetivo 1.

4.1.1. Resultados del objetivo 1

La administración crónica del EA-PG en las dosis de 1 mg/kg y 10 mg/kg por vía i.p. en ratas OVX evaluadas en la PNF produjo una disminución significativa en la conducta de inmovilidad en los grupos administrados con las dosis de 1 mg/kg y 10 mg/kg en comparación con el grupo control. Asimismo, las mismas dosis indujeron un aumento significativo en la conducta de nado, sin provocar modificaciones en la conducta de escalamiento (Figura 19). La administración crónica del EA-PG, i.p., no produjo cambios en la locomoción de los animales (Tabla 5)

Los resultados de los ANOVAs de una vía para cada una de las conductas fueron; Inmovilidad: $F_{3,36} = 12.484$; $p < 0.001$; Nado: $F_{3,36} = 19.905$; $p < 0.001$ y Escalamiento: $F_{3,36} = 0.966$; $p = \text{NS}$.

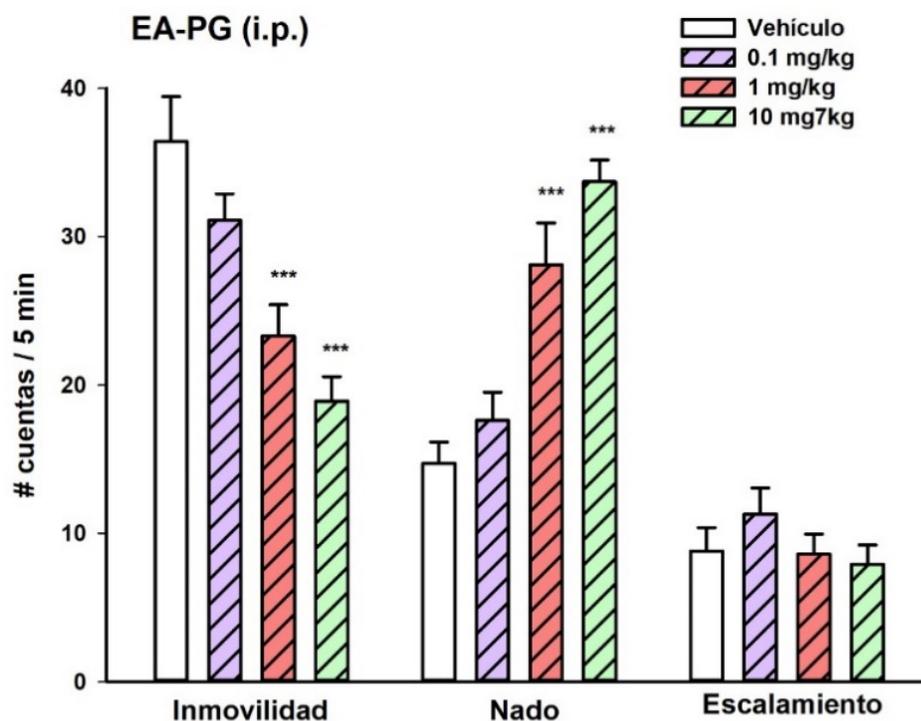


Figura 19. Efecto de la administración crónica del EA-PG (0.1, 1 y 10 mg/kg; i.p.) en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n= 10 animales por grupo). Prueba de Dunnet: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ contra el grupo control.

Tabla 5. Efecto de la administración crónica del EA-PG por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Mean \pm SEM	One Way Anova (F)	p
EA-PG	Sol. Salina	10	60.1 \pm 2.401	F _(3,35) = 1.510	NS
	.01	10	63.1 \pm 2.041		
	1	10	57.6 \pm 2.093		
	10	10	58.6 \pm 0.957		

Los datos se presentan como media \pm error estándar de cruces en una sesión de prueba de 5 minutos. Valor F de One Way Anova y prueba de Tukey posthoc para comparaciones múltiples.

4.2. Objetivo 2: Comparar cuantitativamente el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía oral y por vía i.p. en la PNF.

Contrario a lo que se esperaba, en el experimento anterior se determinó que el EA-PG produce un efecto tipo antidepresivo al ser administrado por la vía i.p., lo cual demuestra que el EA-PG contiene compuestos con actividad antidepresiva que no requieren ser metabolizados por la microbiota intestinal. Además, de manera interesante, el EA-PG no solo produjo un efecto tipo antidepresivo por la vía i.p. sino que lo produjo con una potencia aparentemente mayor al obtenido por la vía oral en nuestros reportes previos (Valdés-Sustaita et al., 2017). Esto es relevante debido a que abre la posibilidad de explorar el mecanismo de acción antidepresivo por la vía i.p. Por lo tanto, con el objetivo de determinar si administrar el EA-PG por vía i.p. produce un efecto tipo antidepresivo mayor que por la vía oral, en este experimento se comparó cuantitativamente el efecto tipo antidepresivo del EA-PG administrado por ambas vías (oral e i.p.).

Para esto, un total de 30 ratas hembra OVX de la cepa Wistar de 12 semanas, las cuales después de tres semanas de recuperación post-ovariectomía, fueron aleatoriamente divididas en dos grandes grupos (Grupo: Vía oral y Grupo: Vía i.p.) conformados de tres subgrupos cada uno- Control (Solución salina 0.9%), 1 mg/kg y 10 mg/kg. Los animales se sometieron a la preprueba de la PNF y, 24 horas después, la administración crónica (1 admón./día x 14 días) se inició por vía oral y por vía i.p., de acuerdo con el grupo en cuestión. Después de la última administración, se realizaron la prueba de campo abierto y la sesión de prueba de la PNF, las cuales fueron videograbadas para su posterior análisis (Figura 20). Una vez obtenidos los perfiles conductuales, se llevó a cabo un ANOVA de dos vías y un análisis de porcentaje de cambio de las conductas evaluadas en ambos grupos con el objetivo de determinar el efecto de la vía de administración sobre el tratamiento.

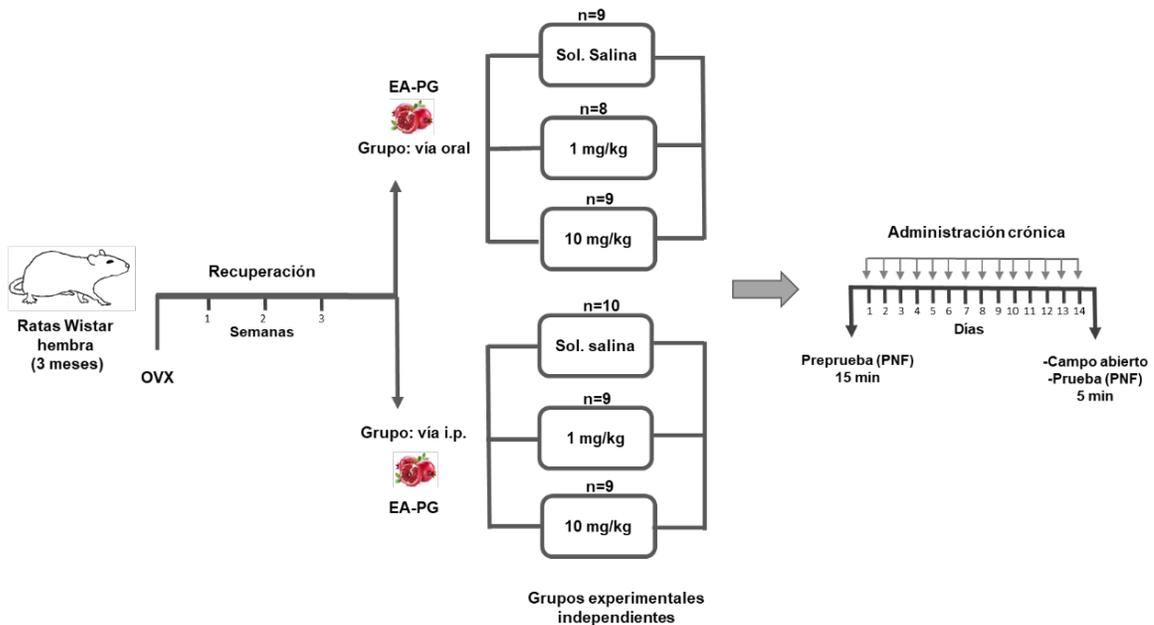


Figura 20. Esquema del diseño experimental del objetivo 2.

4.2.1. Resultados del objetivo 2

En la Figura 21 se muestran los resultados de los perfiles conductuales de los grupos administrados crónicamente con el EA-PG por vía oral y por vía i.p. en la PNF. De acuerdo con el ANOVA de dos vías, tanto en la conducta de inmovilidad (Tabla 6) como en la conducta de nado (Tabla 7) existe una interacción significativa entre los factores de tratamiento y la de vía de administración. De acuerdo con la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples por pares (Prueba de Tukey), las dosis de 1 y de 10 mg/kg en el grupo experimental Vía i.p, produjeron una disminución significativa en la conducta de inmovilidad y aumentaron significativamente la conducta de nado. De igual manera, en el grupo Vía oral, ambas dosis (1 y 10 mg/kg) disminuyeron la conducta de inmovilidad y aumentaron la conducta de nado (Figura 21). La Tabla 8 muestra los resultados de la prueba en campo abierto; ninguna dosis por ninguna vía produjo cambios en la locomoción de los animales.

EA-PG (i.p. vs oral)

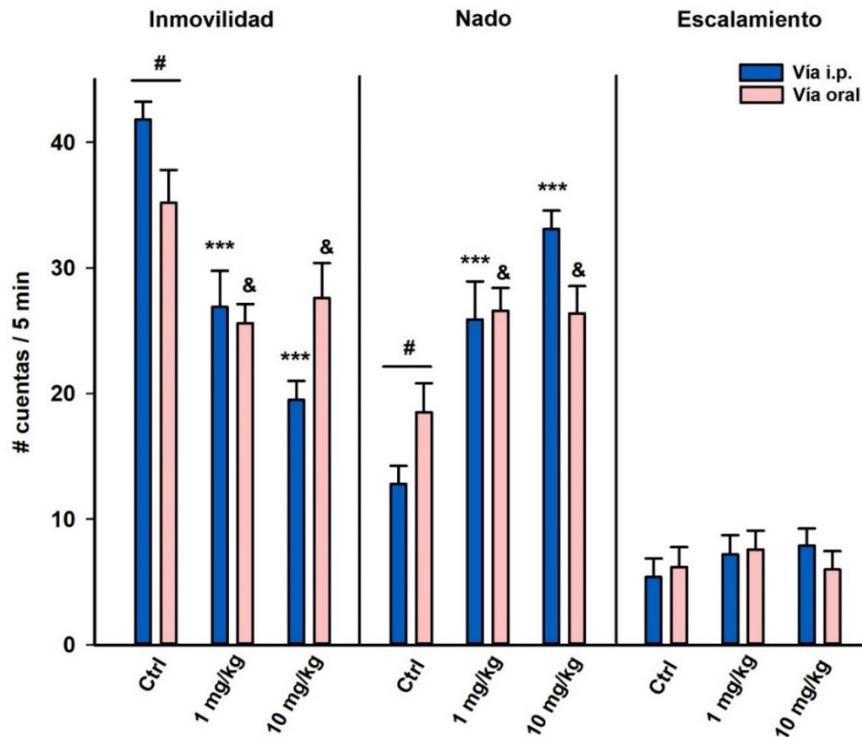


Figura 21. Efecto de la administración crónica del EA-PG (0.1, 1 y 10 mg/kg) por vía oral y por vía i.p. en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n= 10 animales por grupo). ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey: *** $p < 0.001$ contra el grupo control Vía i.p., & $p < 0.05$ contra el grupo control Vía oral, # $p < 0.05$ entre grupos control Vía i.p. y Vía oral.

Tabla 6. ANOVA de dos vías del número de cuentas de la conducta de inmovilidad de los grupos Vía oral y Vía i.p.

	DF	SS	MS	F	P
Vía de administración	1	0.06	0.066	0.0013	0.971
Tratamiento	2	2539.03	1269.51	25.81	<0.001
Vía de administración x Tratamiento	2	554.23	277.11	5.63	0.006
Residual	54	2655.4	49.17		
Total	59	5748.73	97.43		

Tabla 7. ANOVA de dos vías del número de cuentas de la conducta de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p.

	DF	SS	MS	F	p
Vía de administración	1	0.15	0.15	0.00336	0.954
Tratamiento	2	2156.133	1078.067	24.129	<0.001
Vía de administración x Tratamiento	2	389.2	194.6	4.355	0.018
Residual	54	2412.7	44.68		
Total	59	4958.183	84.037		

Tabla 8. Efecto de la administración crónica del EA-PG por vía oral y por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Media± ES	One Way Anova (F)	p
EA-PG Vía oral	Sol. Salina	10	59.9 ± 4.736	F _(2,27) = 1.255	NS
	1	10	69.4 ± 5.175		
	10	10	61.2 ± 3.768		
EA-PG Vía i.p.	Sol. Salina	10	45.5 ± 6.585	F _(2,27) = 0.296	NS
	1	10	50.7 ± 4.134		
	10	10	49.8 ± 4.234		

Los datos se presentan como media ± error estándar de cruces en una sesión de prueba de 5 minutos. Valor F de One Way Anova y prueba de Tukey posthoc para comparaciones múltiples.

Los grupos control de los grupos experimentales (Vía oral y Vía i.p.) fueron significativamente diferentes. Esto se observa tanto en la conducta de inmovilidad como en la conducta de nado. Por lo tanto, el porcentaje de cambio que producen las dosis de 1 y 10 mg/kg se analizó en cada conducta con respecto al grupo control normalizado de cada vía de administración. Finalmente, un ANOVA de dos vías se llevó a cabo con los valores de porcentaje de cambio de ambas conductas (Tablas 9 y 10).

De acuerdo con el análisis del porcentaje de cambio de las conductas de inmovilidad y de nado, las dosis de 1 y 10 mg/kg del EA-PG produjeron cambios significativamente mayores en el grupo Vía i.p. en comparación con el grupo Vía oral, en ambas conductas (Tabla 9). Por otra parte, el ANOVA de dos vías mostró que existe una interacción significativa entre los factores de tratamiento y de vía de administración tanto en la conducta de inmovilidad como en la de nado (Tabla 10). Asimismo, de acuerdo con el análisis *post hoc* (Prueba de Tukey), las diferencias significativas (valor de *p*) de los % de cambio de las conductas de inmovilidad y nado son mayores en el grupo Vía i.p. ($p < 0.001$) que en el grupo Vía oral ($p < 0.05$) Figura 22

Tabla 9. Porcentaje de cambio y valor de p (Tukey posthoc) de las conductas de inmovilidad y de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p. en la PNF.

Grupo experimental	Comparación vs control normalizado (100%)	% disminución (conducta de inmovilidad)	p
Vía oral	1 mg/kg	27.273	< 0.05
	10 mg/kg	21.591	< 0.05
Vía i.p.	1 mg/kg	35.646	<0.001
	10 mg/kg	53.349	<0.001

Grupo experimental	Comparación	% aumento (conducta de nado)	p
Vía oral	1 mg/kg	43.784	< 0.05
	10 mg/kg	42.703	< 0.05
Vía i.p.	1 mg/kg	102.344	<0.001
	10 mg/kg	158.594	<0.001

Tabla 10. ANOVA de dos vías del porcentaje de cambio de las conductas de inmovilidad y de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p.

Conducta de inmovilidad					
	DF	SS	MS	F	P
Vía de administración	1	2684.239	2684.239	11.301	0.001
Tratamiento	2	16198.846	8099.423	34.1	<0.001
Vía de admón. x Tratamiento	2	2709.285	1354.642	5.703	0.006
Residual	54	12826.238	237.523		
Total	59	34418.607	583.366		

Conducta de nado					
	DF	SS	MS	F	P
Vía de administración	1	50721.927	50721.927	32.733	<0.001
Tratamiento	2	108195.21	54097.606	34.912	<0.001
Vía de admón. x Tratamiento	2	33578.096	16789.048	10.835	<0.001
Residual	54	83675.688	1549.55		
Total	59	276170.92	4680.863		

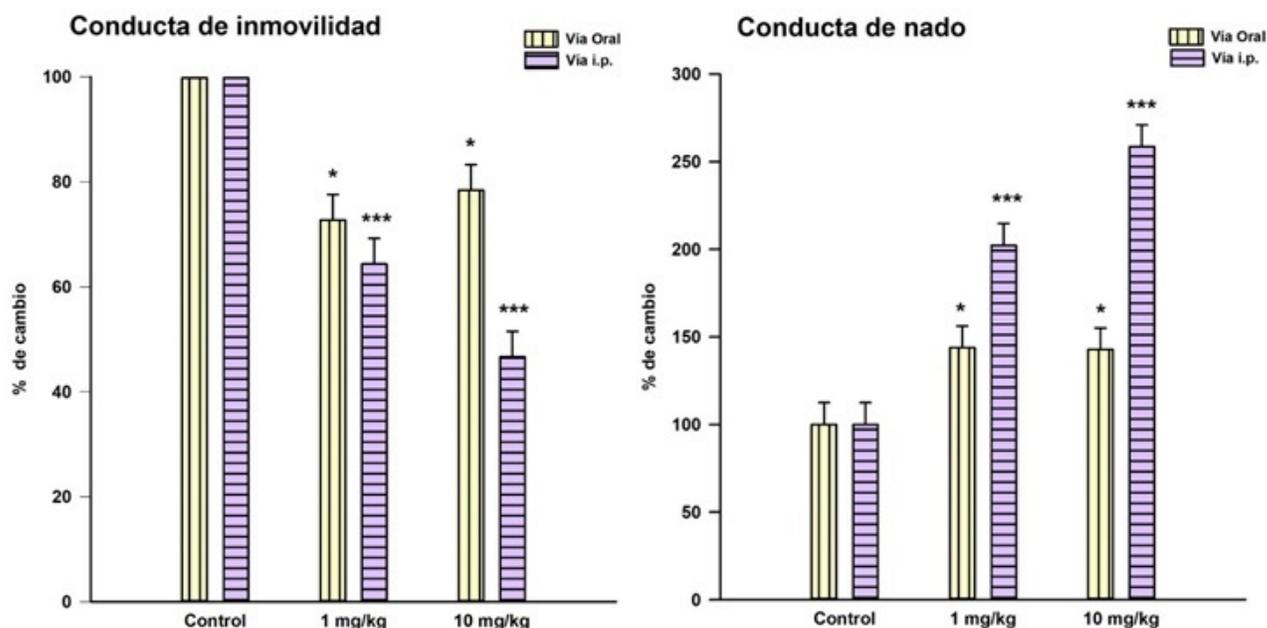


Figura 22. Porcentaje de cambio de las conductas de inmovilidad y de nado de los grupos Vía oral y Vía i.p. (1 y 10 mg/kg) en la PNF. ANOVA de dos vías (Vía de administración x tratamiento), prueba de Tukey * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparaciones contra el control normalizado.

Nota. Debido a que en los experimentos anteriores se determinó que el EA-PG administrado por la vía i.p. produjo un efecto tipo antidepressivo mayor que por la vía oral, los objetivos restantes fueron realizados con la administración del EA-PG por vía i.p.

4.3. Objetivo 3: Determinar la participación de los ERs en el efecto tipo antidepressivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.

Con el objetivo de estudiar la participación del sistema serotoninérgico en el efecto tipo antidepressivo producido por la administración intraperitoneal del EA-PG, un antagonista no selectivo de los ERs, citrato de tamoxifen (Tmx, 14 mg/kg) se administró previo a la administración del EA-PG. En este experimento se utilizaron 40 ratas Wistar hembra de 3 meses de edad, las cuales fueron OVX y, después de 3 semanas de recuperación, se dividieron en los siguientes 4 grupos experimentales: 1) Vehículo + Vehículo, 2) Tmx + Vehículo, 3) Vehículo + EA-PG y 4) Tmx + EA-PG. Los animales

se sometieron a la preprueba de la PNF (15 minutos) y 24 horas después, administraron los tratamientos. Estos consistieron en administrar el Tmx (s.c.) o su vehículo (vehículo 1: aceite de maíz), 30-40 minutos antes de la administración i.p. del EA-PG o su vehículo (vehículo 2: solución salina). Los tratamientos se administraron en esquema crónico (1 administración de ambos fármacos/día x 14 días) y 24 horas después de la última administración se llevaron a cabo las pruebas conductuales de campo abierto (5 min) y la sesión de prueba de la PNF (5 min), las cuales fueron videograbadas para su posterior análisis (Figura 23).

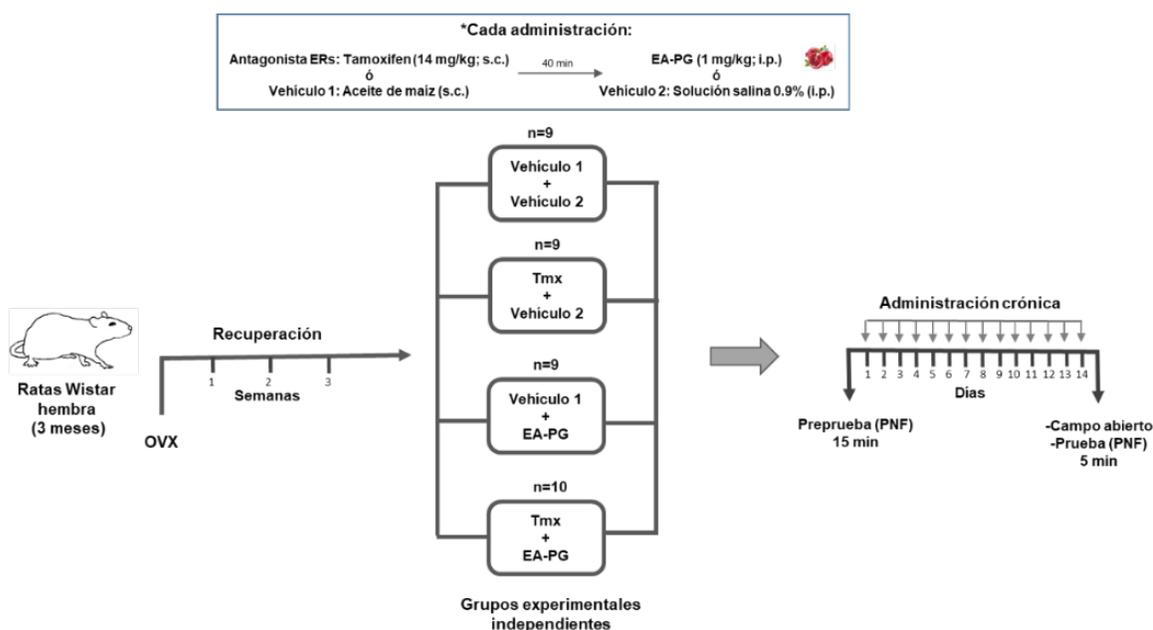


Figura 23. Esquema del diseño experimental del objetivo 3.

4.3.1. Resultados del objetivo 3

En la Figura 24 se muestran el efecto de un antagonista no selectivo de los ER administrado de 30 a 40 minutos antes del EA-PG en esquema crónico en la PNF. De acuerdo con el análisis post hoc (Prueba de Tukey) del ANOVA de dos vías, el grupo administrado con Tmx + Veh 2 no produjo cambios en ninguna conducta en comparación con el control. Por el contrario, el extracto solo (grupo Veh 1 + EA-PG), produjo una disminución significativa en la conducta de inmovilidad y un aumento en la conducta de nado con respecto al grupo control (Veh 1 + Veh 2). Asimismo, se puede observar que la administración del antagonista a ER previo a la administración del EA-

PG (grupo Tmx + EA-PG) bloqueó totalmente el efecto tipo antidepresivo producido por el EA-PG solo (grupo Veh 1 + EA-PG) al aumentar la conducta de inmovilidad y reducir significativamente la conducta de nado con respecto al grupo Veh 1 + EA-PG. La conducta de escalamiento no fue modificada por ninguno de los tratamientos. Los valores del ANOVA de dos vías se muestran en la Tabla 11. Ningún tratamiento produjo cambios significativos en la locomoción de los animales (Tabla 12).

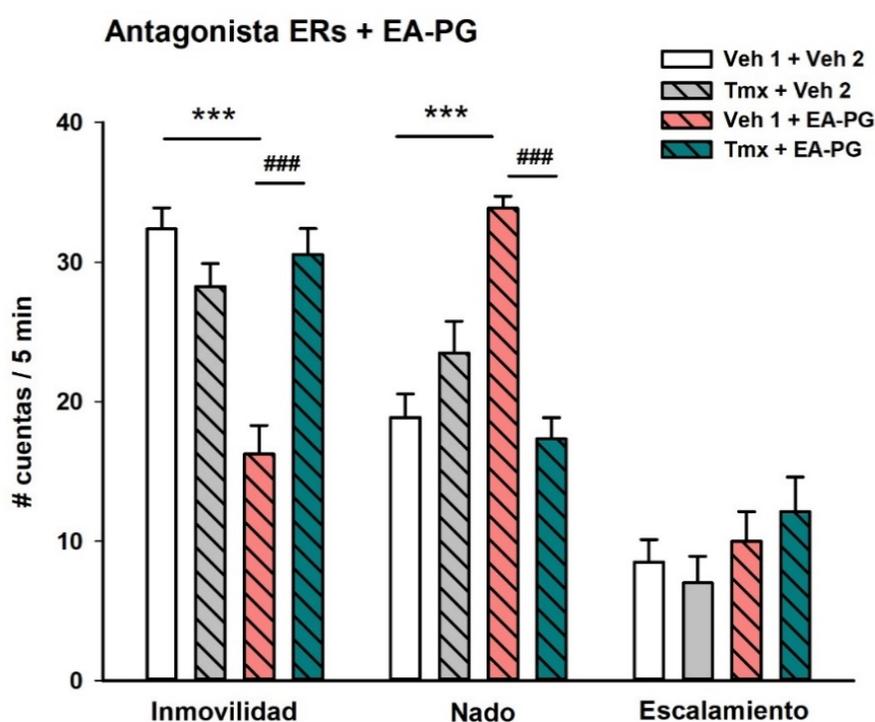


Figura 24. Efecto de la administración crónica de Tmx (14 mg/kg; s.c.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n= 10 animales por grupo). Prueba de Tukey *** $p < 0.001$ contra el grupo control (Veh 1 + Veh 2), ### $p < 0.001$ contra el grupo Veh 1 + EA-PG.

Tabla 11. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista ERs (Tmx) y con el EA-PG en la PNF.

Conducta de inmovilidad					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERs	1	213.210	213.210	2.275	0.390
Tratamiento EA-PG	1	392.867	392.867	14.930	<0.001
Antagonista ERs x tratamiento EA-PG	1	698.781	698.781	26.556	<0.001
Residual	29	763.097	26.314		
Total	32	2044.970	63.905		
Conducta de nado					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERs	1	292.129	292.129	2.759	0.230
Tratamiento EA-PG	1	160.514	160.514	7.142	0.012
Antagonista ERs x tratamiento EA-PG	1	921.657	921.657	41.010	<0.001
Residual	29	651.750	22.474		
Total	32	2023.515	63.235		
Conducta de escalamiento					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERs	1	0.768	0.768	0.0213	0.885
Tratamiento EA-PG	1	89.911	89.911	2.491	0.125
Antagonista ERs x tratamiento EA-PG	1	26.825	26.825	0.743	0.396
Residual	29	1046.889	36.100		
Total	32	1168.242	36.508		

Tabla 12. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista a ERs (Tmx) y con el EA-PG en la prueba de locomoción en campo abierto.

Antagonista a ERs (Tmx)					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERs	1	541.359	541.359	3.407	0.075
Tratamiento EA-PG	1	238.959	238.959	1.504	0.230
Antagonista ERs x tratamiento EA-PG	1	45.873	45.873	0.289	0.595
Residual	29	4.608.556	158.916		
Total	32	5.418.061	169.314		

4.4. Evaluación del efecto tipo antidepresivo del EA-PG en esquema subcrónico

De manera suplementaria, este experimento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar si el EA-PG produce un efecto tipo antidepresivo a corto plazo. Para esto, el EA-PG (1 mg/kg) y la solución salina al 0.9% (grupo control) se administraron por vía i.p. siguiendo un esquema subcrónico entre la sesión de preprueba (15 min) y la sesión de prueba (5 min) de la PNF. Por lo tanto, tres inyecciones 23.5, 5 y 1 h se administraron antes de comenzar la sesión de prueba. La dosis de 1 mg/kg del EA-PG se utilizó seleccionada a partir de los experimentos anteriores. De igual manera, todos los animales fueron evaluados en la prueba de campo abierto (5 min) antes de la sesión de prueba de la PNF. Estas dos últimas sesiones fueron videograbadas para su posterior análisis (Figura 25).

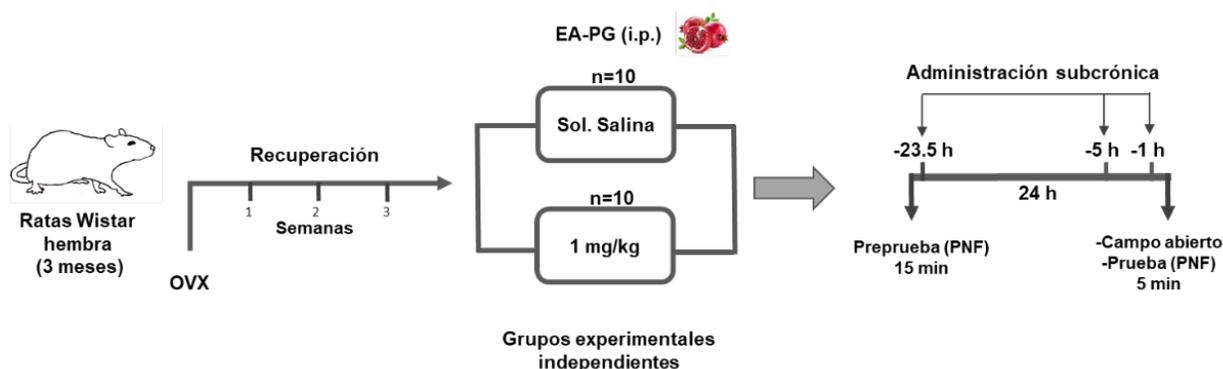


Figura 25. Esquema del diseño experimental del experimento para evaluar el EA-PG en esquema subcrónico.

4.4.1. Resultados

Con este experimento se determinó que el EA-PG (1 mg/kg) administrado por vía i.p. en esquema subcrónico también produce un efecto tipo antidepresivo en la PNF. Esto se observa al producir una disminución significativa de la conducta de inmovilidad y un aumento significativo de la conducta de nado sin producir cambios significativos en la conducta de escalamiento (Figura 26). El tratamiento no modificó significativamente la locomoción de los animales (Tabla 13). Con base en estos resultados, y con el objetivo de disminuir la exposición de los animales a múltiples

administraciones, los experimentos siguientes fueron realizados bajo un régimen de administración subcrónico.

Los resultados de las pruebas t-Student de una cola y con 18 g.l. fueron: Inmovilidad: $p < 0.001$; Nado: $p < 0.001$; Escalamiento; $p = \text{NS}$.

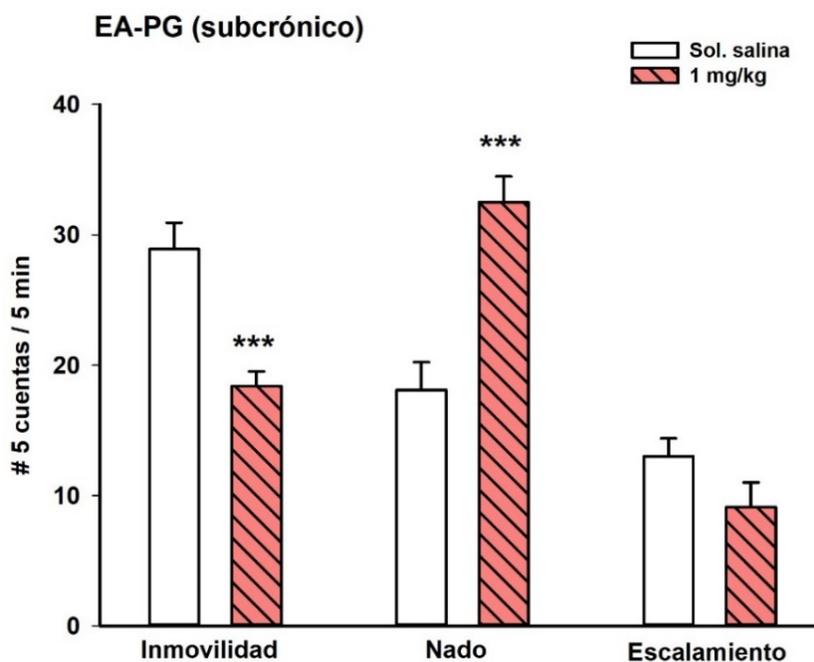


Figura 26. Efecto de la administración subcrónica del EA-PG (1mg/kg) por vía i.p. en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES ($n = 8$ animales por grupo). Prueba de t-student $***p < 0.001$ contra el grupo control (Sol. Salina).

Tabla 13. Efecto de la administración crónica del EA-PG por vía i.p. en esquema subcrónico en la prueba de locomoción en campo abierto.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Mean \pm SEM	P t-Student a una cola (g.l.=18)	
EA-PG (subcrónico)	Sol. Salina	10	39.4 \pm 1.694	P = 0.144	NS
	1	10	36.8 \pm 1.665		

Los datos se presentan como media \pm error estándar de cruces en una sesión de prueba de 5 minutos. Valor P de la prueba t de dos colas para dos grupos de comparación independientes.

Nota. Con base en los resultados anteriores, los siguientes experimentos fueron realizados siguiendo un esquema subcrónico. Esto con el objetivo de estudiar una opción de tratamiento más corto, así como también, desde el punto de vista experimental, minimizar en lo posible el tiempo de exposición de los animales a los tratamientos.

4.5. Objetivo 4. Determinar la participación de ER α y ER β en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. en la PNF.

Con el objetivo de determinar si el efecto tipo antidepresivo del EA-PG (i.p.) está mediado por algún subtipo de ER (α y β) de manera específica, el efecto del EA-PG (1 mg/kg; i.p.) se evaluó junto con la administración previa de un antagonista selectivo al ER α (TPBM; 50 μ g/rata; s.c.) o al ER β (PHTPP; 25 μ g/rata; s.c.). Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo a experimentos previos en la literatura (Santollo et al., 2010). Los antagonistas se administraron 30-40 minutos antes de cada administración del EA-PG, siguiendo un esquema subcrónico. En este experimento, ratas Wistar (3 meses) OVX se utilizaron con 3 semanas de recuperación post-ovariectomía, las cuales se dividieron aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos independientes para cada subtipo de antagonista selectivo a ER α ó ER β (n = 8-10 animales por grupo): (1) DMSO 5% + solución salina; (2) ER- α o - β antagonista + solución salina; (3) DMSO 5% + AE-PG y (4) ER - α o - β antagonista + AE-PG; posteriormente, los animales se sometieron individualmente a la preprueba de la PNF (15 minutos). Inmediatamente después de salir de la preprueba, la administración de los tratamientos en esquema subcrónico se comenzó, el cual consistió en tres inyecciones 23.5, 5 y 1 h antes de comenzar la prueba de locomoción en campo abierto y de la sesión de prueba de la PNF, las cuales fueron videograbadas para su posterior análisis (Figura 27).

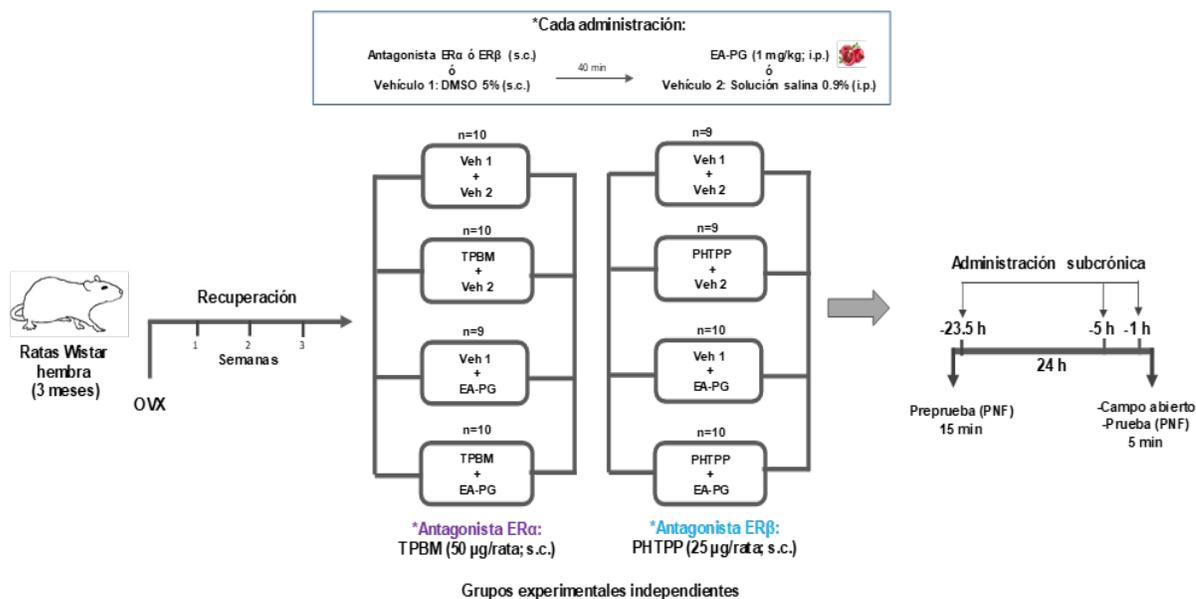


Figura 27. Esquema del diseño experimental del objetivo 4.

4.5.1. Resultados del objetivo 4

La Figura 28 muestra el efecto de los antagonistas selectivos a ER α y ER β administrados 30-40 antes del EA-PG en esquema subcrónico en la PNF. Con respecto a los resultados del antagonista de ER α (TPBM; 50 μ g/rata), la administración del EA-PG solo (grupo Veh 1 + EA-PG) y en combinación con TPBM (grupo TPBM + Veh 2) produjo una disminución en la conducta de inmovilidad y un aumento en la conducta de nado en comparación con el grupo control (Veh 1 + Veh 2), lo que indica que el antagonista de ER α no bloqueó el efecto tipo antidepressivo producido por el EA-PG solo. No se determinaron diferencias significativas en la conducta de escalamiento entre grupos (Figura 28; Panel A). De acuerdo con el ANOVA de dos vías de los resultados con el antagonista del ER α de las conductas de inmovilidad y de nado, no existe interacción entre los factores del antagonista a ER α y el factor del tratamiento con el EA-PG. De hecho, se puede observar que el único factor que produjo diferencias significativas entre los grupos experimentales es el factor del tratamiento con el EA-PG (Tabla 14).

Del mismo modo, en el experimento con el antagonista de ER β (PHTPP; 25 μ g/rata), el EA-PG solo produce un efecto tipo antidepresivo (disminución de la inmovilidad) con un aumento en la conducta de nado al ser comparado con el grupo control (Veh 1 + Veh 2). No obstante, en este caso, el antagonista de ER β , (PHTPP) en combinación con el EA-PG bloqueó el efecto antidepresivo del EA-PG, aumentando significativamente la conducta de inmovilidad y disminuyendo la conducta de nado en comparación con el grupo tratado solamente con el EA-PG. En este caso, la conducta de escalamiento tampoco fue modificada por ninguno de los tratamientos (Figura 28; Panel B). De acuerdo con el ANOVA de dos vías, tanto en la conducta de inmovilidad como en la conducta de nado, existe una interacción significativa entre el factor del antagonista a ER β y del tratamiento con el EA-PG (Tabla 15). Ninguno de los tratamientos en este experimento modificó la actividad locomotora de los animales (Tabla 16).

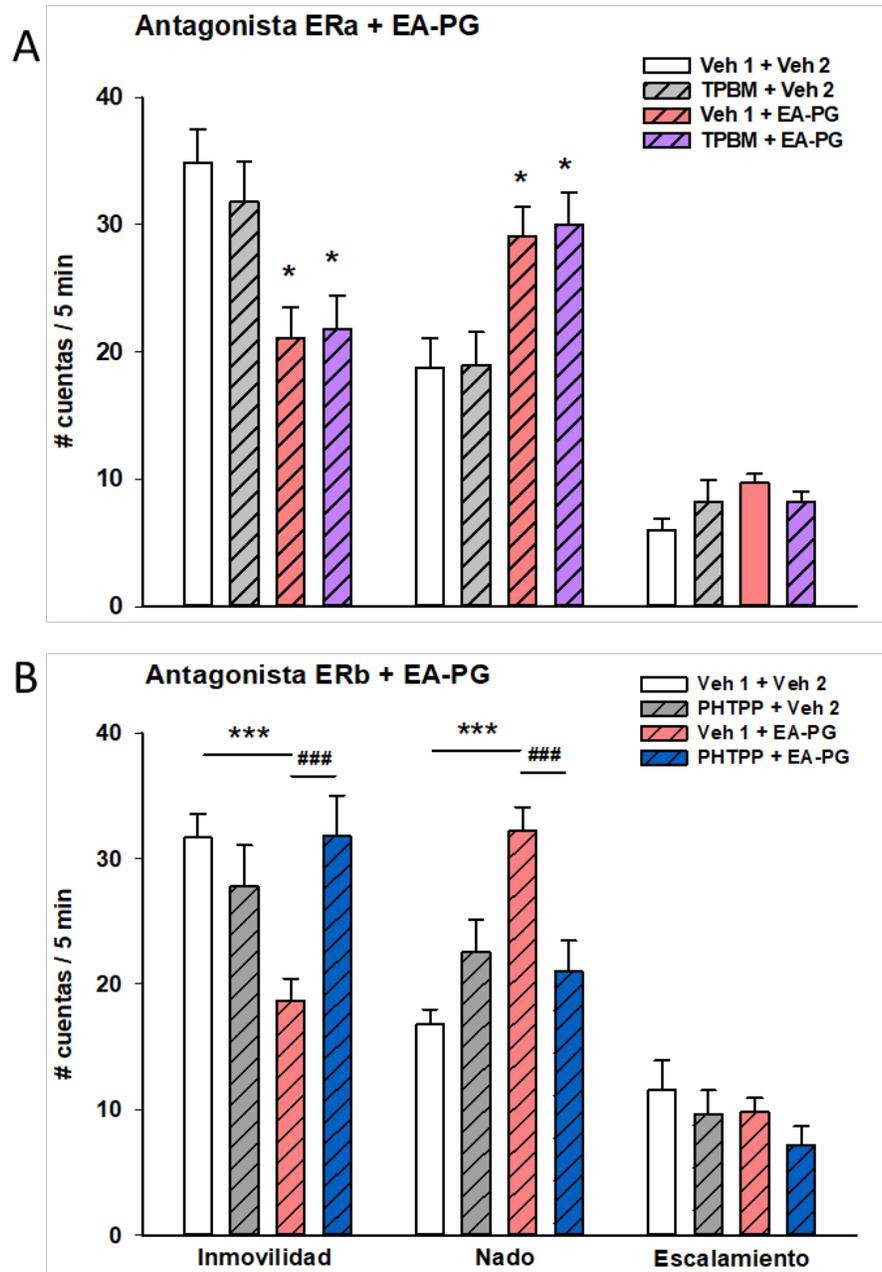


Figura 28. Efecto de la administración subcrónica de TPBM (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; s.c.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) (Panel A) y de PHTPP (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$; s.c.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) (Panel B) en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n=9-10 animales por grupo). ANOVA de dos vías y prueba de Tukey; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ contra el grupo control (Veh 1 + Veh 2), ### $p < 0.001$ contra el grupo Veh 1 + EA-PG.

Tabla 14. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista ERa y con el EA-PG en la PNF.

Conducta de inmovilidad					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERa	1	12.992	12.992	0.176	0.678
Tratamiento EA-PG	1	1364.992	1364.992	18.448	<0.001
Antagonista ERa x tratamiento EA-PG	1	33.1	33.1	0.447	0.508
Residual	35	2589.689	73.991		
Total	38	3999.692	105.255		
Conducta de nado					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERa	1	3.438	3.438	0.0598	0.808
Tratamiento EA-PG	1	1115.114	1115.114	19.408	<0.001
Antagonista ERa x tratamiento EA-PG	1	0.844	0.844	0.0147	0.904
Residual	35	2010.989	57.457		
Total	38	3136.769	82.547		
Conducta de escalamiento					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERa	1	1.308	1.308	0.101	0.752
Tratamiento EA-PG	1	32.703	32.703	2.526	0.121
Antagonista ERa x tratamiento EA-PG	1	32.703	32.703	2.526	0.121
Residual	35	453.2	12.949		
Total	38	518.974	13.657		

Tabla 15. ANOVA de dos vías del tratamiento con el antagonista ERb y con el EA-PG en la PNF.

Conducta de inmovilidad					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista Erb	1	200.948	200.948	3.093	0.088
Tratamiento EA-PG	1	189.481	189.481	2.916	0.097
Antagonista Erb x tratamiento EA-PG	1	683.579	683.579	10.52	0.003
Residual	34	2209.256	64.978		
Total	37	3324.842	89.861		
Conducta de nado					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista Erb	1	69.633	69.633	1.631	0.21
Tratamiento EA-PG	1	455.411	455.411	10.668	0.002
Antagonista Erb x tratamiento EA-PG	1	682.685	682.685	15.993	<0.001
Residual	34	1451.378	42.688		
Total	37	2684.211	72.546		
Conducta de escalamiento					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista Erb	1	47.724	47.724	1.688	0.203
Tratamiento EA-PG	1	42.222	42.222	1.493	0.23
Antagonista Erb x tratamiento EA-PG	1	1.198	1.198	0.0424	0.838
Residual	34	961.422	28.277		
Total	37	1053.5	28.473		

Tabla 16. ANOVA de dos vías del tratamiento con los antagonistas a ER (ERa y ERb) y con el EA-PG en la prueba de locomoción en campo abierto.

Antagonista a ERa (TPBM)					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERa	1	26.847	26.847	0.639	0.429
Tratamiento EA-PG	1	109.917	109.917	2.618	0.115
Antagonista ERa x tratamiento EA-PG	1	143.388	143.388	3.415	0.073
Residual	35	1.469.656	41.990		
Total	38	1.757.231	46.243		
Antagonista a ERb (PHTPP)					
	DF	SS	MS	F	P
Antagonista ERb	1	44.702	44.702	0.187	0.668
Tratamiento EA-PG	1	280.246	280.246	1.174	0.286
Antagonista ERb x tratamiento EA-PG	1	172.913	172.913	0.724	0.401
Residual	34	8.117.789	238.758		
Total	37	8.606.974	232.621		

4.6. Objetivo 5. Determinar el rol del sistema serotoninérgico en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG en la PNF.

En resultados previos, tanto aquellos realizados en 2017 (Valdés-Sustaita et al., 2017) como en el presente trabajo, el perfil conductual en la PNF inducido por el EA-PG ha mostrado un aumento en conducta de nado. De acuerdo a Detke et al., (1995) el incremento de la conducta de nado sugiere que el efecto tipo antidepresivo está mediado principalmente por el sistema de neurotransmisión serotoninérgico, por lo que este experimento se llevó a cabo con el objetivo de confirmar su participación en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG. Para ello, se administró por vía i.c.v. una neurotoxina de las neuronas serotoninérgicas que inhibe la actividad general del sistema serotoninérgico (5,7-DHT).

En el experimento, 40 ratas Wistar hembra OVX se utilizaron después de permanecer 3 semanas en recuperación. Los animales se dividieron aleatoriamente entre los siguientes grupos experimentales (n = 7-8 animales por grupo): (1) Veh 1 + Veh 2; (2) 5,7-DHT + Veh 2; (3) Veh 1 + EA-PG y (4) 5,7-DHT + EA-PG. La neurotoxina 5,7-DHT causa una degeneración de los botones sinápticos de las neuronas serotoninérgicas y, en menor medida, de los de las neuronas noradrenérgicas. Para evitar daño a las neuronas noradrenérgicas, se utilizó el inhibidor del transportador a NA (desipramina), fue administrado 40 minutos antes de la neurotoxina (Björklund et al., 1975). Todos los animales se sometieron a cirugía estereotáxica con el objetivo de recibir la neurotoxina 5,7-DHT o su vehículo (Ac. Ascórbico 1%) y permanecieron en recuperación durante una semana. Una vez recuperados, se llevó a cabo la preprueba de la PNF (15 minutos), e inmediatamente después, se comenzó la administración del EA-PG (1 mg/kg) en esquema subcrónico, es decir, tres inyecciones 23.5, 5 y 1 h antes de comenzar la prueba de locomoción en campo abierto (5 min) y de la sesión de prueba de la PNF (5 min), las cuales fueron video grabadas para su posterior análisis (Figura 29).

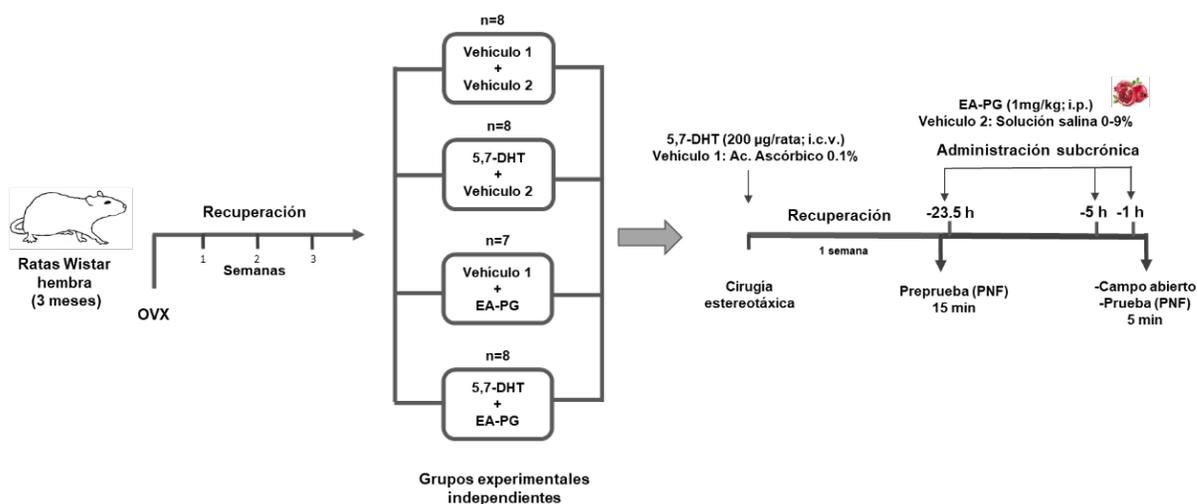


Figura 29. Esquema del diseño experimental del objetivo 5.

4.6.1. Resultados del objetivo 5

El efecto de la neurotoxina 5,7-DHT sobre el efecto tipo antidepresivo del EA-PG se muestra en la Figura 30. En este caso, la administración del EA-PG solo (grupo Veh 1 + EA-PG) produjo el efecto tipo antidepresivo al disminuir la conducta de inmovilidad y aumentar la conducta de nado de manera significativa. Además, se puede observar que el 5,7-DHT solo (grupo 5,7-DHT + Veh 2) produjo un bloqueo parcial del efecto antidepresivo del EA-PG solo (Veh 1 + EA-PG), ya que al combinarlo con el EA-PG (grupo 5,7-DHT + EA-PG), produjo un perfil conductual similar al del grupo control (Veh 1 + Veh 2) sin mostrar diferencias significativas con el grupo del EA-PG solo (grupo Veh 1 + EA-PG) en ninguna conducta. La conducta de escalamiento no se modificó en ningún grupo. El análisis del ANOVA de dos vías mostró una interacción significativa entre los factores de la lesión con 5,7 DHT y el tratamiento con el EA-PG en las conductas de inmovilidad y de nado (Tabla 17) Ninguno de los tratamientos en este experimento modificó la actividad locomotora de los animales (Tabla 18).

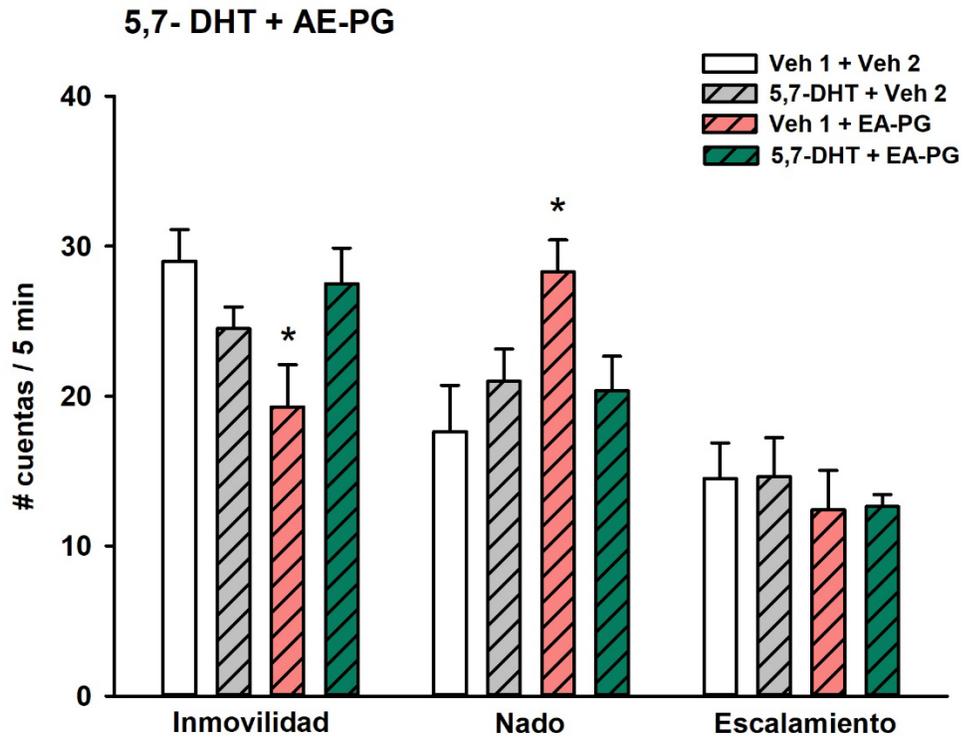


Figura 30. Efecto de la administración de 5,7-DHT (200 µg/kg; i.c.v.) + EA-PG (1 mg/kg; i.p.) en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas ± ES (n=9-10 animales por grupo). ANOVA de una vía y prueba de Tukey; *p<0.05; contra el grupo control (Veh 1 + Veh 2).

Tabla 17. ANOVA de dos vías del tratamiento con la neurotoxina 5,7 DHT y con el EA-PG en la PNF.

Conducta de inmovilidad					
	DF	SS	MS	F	P
5,7 DHT	1	26.64	26.64	0.771	0.407
Tratamiento EA-PG	1	87.054	87.054	2.319	0.139
5,7 DHT x tratamiento EA-PG	1	312.158	312.158	8.317	0.008
Residual	27	1013.429	37.534		
Total	30	1419.935	47.331		
Conducta de nado					
	DF	SS	MS	F	P
5,7 DHT	1	39.727	39.727	0.837	0.368
Tratamiento EA-PG	1	164.485	164.485	4.099	0.053
5,7 DHT x tratamiento EA-PG	1	245.951	245.951	5.183	0.031
Residual	27	1281.179	47.451		
Total	30	1735.355	57.845		
Conducta de escalamiento					
	DF	SS	MS	F	P
5,7 DHT	1	0.2	0.2	0.0053	0.942
Tratamiento EA-PG	1	32.01	32.01	0.851	0.364
5,7 DHT x tratamiento EA-PG	1	0.00985	0.00985	0.000262	0.987
Residual	27	1015.464	37.61		
Total	30	1047.548	34.918		

Tabla 18. ANOVA de vías dos del tratamiento con la neurotoxina 5,7 DHT y con el EA-PG en la prueba de locomoción en campo abierto.

Neurotoxina 5,7-DHT					
	DF	SS	MS	F	P
Neurotoxina 5,7-DHT	1	0.889	0.889	0.387	0.845
Tratamiento EA-PG	1	36.062	36.062	1.571	0.221
Neurotoxina 5,7-DHT x tratamiento EA-PG	1	0.631	0.631	0.0275	0.870
Residual	27	619.694	22.962		
Total	30	657.742	21.925		

Los experimentos anteriores se llevaron a cabo con el EA-PG, el cual procede de Nutracitrus, una empresa europea especializada en la fabricación de productos de origen natural, incluyendo extractos. Parte de nuestro interés en el estudio tipo antidepresivo de la granada se enfocó en lograr identificar si existen compuestos específicos que jueguen un papel determinante en dicho efecto. Por lo tanto, de manera paralela a los objetivos anteriores, en los objetivos 6 y 7 realizamos una serie de experimentos dirigidos a analizar el efecto de una fracción de un extracto de granada de un cultivo local con características químicas específicas, así como también, a analizar el efecto de los principales componentes de la granada (punicalagina y ácido elágico) en la PNF.

4.7. Objetivo 6. Determinar el efecto tipo antidepresivo de un extracto acuoso de granada de un cultivo local en la PNF

En el objetivo 6 de este estudio, un extracto de granada de un cultivo local de la Ciudad de México se elaboró con la finalidad de aislar y evaluar fracciones del extracto y caracterizar los compuestos bioactivos con características químicas diferentes para evaluar su efecto en la PNF.

Para ello, una extracción acuosa líquido-líquido del fruto completo de la granada se realizó utilizando agua como solvente, el cual fue liofilizado para obtener un sólido color rojo/naranja (Extracto inicial) con una consistencia adherente y con apariencia de pequeños cristales. A este liofilizado se le realizó un análisis cromatográfico por UPLC a 254 nm y se almacenó en congelación hasta el siguiente proceso. Una vez descongelado, se agregó agua destilada para rehidratarlo y se realizó una primera partición con hexano. Posteriormente, la fase acuosa resultante se tomó y una segunda partición con diclorometano se realizó. Asimismo, la fase acuosa resultante se volvió a tomar y se realizaron lavados y filtrados con metanol hasta obtener un precipitado color amarillo (Extracto Final), el cual fue analizado por UPLC a una longitud de onda de 254 nm. Los perfiles cromatográficos del Extracto Inicial y del Extracto Final fueron comparados con el perfil cromatográfico del extracto obtenido en España (EA-PG) utilizado en los experimentos anteriores (Figura 31). Los perfiles cromatográficos de los Extractos (inicial y final) obtenidos de la granada del cultivo local se compararon además con los picos cromatográficos de los estándares de

referencia de punicalagina y ácido elágico, principales compuestos contenidos en la granada.

El Extracto Final se utilizó a las dosis de 0.1 y 1.0 mg/kg para determinar si producía un efecto tipo antidepresivo en la PNF en ratas OVX. Para ello, ratas Wistar OVX de 3 meses (n=30) se utilizaron, las cuales después de 3 semanas de recuperación. Se dividieron aleatoriamente en 3 grupos experimentales: control (Sol. Salina), dosis de 0.1 mg/kg y 1.0 mg/kg. Los grupos experimentales se sometieron a la preprueba de la PNF (15 minutos) y 24 horas después, comenzó el tratamiento crónico del Extracto Final (1 administración vía i.p./día durante 14 días). Veinticuatro horas después de la última administración, se realizó la prueba de locomoción en campo abierto (5 min) y la sesión de prueba de la PNF (5 min) (Figura 32).

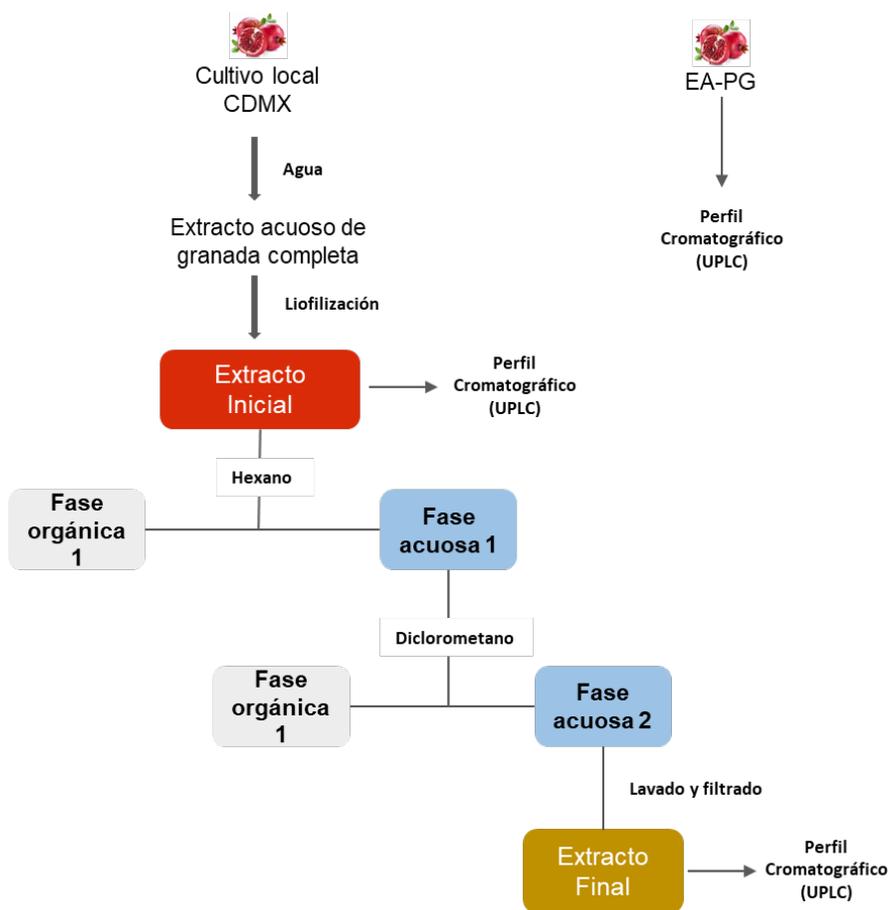


Figura 31. Procedimiento de obtención del precipitado de la fracción acuosa (Extracto Final) del extracto de *Punica granatum* de cultivo local. (Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales; INPRFM)

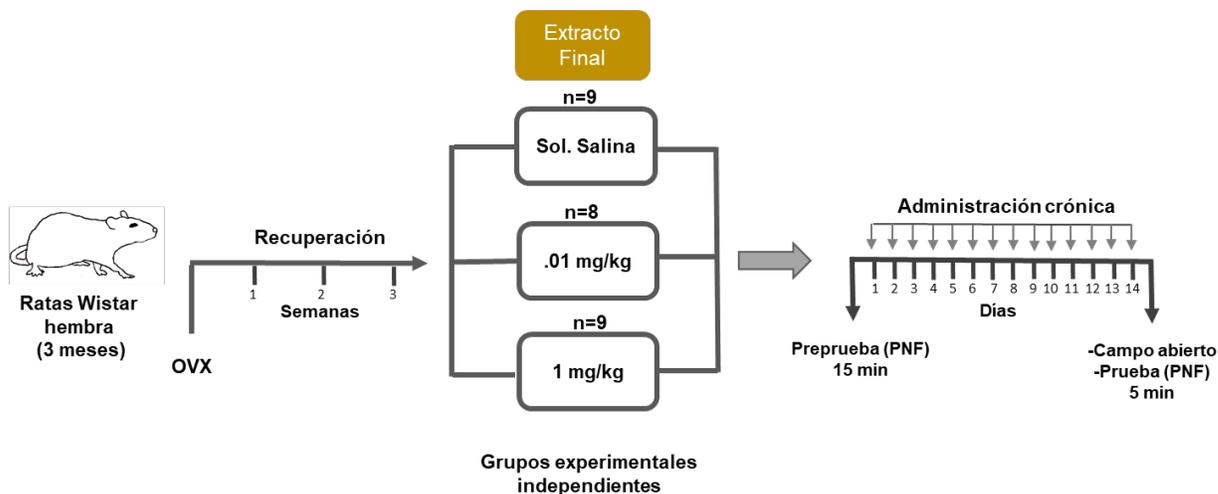


Figura 32. Diseño experimental de la determinación del efecto tipo antidepresivo del Extracto final de la fracción acuosa del extracto de granada del cultivo local.

4.7.1. Resultados del objetivo 6

Perfiles cromatográficos

En la Figura 33 se muestran los perfiles cromatográficos del EA-PG (Panel A) y de los extractos de granada del cultivo local de la CDMX obtenidos con solventes orgánicos: Extracto Inicial (Panel B) y Extracto Final (Panel C). Se puede observar que el EA-PG y el Extracto Inicial muestran picos característicos en los mismos tiempos de retención (TR): EA-PG (4.48, 5.48, 8.08 y 8.98 min), Extracto Inicial (4.49, 5.48, 8.08 y 8.98 minutos), lo cual indica la presencia de los mismos compuestos. Con respecto al Extracto Final (TR: 7.87 y 8.97 minutos) se puede observar que únicamente la señal de 8.97 minutos es similar a las señales del EA-PG y del Extracto Inicial, mientras que la señal de 7.87 no corresponde con ninguna de los cromatogramas previos.

Por otra parte, en la Figura 34 se muestran los perfiles cromatográficos del Extracto Inicial (Panel A) y del Extracto Final (Panel D) junto con los estándares de punicalagina (Panel B; TR: 5.74 min) y de ácido elágico (Panel C; TR: 8.96 min). Se puede observar que el Extracto Inicial contiene tanto punicalagina (TR: 5.47min) como ácido elágico (TR: 8.96 min), mientras que el Extracto Final sólo contiene ácido elágico (TR: 8.97).

Efecto de la administración del Extracto Final en la PNF

El efecto conductual de la administración del Extracto Final en la PNF se muestra en la Figura 35. Se puede observar que ninguna dosis produjo cambios significativos en ninguna de las conductas. Asimismo, el Extracto Final tampoco modificó la locomoción de los animales (Tabla 19).

Los resultados de los ANOVAs de una vía y las pruebas *post hoc* (Prueba de Tukey para comparaciones múltiples fueron: Inmovilidad ($F_{(2,27)} = 0.347$; NS); Nado ($F_{(2,27)} = 1.495$; NS); Escalamiento ($F_{(2,27)} = 1.001$; NS).

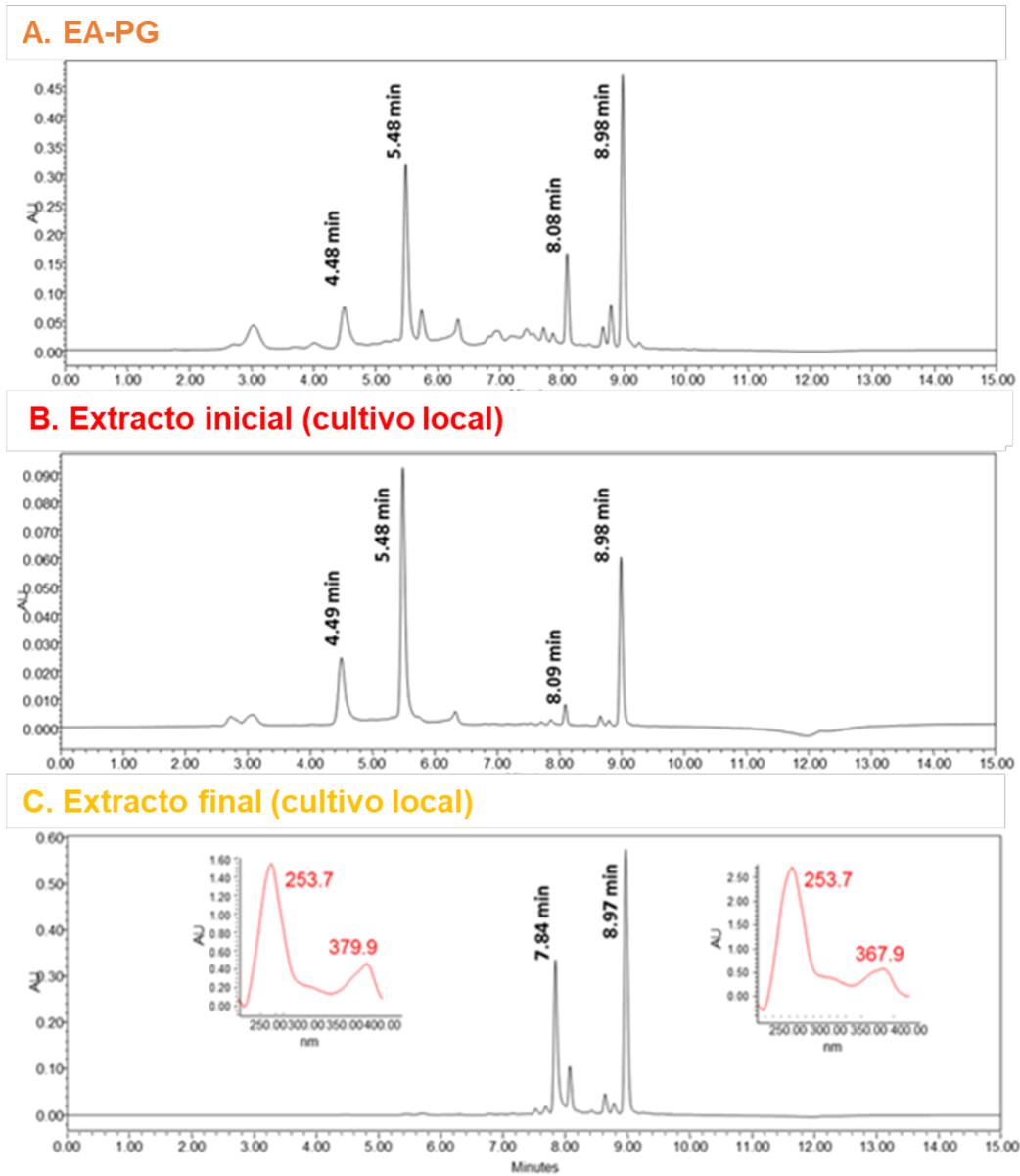


Figura 33. Análisis cromatográfico por UPLC del: EA-PG (Panel A), Extracto Inicial (Panel B) y Extracto Final (Panel C)

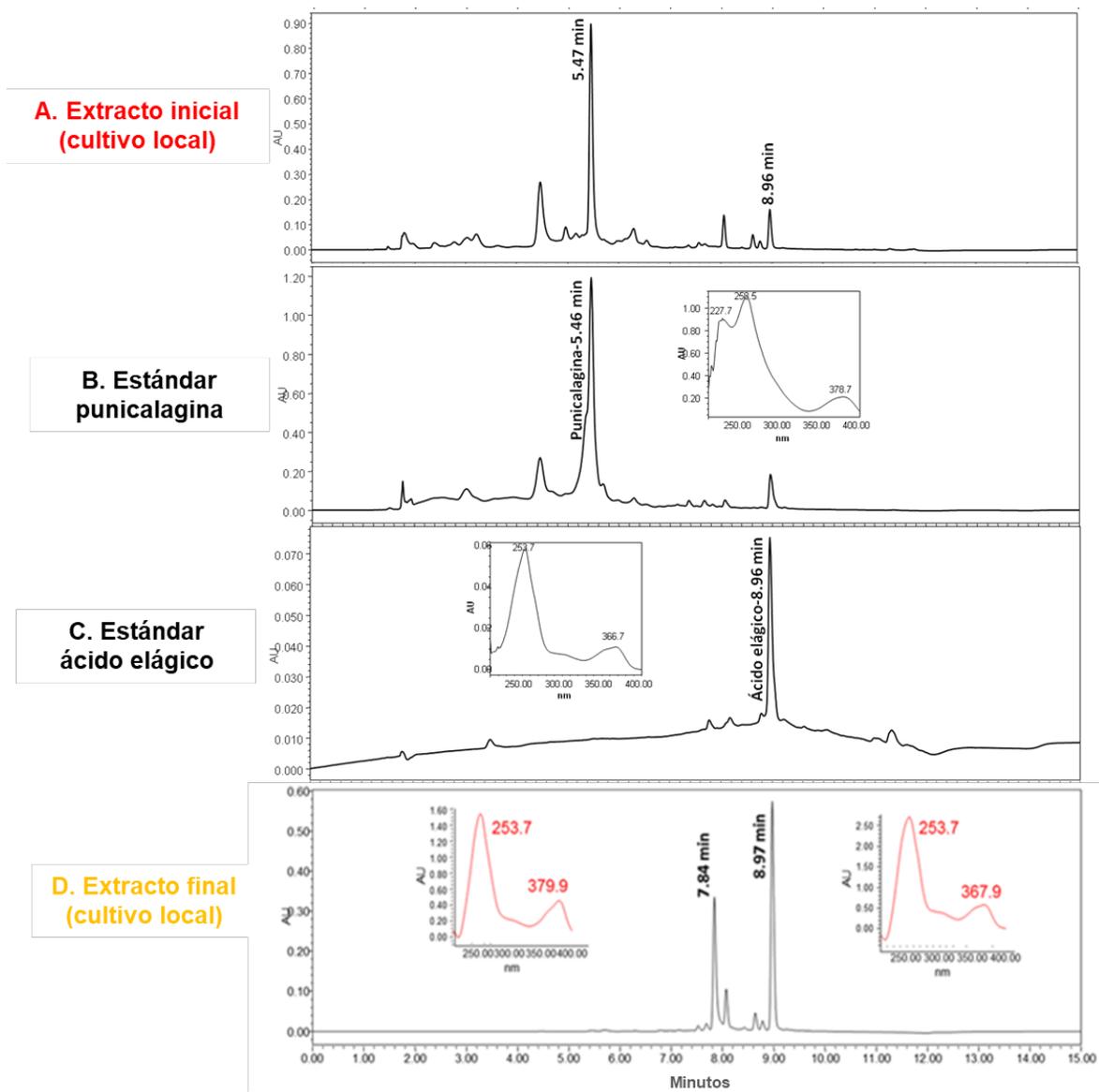


Figura 34. Análisis cromatográfico por UPLC de: Extracto Inicial (Panel A), Punicalagina (Panel B), Ácido elágico (Panel C) y Extracto Final (Panel D)

Extracto Final (granada cultivo local)

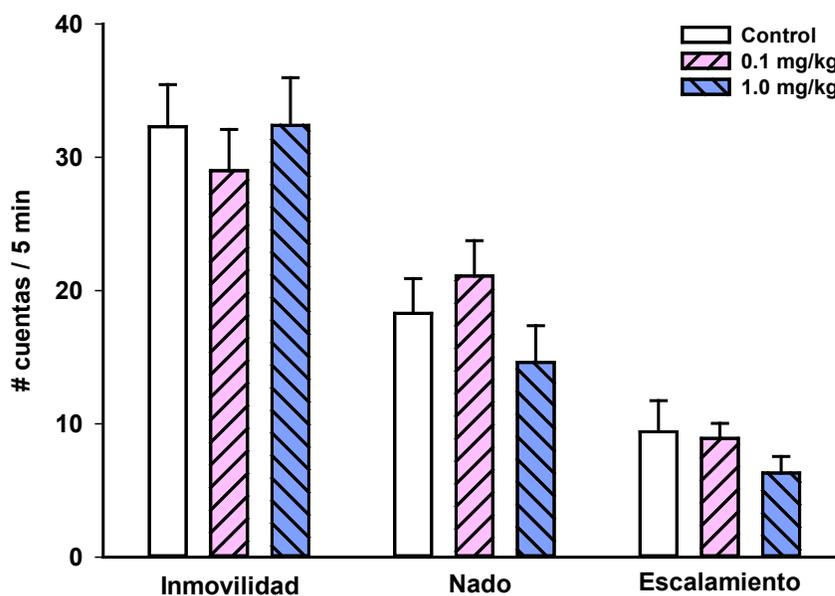


Figura 35. Efecto de la administración crónica del Extracto Final en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n=9-10 animales por grupo). ANOVA de una vía y prueba de Tukey; NS

Tabla 19. Efecto de la administración crónica del Extracto Final por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.

Tratamiento	Dosis	n	Media \pm ES	ANOVA de una vía	p
	Agua destilada	10	59.1 \pm 4.132		
Extracto Final	0.1 mg/kg	10	62.6 \pm 6.890	F _(2,27) = 2.033	NS
	1.0 mg/kg	10	76.6 \pm 7.873		

Los datos se presentan como media \pm error estándar de cruces en una sesión de prueba de 5 minutos. Valor F ANOVA de una vía y prueba de Tukey posthoc para comparaciones múltiples

4.8. Objetivo 7. Analizar el efecto tipo antidepresivo de punicalagina y de ácido elágico como posibles metabolitos bioactivos del EA-PG, en la PNF.

Dado que los compuestos más abundantes en el EA-PG son la punicalagina (α y β) y el ácido elágico, el objetivo de este experimento fue determinar si dichos compuestos son responsables bioactivos para inducir el efecto tipo antidepresivo al administrarlos de manera individual. Para ello, ratas Wistar OVX ($n=80$) se utilizaron, las cuales, después de 3 semanas de recuperación post-ovariectomía, entonces se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales: Punicalagina: (1) Control (Sol. Salina) (2) 0.001 mg/kg (3) 0.01 mg/kg (4) 0.1 mg/kg y 1.0 mg/kg. Ácido elágico: (1) Control (Sol. Salina) (2) 0.01 mg/kg, (3) 1.0 mg/kg y (4) 10 mg/kg. Todos los animales de los grupos experimentales se sometieron individualmente a la preprueba de la PNF (15 minutos) y, 24 horas después, comenzó la administración crónica de los tratamientos (1 admón/día x 14 días; i.p.). Veinticuatro horas después de la última administración, se realizó la prueba de locomoción en campo abierto (5 min) y la sesión de prueba de la PNF (5 min) (Figura 36).

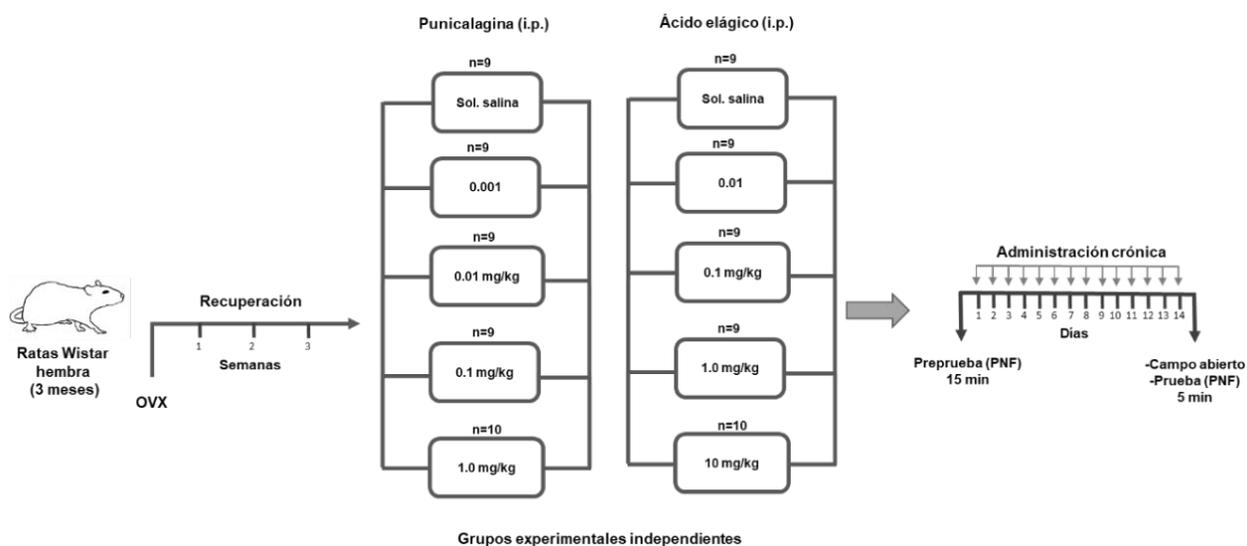


Figura 36. Diseño experimental de la determinación del efecto tipo antidepresivo del Extracto final de la fracción acuosa del extracto de granada del cultivo local.

4.8.1. Resultados del objetivo 7

Efecto tipo antidepressivo de Ácido elálgico en la PNF

La Figura 37 muestra el efecto de las dosis del ácido elálgico en la PNF. De acuerdo con el ANOVA de una vía la administración crónica del ácido elálgico no produjo cambios conductuales a ninguna dosis. Asimismo, no se observaron cambios en la locomoción de los animales (Tabla 20).

Los resultados del ANOVA de una vía fueron: Inmovilidad: $F_{(3,38)} = 1.180$, $p=NS$; Nado: $F_{(3,38)} = 1.781$, $p=NS$; Escalamiento: $F_{(3,38)} = 0.909$, $p=NS$

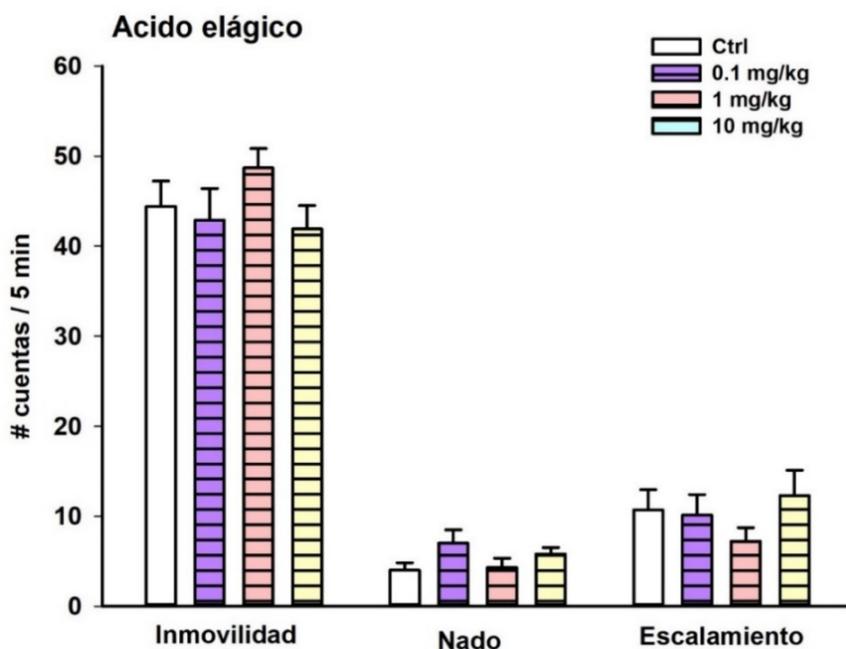


Figura 37. Efecto de la administración crónica de ácido elálgico en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n=9-10 animales por grupo). ANOVA de una vía y prueba de Tukey; sin diferencias significativas.

Tabla 20. Efecto de la administración crónica de ácido elágico por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Media ± ES	ANOVA una vía	P
Ácido elágico	Control (Sol. Salina)	10	5.100 ± 0.809	F=0.922	0.440
	0.1	9	8.556 ± 2.069		
	1	10	5.900 ± 1.722		
	10	10	6.800 ± 1.298		

Los datos se presentan como media ± error estándar de cruces en una sesión de prueba de 5 minutos. Valor F ANOVA de una vía y prueba de Dunnet comparaciones contra el control (Sol. Salina)

Efecto tipo antidepresivo de Punicalagina en la PNF

La administración crónica de punicalagina en la PNF produjo una disminución significativa en la conducta de inmovilidad (efecto tipo antidepresivo) a la dosis de 0.01 mg/kg. Dicho efecto se vio reflejado en un incremento en la conducta de escalamiento, sin modificar significativamente la conducta de nado (Figura 38). Los valores del ANOVA de una vía fueron: Inmovilidad: ($F_{(4,42)} = 5.299$; $P < 0.05$); Nado: ($F_{(4,42)} = 1.307$; NS); Escalamiento: ($F_{(4,42)} = 8.967$; $P < 0.05$). La actividad locomotora de los animales no fue modificada por ninguna dosis del tratamiento (Tabla 21).

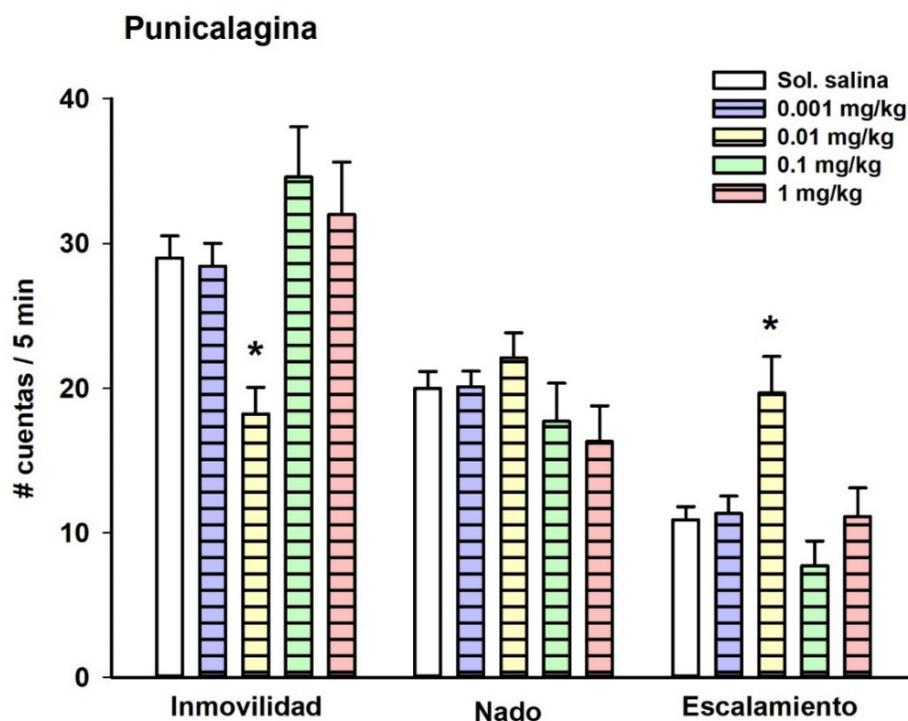


Figura 38. Efecto de la administración crónica de punicalagina en la PNF. Se muestra la media del número de cuentas \pm ES (n=9-10 animales por grupo). ANOVA de una vía y prueba de Tukey; *p<0.05; contra el grupo control (Sol. salina).

Tabla 21. Efecto de la administración crónica de punicalagina por vía i.p. en la prueba de locomoción en campo abierto.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Media \pm ES	ANOVA una vía	P
	Sol. Salina	9	60.1 \pm 3.426		
	0.001 mg/kg	9	59.6 \pm 2.571		
Punicalagina	0.01 mg/kg	9	64.8 \pm 7.135	F = 2.262	NS
	0.1 mg/kg	10	57.9 \pm 6.069		
	1 mg/kg	10	60.1 \pm 4.352		

Los datos se presentan como media \pm error estándar de cruces en una sesión de prueba de 5 minutos. Valor F ANOVA de una vía y prueba de Dunnet comparaciones contra el control (Sol. Salina).

SECCIÓN V

5.1. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó que el EA-PG, i.p., produce efecto tipo antidepresivo en ratas OVX al ser administrado en esquema crónico, el cual fue significativamente mayor en comparación con la vía oral. Además, el efecto tipo antidepresivo de EA-PG fue bloqueado por el antagonista ER β (PHTPP) y por la neurotoxina 5,7-DHT. Por otro lado, el extracto de granada del cultivo local (CDMX) contiene ácido elágico, pero no contiene punicalagina y no produjo cambios conductuales en la PNF. Finalmente, la administración de punicalagina, pero no de ácido elágico, indujo un efecto tipo antidepresivo. Ningún tratamiento afectó la locomoción de los animales.

5.1.2. El EA-PG produce un efecto tipo antidepresivo por vía i.p. mayor que por la vía oral

De acuerdo con reportes previos de nuestro laboratorio, la administración del EA-PG por vía oral en ratas OVX produce un efecto tipo antidepresivo con la participación de los ERs (Valdés-Sustaita et al., 2017). Dado que los componentes más abundantes en la granada -i.e. elagitaninos- pueden ser biotransformados por la microbiota intestinal en metabolitos activos con actividad estrogénica (urolitinas). Los resultados de este estudio mostraron que el EA-PG también produce un efecto tipo antidepresivo en ratas OVX al ser administrado crónicamente por una vía independiente de la microbiota intestinal (vía i.p.). Estos resultados coinciden con el perfil conductual reportado con la administración por vía oral (Valdés-Sustaita et al., 2017), no sólo por la disminución de la conducta de inmovilidad (efecto tipo antidepresivo) sino por el incremento en la conducta de nado, lo cual sugiere, que dicho efecto está modulado principalmente por el sistema serotoninérgico (Detke et al., 1995). En el caso de lo reportado previamente por Valdés-Sustaita et al (2017), se consideraba que el efecto tipo antidepresivo producido por la administración crónica del EA-PG por vía oral estaba principalmente dado por el alto contenido de elagitaninos, los cuales pueden ser biotransformados en urolitinas por la microbiota

intestinal. En contraste con esta hipótesis, en el presente estudio, la administración del EA-PG por vía i.p. produjo un efecto tipo antidepresivo, lo cual demuestra que la biotransformación por la microbiota intestinal no es necesaria para producir su acción antidepresiva. Asimismo, esto confirma que el EA-PG también contiene compuestos que no requieren dicha biotransformación. En este sentido, sería importante considerar que el fruto de la granada contiene grandes cantidades de flavonoides, muchos de ellos con actividad estrógena, como las isoflavonas (genisteína, quercetina) los cumestanos (coumestrol) los disacáridos, (rutina) y otros compuestos no flavonoides (ácido elágico, resveratrol) que han probado ejercer acciones antidepresivas en estudios preclínicos, (Kageyama et al., 2010; Machado et al., 2008; Moore et al., 2018; Naveen et al., 2013; Walf et al., 2004), que podrían estar involucrados en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG. Por otra parte, en concordancia con nuestros resultados, un estudio realizado por Mori-Okamoto et al. (2004) reportó efecto tipo antidepresivo, producido por un extracto de granada, administrado por vía oral durante 2 semanas en ratones OVX. Posteriormente, Abdul et al. (2015) también demostró las acciones antidepresivas de un extracto metanólico de granada administrado de forma aguda por vía i.p., en ratones macho. Lo anterior, sugiere que el efecto tipo antidepresivo de la granada parece ser independiente de la ruta y el esquema de administración y que varios tipos de compuestos -e.g. fitoestrógenos, polifenoles- pueden estar participando en el mecanismo de acción tipo antidepresivo de la granada. Sin embargo, más experimentos se requieren para identificar los fitoquímicos involucrados en dicho mecanismo.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que el EA-PG administrado por la vía i.p. produjo un efecto tipo antidepresivo significativamente mayor que por la vía oral. Es relevante mencionar que la mayoría de los estudios con extractos y compuestos aislados de alimentos funcionales se llevan a cabo usando la vía oral. Esto es debido a que, por lo general, se parte del hecho de que los compuestos bioactivos son ingeridos a través de la dieta. Por el contrario, el uso de la vía i.p. es utilizada principalmente para evaluar el efecto de algún fármaco en mecanismos de interés terapéutico, en vez de las propiedades farmacológicas para su traducción a la clínica; por lo general se limita a estudios con animales. De esta manera, varios estudios preclínicos han evaluado el efecto tipo antidepresivo de extractos y de compuestos

aislados de plantas administrados por vía i.p., cuyo efecto ha sido atribuido a su alto contenido de polifenoles y de flavonoides con actividad terapéutica. (Tabla 22).

Tabla 22. Estudios preclínicos del efecto tipo antidepresivo asociado a la acción de extractos y compuestos aislados de plantas administrados por vía i.p.

Planta (familia)/compuesto aislado	Dosis/ vía de admon.	Vía de administración	Modelo Animal	Duración del tratamiento	Prueba conductual
Apocynum venetum Linn. (Apocynaceae)	0.35 mM/kg	i.p.	Ratón	Dosis única	PNF, PSC
Hibiscus esculentus L. (Malvaceae)	500 and 750mg/kg	i.p.	Ratón Swiss albino	Dosis única	PNF, PSC
Baicaleína	10, 20, and 40mg/kg	i.p.	Rata Spague-Dawley	14 días	PNF, PSC
	1, 2, and 4mg/kg	i.p.	Ratón Kumming	Dosis única y 21 días	PNF
Quercetina	50 and 100mg/kg	i.p.	Rata Wistar /Rata diabética inducida con estreptozina	21 días	PNF
Fisetina	5, 10, and 20mg/kg	i.p.	Ratón ICR	Dosis única	PNF
7,8-Dihydroxiflavona	1, 3, and 10 mg/kg; 10 and 20mg/kg	i.p.	Ratón C57BL/6	Dosis única	PNF, PPS
Naringina	50 and 100mg/kg	i.p.	Rata Wistar	14 días	PNF
Hesperidina	0.1, 0.3, and 1mg/kg	i.p.	Ratón Swiss	21 días	PSC
Astilbina	10, 20, and 40mg/kg	i.p.	Ratón C57BL/6	21 días	PSC, PPS

Tomado y modificado de (German-Ponciano et al., 2018).

El efecto de cualquier fármaco depende de su biodisponibilidad. La biodisponibilidad se define como la fracción de sustancia activa inalterada que alcanza el torrente sanguíneo y está directamente relacionada con la dosis y la vía de administración (Price y Patel, 2020). En nuestros resultados observamos que tanto la vía oral como la vía i.p. son efectivas para producir el efecto tipo antidepresivo del EA-PG. Por un lado, la biodisponibilidad de un fármaco por la vía oral, depende tanto de la fracción de fármaco que es absorbida en el tracto gastrointestinal (f_a) como de la fracción de fármaco que escapa el metabolismo de primer paso del TGI (F_g) y del hígado (F_h): ($F = f_a * F_g * F_h$) (Olivares-Morales et al., 2014). En particular, el grado de absorción de un fármaco en el intestino depende de tres principales factores:

disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal. De acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BSC), entidad regulatoria encargada de clasificar las sustancias basados en su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal, los compuestos más predominantes en la granada (elagitaninos y flavonoides) tienen perfiles de absorción distintos. En general, los elagitaninos como la punicalagina, son compuestos altamente solubles (pH: 1-7) y con muy baja permeabilidad, razón por la cual son fácilmente hidrolizados a ácido elágico en el estómago (García-Muñoz y Vaillant, 2014). El ácido elágico, por su parte, es una molécula mucho menos soluble pero igualmente impermeable en el lumen intestinal (Zuccari et al., 2020). Esto explica, en parte, que en estudios farmacocinéticos sean casi imperceptibles en sangre (Landete, 2011; Larrosa et al., 2006). No obstante, se ha propuesto que la principal razón de la baja biodisponibilidad de los elagitaninos radica en su biotransformación a urolitinas por la microbiota intestinal. Un estudio en ratas realizado por Cerdá et al. (2003) determinó que la biodisponibilidad de la punicalagina (30 µg/ml) y de ácido elágico (20 µg/ml), posterior al consumo de jugo de granada (con aprox. 800 mg/día de punicalagina), fue únicamente del 0.00375% y 0.0025%, respectivamente. Así mismo, detectaron alrededor del 3-6% de punicalagina o sus metabolitos en orina, lo cual sugiere que, en efecto, la gran mayoría de los elagitaninos son biotransformados en el intestino. Las urolitinas son moléculas mucho más lipofílicas que sus precursores (punicalagina y ácido elágico), lo cual facilita su absorción por el intestino hasta el torrente sanguíneo (Tomás-Barberán et al., 2016). Es interesante que debido a su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, se ha sugerido que las urolitinas son las responsables del efecto neuroprotector de la granada en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Kujawska et al., 2019; Yuan et al., 2016). De la misma manera, las urolitinas podrían estar participando en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG administrado por la vía oral.

Desde el punto de vista farmacocinético, los flavonoides son otros compuestos que pudieran estar mediando el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por la vía oral, ya que tienen un alto grado de absorción en el intestino. De acuerdo a estudios preclínicos, la biodisponibilidad de los flavonoides por la vía oral está principalmente determinada por su estado gliconado/agliconado (Rubió et al., 2014). En las plantas, los flavonoides se encuentran en su forma gliconada de manera natural y su absorción

está relacionada con la hidrólisis del azúcar conjugado por acción de la enzima lactasa floricitina hidroxilasa, la cual está presente en las células intestinales de los mamíferos. La porción agliconada de los flavonoides tiende ser poco soluble (pH: 1-7), pero su permeabilidad es relativamente alta, dependiendo del tipo de flavonoide. Esto les permite ser absorbidos en su mayoría por difusión pasiva en el intestino (Crozier et al., 2010). De acuerdo con estudios *in vitro* entre los flavonoides con mayor permeabilidad intestinal se encuentran las catequinas, la quercetina, el kaempferol, la genisteína, la daidzeína, la hesperitina (Tian et al., 2009) y en mucho menor medida, las antocianinas (Tomás-Barberán et al., 2006). Sin embargo, la biodisponibilidad de algunos polifenoles en humanos puede ser muy diferente. De acuerdo a una revisión sistemática, el ácido gálico y las isoflavonas tienen un alto grado de absorción, seguido por las catequinas, flavononas y la quercetina glicosilada y, finalmente, las proantocianidinas y antocianinas tienen el menor grado de absorción (Manach et al., 2005).

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el EA-PG también produce un efecto tipo antidepresivo al ser administrado por la vía i.p., el cual es mayor que por la vía oral a la misma dosis. De forma similar a nuestros resultados otros estudios también han determinado un mayor efecto por la vía i.p. que por la vía oral. Por ejemplo, un estudio realizado por Kimani et al. en 2018 determinó el efecto hiperglicemiante de 200 mg de un extracto acuoso de hojas de *Vernonia lasipus* (rico en flavonoides, taninos, alcaloides y esteroides) por vía oral y por vía i.p., concluyendo que la vía de administración i.p. es más efectiva que vía oral. También, Ogundajo et al. (2014). determinaron que la quercetina, un flavonoide que también se encuentra en la granada, produce un efecto antioxidante y hepatoprotector significativamente mayor por la vía i.p. que la vía oral a las mismas dosis (50 mg/kg). En este sentido, está bien establecido que, en general, la biodisponibilidad de los fármacos es mayor por la vía i.p. que por la vía oral. Esto, principalmente porque el fármaco es depositado en el fluido peritoneal, entre el mesotelio parietal y el mesotelio visceral, los cuales están extensamente irrigados y cuentan con microvellosidades en las células mesoteliales que ofrecen un área superficial extensa, y que facilitan la absorción rápida de los fármacos. Adicionalmente, el área cuenta con el transporte de moléculas de mayor tamaño a través de la vía linfática. Los mecanismos de absorción por esta vía

son dos principales: difusión y convección, los cuales están determinados por el área superficial (A), el gradiente de concentración de solutos (ΔC) y la permeabilidad del soluto (Ps): $Abs=A*\Delta C* Ps$ (Al Shoyaib et al., 2020). A pesar de esto, en algunos casos específicos puede haber efectos terapéuticos que son más favorecidos por la administración oral que por la vía i.p. Por ejemplo, en un estudio realizado por Galindo et al. (2012), la administración crónica de quercetina (10 mg/kg) por la vía oral probó ser más efectiva que la vía i.p. para producir efectos protectores cardiovasculares en ratas espontáneamente hipertensas. En este caso, los autores sugieren que esto pudo deberse a que, por la vía oral, la quercetina es expuesta al metabolismo de las enzimas y de la microbiota intestinal, lo cual facilita la absorción de la forma agliconada de la quercetina.

En resumen, tomando lo anterior en cuenta, es posible sugerir que el efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía oral sea resultado, tanto de las urolitinas (derivadas de la biotransformación de los elagitaninos por la microbiota intestinal) como de los flavonoides que no requieren ser biotransformados -e.g. quercetina, kaempferol, coumestrol, genisteína, daidzeína-. En general, las características fisicoquímicas de todas estas moléculas resultan más favorables para atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer acciones directamente en el SNC. De hecho, algunos flavonoides como genisteína, quercetina, rutina, hesperidina y cumestrol han probado ejercer acciones antidepresivas en modelos animales (Cai et al., 2017; Holzmann et al., 2015; Kageyama et al., 2010; Machado et al., 2008; A. a. Walf et al., 2004) y en humanos (Atteritano et al., 2014; Cheng et al., 2007). No obstante, es posible que la administración del EA-PG por vía i.p. sea más efectiva que por la vía oral debido a que la vía i.p. favorece, en mayor medida, la biodisponibilidad de muchos de los polifenoles contenidos en la granada incluyendo los flavonoides. Esto, en conjunto con las ya bien conocidas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y cardiovasculares de la granada, podrían ser las principales razones de la diferencia en el efecto tipo antidepresivo entre ambas vías de administración.

5.1.2. El efecto tipo antidepresivo del EA-PG por vía i.p. está mediado por los ERs

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas que interactúan a los ERs, pero con menor afinidad que el estradiol endógeno. Recientemente han sido utilizados como un tratamiento alternativo a la TRH para los síntomas de la menopausia debido a su eficacia con menos efectos adversos que la TRH, debido a su actividad antiproliferativa y a su efecto protector cardiovascular. Se ha determinado que la granada posee un potente efecto quimiopreventivo frente a tumores hormono-dependientes (cáncer de mama y próstata) relacionado con su contenido de compuestos estrogénicos (Adams et al., 2010; Albrecht et al., 2004). En este trabajo se determinó que el efecto tipo antidepresivo del EA-PG, administrado por vía i.p. en ratas OVX, requiere de la participación de los ERs, sugiriendo que los compuestos estrogénicos que contiene la granada participan en dicho efecto antidepresivo. Este resultado coincide con experimentos anteriores de nuestro laboratorio, en los cuales se demostró la participación de los ERs en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG administrado por vía oral en ratas OVX (Valdés-Sustaita et al., 2017). En ambos casos, condiciones de privación estrógenos se utilizaron, lo que significa que la activación de los ERs sólo pudo estar dado por compuestos exógenos con actividad estrogénica. Asimismo, la administración del EA-PG por vía i.p. confirma que la granada contiene compuestos que no requieren ser biotransformados por la microbiota intestinal para producir el efecto antidepresivo mediado por los ERs. Se ha determinado que algunos de estos fitoestrógenos son: el coumestrol, la luteolina, la genisteína y la daidzeína, la quercetina y el kaempferol, el ácido elágico y la cianidina (Kotsiou y Tesseromatis, 2015; Papoutsi et al., 2005; van Elswijk et al., 2004; Vini y Sreeja, 2015), de los cuales, hasta el momento, la genisteína es el único fitoestrógeno que ha probado inducir acciones en el SNC al administrarse por vía i.p. (Rodríguez-Landa et al., 2009), por lo que se necesitarían más experimentos para establecer una relación directa de dichos fitoestrógenos con las acciones antidepresivas de la granada.

5.1.3. El ER β participa en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG

La participación de los ERs en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG fue confirmada en experimentos previos. Por lo tanto, el objetivo 4 de este estudio fue enfocado en determinar la función específica de cada subtipo de ERs utilizando antagonistas selectivos a ER α (TPBM) y ER β (PHTPP). Nuestros resultados mostraron que el efecto tipo antidepresivo del EA-PG fue bloqueado por el antagonista selectivo a ER β , pero no por el ER α , lo cual confirma la implicación del ER β .

Los ERs (α y β) son considerados receptores nucleares homólogos cuya estructura proteica consiste en 5 dominios, los cuales presentan diferencias de más del 40% en el dominio de unión al ligando, por lo que pueden ser activados por ligandos (Kuiper et al., 1997). En particular, el efecto antidepresivo de los estrógenos ha sido relacionado principalmente con la activación del ER β . Por ejemplo; en estudios preclínicos, compuestos SERMs y agonistas del ER β han producido acciones antidepresivas en ratas OVX, mientras que los agonistas del ER α no produjeron diferencias significativas (Walf et al., 2004; Walf y Frye, 2007; Yang et al., 2014). También, los ratones OVX knockout para el ER β (β ERKO), pero no para el ER α (α ERKO), presentan más conductas tipo depresivas y no responden a los tratamientos con compuestos estrogénicos (Rocha et al., 2005; Walf y Frye, 2007). Finalmente, tomando en cuenta que los fitoestrógenos han demostrado tener una mayor afinidad por ER β (Kostelac et al., 2003; Kuiper et al., 1998; Manas et al., 2004; Zand et al., 2000; Zava et al., 1997b), una explicación a nuestros resultados sería que se esté dando una modulación directa del ER β por los fitoestrógenos contenidos en el EA-PG. En este sentido, el cumestrol, la genisteína, la apigenina y el kaempferol, que son fitoestrógenos presentes en la granada, han demostrado poseer una afinidad significativamente mayor por el ER β que por ER α (Kuiper et al., 1998). No obstante, sería necesario confirmar su relación con las acciones antidepresivas del EA-PG en experimentos futuros.

Por otra parte, en este trabajo la participación del ER β en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG se determinó siguiendo un esquema de administración subcrónico (3 admones./1 día), lo cual llama la atención debido a que los receptores nucleares (ER α y ER β) han sido relacionados principalmente con las acciones

genómicas (lentas) de los estrógenos. No obstante, de forma similar a nuestros resultados, un estudio también reportó acciones antidepresivas y ansiolíticas al administrar una sola dosis de agonistas selectivos para el ER β (DPN y coumestrol) pero no para ER α (Walf et al., 2004). Hasta el momento se desconocen los mecanismos específicos involucrados en los efectos rápidos de los estrógenos mediados por el ER β . Un estudio sugirió que la modulación del ER β por compuestos estrogénicos puede tener lugar en el hipocampo. Esto, luego de observar efectos tipo antidepresivos y tipo ansiolíticos tan solo 10 minutos después de su infusión directa en dicha área (Walf & Frye, 2007). Al respecto, también es importante tomar en cuenta que los ERs nucleares también pueden ser activados por vías indirectas, en las cuales proteínas intracelulares como cinasas, citocinas, factores de crecimiento, entre otras, pueden inducir efectos rápidos. Sin embargo, esta teoría tendría que ser comprobada con estudios posteriores.

5.1.4. El sistema serotoninérgico está implicado en el efecto tipo antidepresivo del AE-PG

En este estudio se determinó que la neurotoxina 5,7-DHT bloquea el efecto tipo antidepresivo del EA-PG. La actividad general del sistema serotoninérgico está regulada principalmente a través de los receptores a serotonina 5HT1A, los cuales se encuentran ampliamente expresados en los núcleos del rafé (principal fuente de neuronas serotoninérgicas) y ejercen una regulación negativa (Ohno, 2012). En nuestros resultados, la neurotoxina 5,7-DHT bloqueó parcialmente el efecto tipo antidepresivo del EA-PG administrado por vía i.p., lo cual sugiere que dicho efecto requiere del sistema serotoninérgico para producirlo.

El sistema serotoninérgico tiene un papel muy importante en la neurobiología de la depresión (Andrews et al., 2015b). La hipótesis monoaminérgica de la depresión establece que una disminución en las concentraciones de monoaminas (5-HT, NA y DA) en algunas áreas cerebrales, puede contribuir al desarrollo de síntomas depresivos (Walker, 2013). No obstante, los fármacos que regulan la función del sistema serotoninérgico siguen siendo la opción terapéutica más utilizada en la clínica (Beyer et al., 2018). Tanto en estudios preclínicos (Bethea et al., 2002; Pestana-Oliveira et al., 2018) como en estudios clínicos (Gressier et al., 2014; Grochans et al.,

2013), las alteraciones del sistema serotoninérgico relacionadas a la fluctuación estrogénica han sido ampliamente reportadas. En este sentido, la función reguladora del estado de ánimo de los estrógenos se ha relacionado estrechamente con su interacción con el sistema serotoninérgico y la activación de los ERs, en particular del ER β . Por ejemplo, se sabe que el efecto tipo antidepresivo de los estrógenos requiere la participación del receptor 5HT1A presináptico (Estrada-Camarena et al., 2006) y postsináptico (López-Rubalcava et al., 2005). Además, el sistema serotoninérgico parece estar asociado con el ER β ya que estos receptores colocalizan con el receptor 5HT1A en los núcleos dorsal y medial del rafé en el macaco (Gundhlah et al., 2001), el cobayo (Lu et al., 1999) y la rata (Lu et al., 2001), y con el receptor 5HT2A en la corteza cerebral de la rata, donde los estrógenos regulan positivamente su expresión (Biegon et al., 1983; Sumner y Fink, 1997; Cyr et al., 1998). De esta manera, la activación del ER β aumenta la expresión de las enzimas TPH 1 y 2, enzimas encargadas de la biosíntesis de 5-HT, en las terminales sinápticas de las neuronas que proceden de los núcleos del rafé (Donner y Handa, 2009; Gordon et al., 2015; Yang et al., 2014).

En línea con esta evidencia, en el presente estudio se determinó que el EA-PG requiere tanto del ER β como del sistema serotoninérgico para producir su efecto tipo antidepresivo en ratas OVX, lo cual sugiere que el EA-PG probablemente contiene fitoestrógenos que producen un perfil de acción antidepresiva como el de los estrógenos. Varios estudios han reportado acciones antidepresivas de fitoquímicos como el ácido elágico y varios flavonoides contenidos en la granada, mediadas por monoaminas (incluyendo 5-HT). El ácido elágico, uno de los principales componentes de la granada, produjo un efecto tipo antidepresivo mediado por los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico en ratones hembra (Girish et al., 2012). Por otra parte, la genisteína, un fitoestrógeno con alta afinidad al ER β (Manas et al., 2004), produce acciones tipo antidepresivas a través de la modulación del sistema serotoninérgico en ratas OVX (Kageyama et al., 2010). Asimismo, kaempferol, apigenina, quercetina y rutina, flavonoides con acciones estrogénicas también presentes en la granada, han probado actuar como iMAOS (Lee et al., 2001; Sloley et al., 2000). También, la hesperidina produce acciones antidepresivas dependientes de la activación de los receptores a serotonina 5HT1A (Souza et al., 2013). La rutina y la naringenina también

han mostrado efectos antidepresivos, los cuales fueron bloqueadas con un inhibidor de la síntesis de 5-HT y de NA (Machado et al., 2008; Yi et al., 2010). La acacetina, un flavonoide recientemente identificado en la granada (El-Hadary y Taha, 2020), ha mostrado acciones antidepresivas que están mediadas por el receptor 5HT1A, con un incremento concomitante de 5-HT en el hipotálamo, en la corteza frontal y en el hipocampo (Xiao et al., 2019).

5.1.5. La punicalagina contribuye al efecto tipo antidepresivo del EA-PG

Los experimentos anteriores de este estudio se realizaron con el EA-PG, un extracto acuoso de granada fabricado en Nutracitrus, una empresa española especializada en la elaboración de productos de origen natural, incluyendo extractos. El EA-PG se obtuvo a partir del fruto de la granada completo, por lo tanto, contiene compuestos no solo de la parte comestible (semillas y arilos) sino también los compuestos contenidos en la cáscara. El contenido específico de polifenoles es el siguiente: elagitaninos: $15,77 \pm 0,15$ mg/g (punicalagina α : $2,08 \pm 0,04$ mg/g, punicalagina β : $3,38 \pm 0,07$ mg/g; ácido elágico, -agliconado: $6,33 \pm 0,04$ mg/g, -gliconado: $3,97 \pm 0,15$ mg/g) y antocianinas: $2,09 \pm 0,23$ mg/g (González-Trujano et al., 2015).

Parte de nuestro interés en el estudio tipo antidepresivo de este extracto se enfocó en identificar si existen compuestos específicos que jueguen un papel determinante en dicho efecto. Por ello en este estudio, el fruto de granada completo de un cultivo local de la Ciudad de México se procesó para obtener un extracto y evaluar su actividad tipo antidepresiva.

El perfil cromatográfico del Extracto Inicial, derivado de la extracción acuosa simple de las granadas de cultivo local, fue muy similar al del EA-PG, ya que ambos presentaron las mismas señales a los mismos TR, entre ellas, la de la punicalagina (TR: 5.47 min) y la del ácido elágico (TR:8.96 min) (Figura). En ambos casos, el contenido de punicalagina fue mayor que el del ácido elágico. En contraste, el perfil cromatográfico del Extracto Final, precipitado obtenido del Extracto Inicial posterior a la extracción con solventes orgánicos, mostró únicamente la presencia del ácido elágico, lo cual sugiere que varios compuestos, incluyendo la punicalagina, se

perdieron a lo largo del proceso de extracción. Por otra parte, al evaluar la actividad del Extracto Final en la PNF, se determinó que no indujo acciones tipo antidepresivas, posiblemente debido a la ausencia de punicalagina. No obstante, es importante considerar que, además de la punicalagina y del ácido elálgico, los cromatogramas del Extracto Inicial y del EA-PG mostraban otros dos compuestos que no fueron identificados y que tampoco se encontraron en el Extracto Final. En este sentido, es relevante mencionar que tanto el Extracto Inicial como el EA-PG, tenían un color rojo/rosado intenso, a diferencia del Extracto Final, el cual tenía un color amarillento opaco. Con relación a esto, se sabe que los compuestos responsables de la pigmentación roja característica de la granada son las antocianinas, compuestos de tipo flavonoide que, de acuerdo con la caracterización fisicoquímica del contenido del EA-PG, se encuentran también en grandes cantidades (González-Trujano et al., 2015). Al igual que la mayoría de los flavonoides, las antocianinas se encuentran en las plantas en su forma glicosilada, lo cual incrementa considerablemente su polaridad. Sin embargo. Es posible que, debido al proceso de la extracción acuosa inicial, éstos hayan quedado predominantemente en su forma agliconada. Es frecuente que al utilizar solventes orgánicos de baja polaridad como primera opción para aislar compuestos naturales, se arrastren otras moléculas, especialmente si contienen grupos fenoles aromáticos o metilados, como los flavonoides (Bart, 2011). No obstante, sería necesario realizar más experimentos para determinar la naturaleza de estos compuestos.

Dado que la ausencia de punicalagina se asoció con la falta de actividad tipo-antidepresiva del Extracto Final, el efecto tipo antidepresivo de la punicalagina y del ácido elálgico se evaluó en la PNF. El ácido elálgico, no produjo un efecto tipo antidepresivo, lo cual difiere con lo reportado; el ácido elálgico ha mostrado inducir acciones tipo antidepresivas (Dhingra y Chhillar, 2012; Kalshetti et al., 2015) a través de la modulación de los sistemas monoaminérgicos (serotoninérgico y noradrenérgico) (Dhingra y Chhillar, 2012; Girish et al., 2012), del BDNF hipocampal (Bedel et al., 2018) y del óxido nítrico dependiente del glutamato (NMDA-NO) (Lorigooini et al., 2019). Es importante tomar en cuenta que todos estos estudios fueron realizados en ratones macho, por lo que puede haber factores dependientes del sexo o de la especie que puedan estar influyendo en la inactividad tipo antidepresiva del ácido elálgico. Por otra

parte, una limitación importante de este experimento es que no se exploraron dosis menores del ácido elálgico, por lo que no es posible descartar que la ausencia de efecto se deba a que la dosis esté fuera del rango terapéutico.

Por otra parte, la administración crónica de punicalagina sí produjo un efecto tipo antidepresivo en la PNF. Es relevante mencionar que, hasta el momento no existen datos de acciones antidepresivas de la punicalagina, por lo que este sería el primer reporte. Con relación a este resultado, es difícil proponer algún mecanismo directo que lo explique debido a que actualmente no hay información de la farmacocinética de la punicalagina administrada por vía i.p., ni de su acción directa en el SNC. Los efectos de los polifenoles en la función cerebral han sido explicados a través de los efectos periféricos que producen y que indirectamente influyen en el funcionamiento del SNC. En particular, las propiedades neuroprotectoras de los polifenoles han sido atribuidas a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, las cuales previenen al cerebro de ser expuesto al estrés oxidativo y al daño tisular por sobreexposición a mediadores proinflamatorios, respectivamente (Trebatická y ůpuračková, 2015). De hecho, algunas condiciones neurológicas y psiquiátricas, entre ellas la depresión, han sido estrechamente relacionadas con procesos inflamatorios crónicos y con una actividad antioxidante insuficiente (Vaváková et al., 2015). En este caso, la punicalagina es una molécula de gran peso molecular y con características fisicoquímicas que no favorecen su paso por la BHE, por lo que es posible que el efecto tipo antidepresivo que observamos sea resultado de sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias a nivel sistémico, lo que se refleja en el mejoramiento de la función del SNC.

Los mecanismos específicos a nivel molecular de la actividad neuroprotectora de los taninos hidrolizables como la punicalagina no se conoce por completo, sin embargo, algunos elementos importantes se han determinado. Con respecto a su actividad antiinflamatoria, se sabe que inhibe a mediadores inflamatorios que como el factor de necrosis tumoral (TRAF-6), $\text{NF}\kappa\beta$, $\text{TNF}\alpha$ y citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-2, lo cual previene la sobreactivación de la microglía y los astrocitos, las células inmunes cerebrales. Con respecto a su actividad antioxidante, los taninos hidrolizables producen la atenuación de los radicales libres que generan estrés oxidativo e inducen

la expresión de genes de antioxidantes endógenos como la super óxido dismutasa (Hussain et al., 2019). No obstante, llama la atención que, en nuestros resultados, la punicalagina produjo un incremento en la conducta de escalamiento en la PNF, lo cual sugiere que su efecto tipo antidepresivo está modulado por el sistema noradrenérgico.

El sistema noradrenérgico juega un rol muy importante en el desarrollo y de trastornos, ya que, al igual que la 5-HT, la desregulación en sus niveles promueve el desarrollo de síntomas depresivos. No obstante, además de su función reguladora del estado de ánimo, el sistema noradrenérgico participa en la modulación de otros procesos importantes como la neuroinflamación dependiente de la microglía y los astrocitos (Giorgi et al., 2020). Esto es relevante debido a que los síntomas depresivos también se han asociado con un incremento en la neuroinflamación (Johnson et al., 2005; Setiawan et al., 2015). En particular, el Locus Coeruleus, principal núcleo noradrenérgico en el cerebro- El Locus Coeruleus ejerce un control inhibitorio de la activación de la microglía a través de la inhibición de la producción de interleucinas proinflamatorias como IL-10 o TNF α (Feinstein et al., 2002), y a través de la activación de mediadores antiinflamatorios -e.g. el receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR- γ)(Klotz et al., 2003). Por su parte, el PPAR- γ es un factor de transcripción que también ha sido relacionado con la biosíntesis de neuroesteroides, que contribuyen a la regulación del estado de ánimo (Colle et al., 2017; Matrisciano y Pinna, 2020). Adicionalmente, el Locus Coeruleus favorece el estado de reposo de la microglía y de los astrocitos a través de la inhibición del NF- $\kappa\beta$ (principal activador de la respuesta inflamatoria en la microglía)(Feinstein et al., 2016), de la disminución de la expresión del complejo de histocompatibilidad (MHC-II) y de la inhibición de las enzimas NOS y COX-2 (Giorgi et al., 2020). Por lo tanto, dado que la punicalagina disminuye el estrés oxidativo y la inflamación en el organismo, incluyendo el cerebro, es posible que la actividad noradrenérgica reflejada en la conducta de escalamiento sea consecuencia de la activación del núcleo noradrenérgico, Locus Coeruleus, al ser éste, uno de los principales reguladores de la neuroinflamación. No obstante, será necesario confirmar esta hipótesis en experimentos futuros.

En comparación con el EA-PG (vía i.p.), la punicalagina induce un perfil conductual diferente en la PNF, lo cual sugiere que actúan a través de mecanismos

distintos. Por un lado, el efecto tipo antidepresivo de la punicalagina estuvo acompañado de un aumento en la conducta de escalamiento, asociado a la modulación del sistema noradrenérgico. En contraste, el efecto tipo antidepresivo del EA-PG estuvo acompañado de un aumento en la conducta de nado, asociada a la modulación del sistema serotoninérgico. En este sentido, se sabe que los extractos de productos naturales pueden tener ventajas en comparación con los compuestos naturales individuales, ya que pueden tener múltiples blancos terapéuticos simultáneos (Pandey et al., 2011). Por lo tanto, es posible que el efecto del EA-PG sea resultado de la sinergia de los mecanismos de cada uno de sus componentes, entre ellos, la participación del ER β y del sistema serotoninérgico determinados en el presente trabajo. No obstante, la punicalagina también podría estar contribuyendo al efecto tipo antidepresivo del EA-PG con un mecanismo alternativo, probablemente asociado a sus potentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Sin embargo, experimentos específicos para determinar esta posibilidad quedan como perspectiva.

SECCIÓN VI

6.1. CONCLUSIONES

El efecto tipo antidepresivo del EA-PG, i.p., en ratas OVX es producido por compuestos que no requieren de la intervención de la microbiota intestinal para su biotransformación. El efecto tipo antidepresivo del EA-PG requiere de la participación del ER β y del sistema serotoninérgico, donde la punicalagina, la cual se encuentra en concentraciones abundantes en el EA-PG, contribuye en el efecto tipo antidepresivo a través de mecanismos independientes al sistema serotoninérgico y que parecen involucrar al sistema noradrenérgico.

6.2. PERSPECTIVAS

El efecto tipo antidepresivo del EA-PG requiere del ER β y del sistema serotoninérgico, por lo que establecer alguna correlación en la expresión y/o funcionamiento del ER β con algún elemento clave del sistema serotoninérgico en áreas relevantes para la neurobiología de la depresión (e.g. hipocampo, núcleos del rafé), sería de gran utilidad para esclarecer dicho mecanismo. Además, considerando que el EA-PG posee un alto contenido de fitoestrógenos, con alta afinidad por el ER β y con actividad antidepresiva (e.g. genisteína, coumestrol, quercetina, kaempferol), sería importante estudiar sus efectos de manera individual y su relación con el efecto tipo antidepresivo del EA-PG. Por otro lado, en este estudio se contempló determinar la participación de los ERs nucleares, sin embargo, dado al papel tan importante que también desempeñan los receptores membranales a estrógenos en el SNC, sería importante incluir su estudio en la caracterización del efecto tipo del EA-PG. Con respecto al sistema serotoninérgico, estudiar el papel de algunos de sus elementos en el efecto tipo antidepresivo del EA-PG, como los receptores a serotonina 5HT1A (pre y postsináptico) y 5HT2A, y el SERT podrían ser claves para obtener más información acerca de cómo participan en dicho efecto. Adicionalmente, es importante tomar en cuenta que el estudio del efecto tipo antidepresivo del EA-PG (i.p.) en este trabajo tuvo como principal objetivo la exploración de mecanismos de interés terapéutico. No obstante, para establecer las propiedades farmacológicas del EA-PG para su

traducción a la clínica, sería importante realizar una caracterización del efecto tipo del EA-PG administrado por vía oral.

Con respecto a los efectos conductuales producidos por la punicalagina en la PNF, éstos sugieren que su efecto tipo antidepresivo está mediado por los sistemas catecolaminérgicos (DA y NA), por lo que sería necesario corroborar su participación. Finalmente, también sería importante determinar si su efecto tipo antidepresivo está relacionado con su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria.

6.3. REFERENCIAS

- Abdul R., S., Abdul K., B., Hidayat. B., M., & Mohd M., M. A. (2015). *Antidepressant-like effect of methanolic extract of Punica granatum (pomegranate) in mice model of depression. JUNE 2015.*
- Adams, L. S., Zhang, Y., Seeram, N. P., Heber, D., & Chen, S. (2010). Pomegranate ellagitanni derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro.pdf. *Cancer Prevention Research*, 3(1).
- Adzic, M., Brkic, Z., Mitic, M., Francija, E., Jovicic, M. J., Radulovic, J., & Maric, N. P. (2017). Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression. *Current Neuropharmacology*, 16(2), 176–209. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170828163048>
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
- Al-Muammar, M. N., & Khan, F. (2012). Obesity: The preventive role of the pomegranate (Punica granatum). *Nutrition*, 28(6), 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.11.013>
- Al-Safi, Z. a., & Santoro, N. (2014). Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. *Fertility and Sterility*, 101, 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.032>
- Al Shoyaib, A., Archie, S. R., & Karamyan, V. T. (2020). Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? In *Pharmaceutical Research* (Vol. 37, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>

- Albrecht, M., Jiang, W., Kumi-Diaka, J., Lansky, E. P., Gommersall, L. M., Patel, A., Mansel, R. E., Neeman, I., Geldof, A. A., & Campbell, M. J. (2004). Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 7(3), 274–283. <https://doi.org/10.1089/jmf.2004.7.274>
- Almutairi, M. M. A., Gong, C., Xu, Y. G., Chang, Y., & Shi, H. (2016). Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 57–77. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2050-8>
- Ancelin, M. L., Scali, J., & Ritchie, K. (2007). Hormonal therapy and depression: Are we overlooking an important therapeutic alternative? *Journal of Psychosomatic Research*, 62(4), 473–485. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2006.12.019>
- Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., & Thomson, J. A. (2015a). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 51, 164–188. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018>
- Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., & Thomson, J. A. (2015b). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 51, 164–188. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018>
- Association, A. P. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.
- Atteritano, M., Mazzaferro, S., Bitto, a, Cannata, M. L., D'Anna, R., Squadrito, F., Macrì, I., Frisina, a, Frisina, N., & Bagnato, G. (2014). Genistein effects on quality of life and depression symptoms in osteopenic postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, controlled study. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 25, 1123–1129. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2512-5>
- Avis, N. E., Crawford, S., Stellato, R., & Longcope, C. (2001). Longitudinal study of hormone levels and depression among women transitioning through menopause. *Climacteric*, 4(3), 243–249. <https://doi.org/10.1080/cmt.4.3.243.249>
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. A. (1998). Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39–60.

<http://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/218>
<http://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/218/230>

- Bao, A. M., Meynen, G., & Swaab, D. F. (2008). The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. *Brain Research Reviews*, *57*(2), 531–553. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.005>
- Bart, H. J. (2011). Extraction of Natural Products from Plants - An Introduction. *Industrial Scale Natural Products Extraction*, 1–25. <https://doi.org/10.1002/9783527635122.ch1>
- Bedel, H. A., Kencebay Manas, C., Özbey, G., & Usta, C. (2018). The antidepressant-like activity of ellagic acid and its effect on hippocampal brain derived neurotrophic factor levels in mouse depression models. *Natural Product Research*, *32*(24), 2932–2935. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1385021>
- Bell, C., Ams, J. A. B. R., & T, D. N. U. T. (2001). Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *British Journal of Psychiatry*, *178*, 399–405.
- Berent-Spillson, A., Marsh, C., Persad, C., Randolph, J., Zubieta, J. K., & Smith, Y. (2017). Metabolic and hormone influences on emotion processing during menopause. *Psychoneuroendocrinology*, *76*, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.08.026>
- Berenzon, S., Psic, D., Lara, M. A., Cs, D., Robles, R., & Medina-mora, M. E. (2013). *Depresión: estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México*. *55*(1), 74–80.
- Bethea, C. L., Lu, N. Z., Gundlah, C., & Streicher, J. M. (2002). Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *23*(1), 41–100. <https://doi.org/10.1006/frne.2001.0225>
- Beyer, J. L., Johnson, K. G., & Johnson, K. G. (2018). *Advances in Pharmacotherapy of Late-Life Depression This article is part of the Topical Collection on Geriatric Disorders*. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0899-6>
- Björklund, A., Baumgarten, H. G., Lachenmayer, L., & Rosengren, E. (1975). Recovery of brain noradrenaline after 5,7-dihydroxytryptamine-induced axonal lesions in the rat. *Cell and Tissue Research*, *161*(2), 145–155. <https://doi.org/10.1007/BF00220363>
- Bocchino Castro, S. S. (2006). Aspectos psiconeuroendócrinos de la perimenopausia,

menopausia y climaterio: trastornos depresivos y cognitivos. Aspectos clínicos y terapéuticos. *Rev. Psiquiatr. Urug*, 70(1), 66–79.

Borkoles, E., Reynolds, N., Thompson, D. R., Ski, C. F., Stojanovska, L., & Polman, R. C. J. (2015). The role of depressive symptomatology in peri- and post-menopause. *Maturitas*, 81(2), 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.03.007>

Borrow, A. P., & Cameron, N. M. (2014a). Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: Implications for female mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.05.009>

Borrow, A. P., & Cameron, N. M. (2014b). Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: Implications for female mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.05.009>

Borsini, F., & Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, 94(2), 147–160. <https://doi.org/10.1007/BF00176837>

Bromberger, J. T., & Epperson, N. C. (2018). Depression During and After the Perimenopause: Impact of Hormones, Genetics and Environmental Determinants of Disease. *Obstet Gynecol Clin North*, 45(4), 663–678. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2018.07.007>.

Bromberger, J. T., Matthews, K. A., Schott, L. L., Brockwell, S., Avis, N. E., Kravitz, H. M., Everson-Rose, S. A., Gold, E. B., Sowers, M. F., & Randolph, J. F. (2007). Depressive symptoms during the menopausal transition: The Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Journal of Affective Disorders*, 103(1–3), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2007.01.034>

Cai, H.-D., Tao, W.-W., Su, S.-I., Guo, S., Zhu, Y., Guo, J.-M., Qian, D.-W., Cong, X.-D., Tang, R.-M., & Duan, J.-A. (2017). Antidepressant activity of flavonoid ethanol extract of *Abelmoschus manihot* corolla with BDNF up-regulation in the hippocampus. *Yaoxue Xuebao*, 52(2). <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2016-0764>

Campbell, S., & MacQueen, G. (2004). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(6), 417–426.

- Castagné, V., Moser, P., Roux, S., & Porsolt, R. D. (2010). Rodent Models of Depression: Forced Swim and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. *Current Protocols in Pharmacology*, June, 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0508s49>
- Castrén, E., & Kojima, M. (2017). Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiology of Disease*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.010>
- Cederroth, C. R., & Nef, S. (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.027>
- Cerdá, B., Llorach, R., Cerón, J. J., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 18–28. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0396-4>
- Chávez-León, E., Uribe, M. P. O., & Serrano Gómez, C. (2008). Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT). *Salud Mental*, 31(4), 307–319. <https://doi.org/10.1157/13107798>
- Cheng, G., Wilczek, B., Warner, M., Gustafsson, J.-A., & Landgren, B.-M. (2007). Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause (New York, N.Y.)*, 14(3), 468–473. <https://doi.org/10.1097/GME.0b013e31802cc7d0>
- Chhibber, A., Woody, S. K., Karim Rumi, M. A., Soares, M. J., & Zhao, L. (2017). Estrogen receptor β deficiency impairs BDNF–5-HT_{2A} signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression. *Psychoneuroendocrinology*, 82(November 2016), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.016>
- Chmielewska, N., Szyndler, J., Maciejak, P., & Płaźnik, A. (2019). Epigenetic mechanisms of stress and depression. *Psychiatria Polska*, 53(6), 1413–1428. <https://doi.org/10.12740/PP/94375>
- Chockalingam, R., Gott, B. M., & Conway, C. R. (2019). Tricyclic Antidepressants and Monoamine Oxidase Inhibitors: Are They Too Old for a New Look? *Handbook of Experimental Pharmacology*, 250, 37–48. https://doi.org/10.1007/164_2018_133
- Choi, D. W., Kim, J. Y., Choi, S. H., Jung, H. S., Kim, H. J., Cho, S. Y., Kang, C. S., & Chang, S. Y. (2006). Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using

HPLC and GC–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 96, 562–571.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.010>

- Clark, J. a., Alves, S., Gundlah, C., Rocha, B., Birzin, E. T., Cai, S. J., Flick, R., Hayes, E., Ho, K., Warriar, S., Pai, L., Yudkovitz, J., Fleischer, R., Colwell, L., Li, S., Wilkinson, H., Schaeffer, J., Wilkening, R., Mattingly, E., ... Rohrer, S. P. (2012). Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and cause antidepressant-like effects in the forced swim test. *Neuropharmacology*, 63, 1051–1063. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.004>
- Colle, R., De Larminat, D., Rotenberg, S., Hozer, F., Hardy, P., Verstuyft, C., Fève, B., & Corruble, E. (2017). PPAR- γ Agonists for the Treatment of Major Depression: A Review. *Pharmacopsychiatry*, 50(2), 49–55. <https://doi.org/10.1055/s-0042-120120>
- Contreras, C. M. (2010). Efectos del bupropión sobre depresión, ansiedad y abstinencia a nicotina. *Archivos de Neurociencias*, 15(4), 260–266.
- Contreras, C. M., Rodríguez-Landa, J. F., Gutiérrez-García, A. G., & Bernal-Morales, B. (2001). The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, 15(4), 231–236. <https://doi.org/10.1177/026988110101500401>
- Cottingham, C., Percival, S., Birky, T., & Wang, Q. (2014). Tricyclic antidepressants exhibit variable pharmacological profiles at the α_2A adrenergic receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(3), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.024>
- Crandall, C. J., Hovey, K. M., Andrews, C., Cauley, J. a., Stefanick, M., Shufelt, C., Prentice, R. L., Kaunitz, A. M., Eaton, C., Wactawski-Wende, J., & Manson, J. E. (2017). Comparison of clinical outcomes among users of oral and transdermal estrogen therapy in the Women's Health Initiative Observational Study. *Menopause*, 24(10), 1. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000899>
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238–245.

[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02017-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02017-5)

- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., & Gustafsson, J. Å. (2006). International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological Reviews*, *58*(4), 773–781. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.8>
- Davinelli, S., Scapagnini, G., Marzatico, F., Nobile, V., Ferrara, N., & Corbi, G. (2017). Influence of equol and resveratrol supplementation on health-related quality of life in menopausal women: A randomized, placebo-controlled study. *Maturitas*, *96*, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.11.016>
- Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*, *27*(2017), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
- Dear, J. W., & Bateman, D. N. (2016). Antidepressants. *Medicine*, *44*(3), 135–137. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.12.027>
- Deecher, D., Andree, T. H., Sloan, D., & Schechter, L. E. (2008). From menarche to menopause: Exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. *Psychoneuroendocrinology*, *33*, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.10.006>
- Dellaflora, L., Mena, P., Cozzini, P., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2013). Modelling the possible bioactivity of ellagitannin-derived metabolites. In silico tools to evaluate their potential xenoestrogenic behavior. *Food & Function*, *4*(10), 1442–1451. <https://doi.org/10.1039/c3fo60117j>
- Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, *121*, 66–72. <https://doi.org/10.1007/BF02245592>
- Dhingra, D., & Chhillar, R. (2012). Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. *Pharmacological Reports*, *64*(4), 796–807. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70875-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70875-7)
- Di Paolo, T., Daigle, M., Picard, V., & Barden, N. (1983). Effect of Acute and Chronic 17 β -Estradiol Treatment on Serotonin and 5-Hydroxyindole Acetic Acid Content of Discrete Brain Nuclei of Ovariectomized Rat T. *Experimental Brain Research*, *51*, 73–76.

- Donner, N. C., & Handa, R. J. (2009). Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan- hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience*, *163*(2), 705–718. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.046>. Estrogen
- Douma, S. L., Husband, C., O'Donnell, M. E., Barwin, B. N., & Woodend, a K. (2005). Estrogen-related mood disorders: reproductive life cycle factors. *ANS. Advances in Nursing Science*, *28*(4), 364–375. <https://doi.org/00012272-200510000-00008> [pii]
- Drevets, W. C., Price, J. L., Simpson, J. R., Todd, R. D., Reich, T., Vannier, M., & Raichle, M. E. (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature*, *386*(6627), 824–827. <https://doi.org/10.1038/386824a0>
- Du, Y., Gao, X. R., Peng, L., & Ge, J. F. (2020). Crosstalk between the microbiota-gut-brain axis and depression. *Heliyon*, *6*(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04097>
- Duman, R. S., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2019). Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. *Neuron*, *102*(62), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.013>. Altered
- Duval MD, F., Jautz-Duval MA, M., González MD, F., & Rabia MD, H. (2010). Bases neurobiológicas de vulnerabilidad psiquiátrica a lo largo de las etapas de la vida hormonal de la mujer. *Revista Chilena Neuro-Psiquiatria*, *48*(4), 292–306.
- Eguíluz Uruchurtu, I. (2010). Historia de la Psicofarmacología. In *Tratado de Psicofarmacología*. Editorial Médica Panamericana. <https://doi.org/10.1016/j.angio.2014.05.001>
- El-Hadary, A. E., & Taha, M. (2020). Pomegranate peel methanolic-extract improves the shelf-life of edible-oils under accelerated oxidation conditions. *Food Science and Nutrition*, *8*(4), 1798–1811. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1391>
- El Mansari, M., Guiard, B. P., Chernoloz, O., Ghanbari, R., Katz, N., & Blier, P. (2010). Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *16*(3), 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00146.x>
- Esp, J. C. (2013). *Biological significance of the gut microbial ellagic acid-derived metabolites urolithins*. 2013(Figure 1).

- Estrada-Camarena, E., López-Rubalcava, C., & Fernández-Guasti, a. (2006). Facilitating antidepressant-like actions of estrogens are mediated by 5-HT1A and estrogen receptors in the rat forced swimming test. *Psychoneuroendocrinology*, *31*, 905–914. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.05.001>
- Estrada-Camarena, Erika, Fernández-Guasti, A., & López-Rubalcava, C. (2004). Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, *173*(1), 139–145. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1707-4>
- Estrada-Camarena, Erika, Fernández-Guasti, A., & López-Rubalcava, C. (2006). Participation of the 5-HT1A receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, *31*(2), 247–255. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300821>
- Estrada-Camarena, Erika, López-Rubalcava, C., Valdés-Sustaita, B., Azpilcueta-Morales, G. S., & González-Trujano, E. M. (2017). Use of Phytoestrogens for the Treatment of Psychiatric Symptoms Associated with Menopause Transition. *A Multidisciplinary Look at Menopause*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69541>
- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M. H., & Bayat, M. (2005). Note. physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*punica granatum L.*) grown in Iran. *Food Science and Technology International*, *11*(2), 113–119. <https://doi.org/10.1177/1082013205052765>
- Fang, Yu; Scott, Laura; Song, Peter; Burmesiter, Margit; Sen, S. (2020). Genomic Prediction of Depression Risk and Resilience Under Stress. *Nature Human Behavior*, *4*(1), 111–118. <https://doi.org/10.1038/s41562-019-0759-3>. Genomic
- Feinstein, D. L., Heneka, M. T., Gavrilyuk, V., Dello Russo, C., Weinberg, G., & Galea, E. (2002). Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochemistry International*, *41*(5), 357–365. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00049-9)
- Feinstein, D. L., Kalinin, S., & Braun, D. (2016). Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 154–178. <https://doi.org/10.1111/jnc.13447>
- Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, *36*(5), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>

- Freeman, E. W., Sammel, M. D., Lin, H., & Nelson, D. B. (2006). Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression. *Archives of General Psychiatry*, 63(4), 375–382. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.4.375>
- Freeman, E. W., Sammel, M. D., Liu, L., Gracia, C. R., Nelson, D. B., & Hollander, L. (2004). Hormones and menopausal status as predictors of depression in women in transition to menopause. *Archives of General Psychiatry*, 61, 62–70. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.1.62>
- Froldi, M., Lazzarin, A., & Zanussi, C. (1990). The inflammatory process. *Acta Otorhinolaryngologica Italica: Organo Ufficiale Della Società Italiana Di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale*, 10 Suppl 2, 11–21. <https://doi.org/10.1097/00000441-196603000-00035>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Cancer Research*, 116, 137–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>. Estrogen
- Galindo, P., González-Manzano, S., Zarzuelo, M. J., Gómez-Guzmán, M., Quintela, A. M., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C., Pérez-Vizcaíno, F., Duarte, J., & Jiménez, R. (2012). Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. *Food and Function*, 3(6), 643–650. <https://doi.org/10.1039/c2fo10268d>
- Garcia-Muñoz, C., & Vaillant, F. (2014). Metabolic fate of ellagitannins: implications for health, and research perspectives for innovative functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(August 2016), 1584–1598. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.644643>
- Gartlehner, G., Wagner, G., Matyas, N., Titscher, V., Greimel, J., Lux, L., Gaynes, B. N., Viswanathan, M., Patel, S., & Lohr, K. N. (2017). Pharmacological and non-pharmacological treatments for major depressive disorder: Review of systematic reviews. *BMJ Open*, 7(6), 1–13. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-014912>
- German-Ponciano, L. J., Rosas-Sánchez, G. U., Rivadeneyra-Domínguez, E., & Rodríguez-Landa, J. F. (2018). Advances in the Preclinical Study of Some Flavonoids as Potential Antidepressant Agents. *Scientifica*, 2018(February). <https://doi.org/10.1155/2018/2963565>
- Giorgi, F. S., Biagioni, F., Galgani, A., Pavese, N., Lazzeri, G., & Fornai, F. (2020). Locus

coeruleus modulates neuroinflammation in parkinsonism and dementia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228630>

Girish, C., Raj, V., Arya, J., & Balakrishnan, S. (2012). Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*, 682(1–3), 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.02.034>

González-Barrio, R., Truchado, P., Ito, H., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. a. (2011). UV and MS identification of urolithins and nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1152–1162. <https://doi.org/10.1021/jf103894m>

González-Trujano, M. E., Pellicer, F., Mena, P., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 7486(June 2016), 1–5. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1024208>

Gordon, J. L., Eisenlohr, T. E., Rubinow, D. R., Shrubbe, L., & Girdler, S. S. (2016). Naturally Occurring Changes in Estradiol Concentrations in the Menopause Transition Predict Morning Cortisol and Negative Mood in Perimenopausal Depression. *Clin Psychol Sci.*, 4(5), 919–935. <https://doi.org/10.1177/2167702616647924>.

Gordon, J. L., Girdler, S. S., Meltzer-Body, S. E., Stika, C., Thurston, R. C., Clarck, C. T., Prairie, B. A., Moses-Kolko, E., Joffe, H., & Wisner, K. L. (2015). Ovarian Hormone Fluctuation, Neurosteroids and HPA Axis Dysregulation in Perimenopausal Depression: A novel Heuristic Model. *American Journal of Psychiatry*, 172(3), 227–236. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.14070918.Ovarian>

Gordon, J. L., Rubinow, D. R., Eisenlohr, T. E., Leserman, J., & Girdler, S. S. (2016). Estradiol Variability, Stressful life Events and the Emergence of Depressive Symptomatology During the Menopause Transition. *Menopause*, 23(3), 257–266. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000528>.

Green, S. M., Key, B. L., & McCabe, R. E. (2015). Cognitive-behavioral, behavioral, and mindfulness-based therapies for menopausal depression: A review. *Maturitas*, 80(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.10.004>

Gressier, F., Verstuyft, C., Hardy, P., Becquemont, L., & Corruble, E. (2014). Menopausal

status could modulate the association between 5-HTTLPR and antidepressant efficacy in depressed women: a pilot study. *Archives of Women's Mental Health*, 17(6), 569–573. <https://doi.org/10.1007/s00737-014-0464-1>

Grochans, E., Grzywacz, A., Jurczak, A., Samochowiec, A., Karakiewicz, B., Brodowska, A., Starczewski, A., & Samochowiec, J. (2013). The 5HTT and MAO-A polymorphisms associate with depressive mood and climacteric symptoms in postmenopausal women. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.05.007>

Gutiérrez-Rojas, L., Porras-Segovia, A., Dunne, H., Andrade-González, N., & Cervilla, J. A. (2020). Prevalence and correlates of major depressive disorder: A systematic review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 42(6), 657–672. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-0650>

Gyllstrom, M. E., Schreiner, P. J., & Harlow, B. L. (2007). Perimenopause and depression: strength of association, causal mechanisms and treatment recommendations. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 21(2), 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.11.002>

Hale, G. E., Robertson, D. M., & Burger, H. G. (2014). The perimenopausal woman: Endocrinology and management. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.08.015>

Handley, A. P., & Williams, M. (2015). The efficacy and tolerability of SSRI/SNRIs in the treatment of vasomotor symptoms in menopausal women: A systematic review. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 27(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/2327-6924.12137>

Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Goodman Gilman, A. (2001). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J.-Å. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>

Henriet, P., Gaide Chevonnay, H. P., & Marbaix, E. (2012). The endocrine and paracrine control of menstruation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(2), 197–207.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.042>

- Hewitt, S. C., Winuthayanon, W., & Korach, K. S. (2016). What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *Journal of Molecular Endocrinology*, *56*(2), R55–R71. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0254>
- Hirose, A., Terauchi, M., Akiyoshi, M., Owa, Y., Kato, K., & Kubota, T. (2016). Low-dose isoflavone aglycone alleviates psychological symptoms of menopause in Japanese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *293*(3), 609–615. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3849-0>
- Holzmann, I., Da Silva, L. M., Corrêa Da Silva, J. A., Steimbach, V. M. B., & De Souza, M. M. (2015). Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrergic pathways. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *136*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.07.003>
- Hussain, G., Huang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Maqbool, J., Razzaq, A., Aziz, N., Makhdoom, E. ul H., Konuk, M., & Sun, T. (2019). Putative roles of plant-derived tannins in neurodegenerative and neuropsychiatry disorders: An updated review. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/molecules24122213>
- Ili, H. E. C., Maze, I., Laplant, Q. C., Vialou, V. F., Ohnishi, Y. N., Berton, O., Fass, D. M., Renthal, W., Ili, A. J. R., Wu, E. Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S. J., Tamminga, C., Haggarty, S. J., & Nestler, E. J. (2009). *Antidepressant Actions of Histone Deacetylase Inhibitors*. *29*(37), 11451–11460. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1758-09.2009>
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, *143*(2), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>
- Jankord, R., & Herman, J. P. (2008). Limbic Regulation of HPA Function during Acute and Chronic Stress. In *Neuroendocrinology* (Vol. 73, pp. 64–73).
- Johnson, J. D., Campisi, J., Sharkey, C. M., Kennedy, S. L., Nickerson, M., Greenwood, B. N., & Fleshner, M. (2005). Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*, *135*(4), 1295–1307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.090>

- Kageyama, A., Sakakibara, H., Zhou, W., Yoshioka, M., Ohsumi, M., Shimoi, K., & Yokogoshi, H. (2010). Genistein regulated serotonergic activity in the hippocampus of ovariectomized rats under forced swimming stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*(10), 2005–2010. <https://doi.org/10.1271/bbb.100238>
- Kalshetti, P., Alluri, R., & Thakurdesai, P. (2015). Antidepressant and anti-anxiety effect of ellagic acid from *Punica granatum* L. rind in olfactory bulbectomy model in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *34*(1), 197–204.
- Kapusta, A. (2013). “Theory of incomprehensibility” - The social and biological determinants of mental disorders. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *20*(4), 832–837.
- Kawabata, K., Mukai, R., & Ishisaka, A. (2015). Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food & Function*, *6*, 1399–1417. <https://doi.org/10.1039/c4fo01178c>
- Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, N. C. (1993). Sex and depression in the National Comorbidity Survey. *Journal of Affective Disorders*, *29*, 85–96.
- Khanbabaee, K., & Ree, T. Van. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, *18*(January 2002), 641–649. <https://doi.org/10.1039/B101061L>
- Kimani, N. L., Njagi, E. N., & Orinda, G. O. (2018). In-Vivo Oral and Intraperitoneal Administration of Extract from *Vernonia lasiopus*. *Medicinal & Aromatic Plants*, *06*(06). <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000308>
- Klimek, V., Stockmeier, C., Overholser, J., Meltzer, H. Y., Kalka, S., Dilley, G., & Ordway, G. A. (1997). Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *Journal of Neuroscience*, *17*(21), 8451–8458. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08451.1997>
- Klotz, L., Sastre, M., Kreutz, A., Gavrilyuk, V., Klockgether, T., Feinstein, D. L., & Heneka, M. T. (2003). Noradrenaline induces expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) in murine primary astrocytes and neurons. *Journal of Neurochemistry*, *86*(4), 907–916. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01909.x>
- Koebele, S. V., & Bimonte-Nelson, H. a. (2016a). Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, *87*, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.015>

- Koebele, S. V., & Bimonte-Nelson, H. a. (2016b). Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, *87*, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.015>
- Korgaonkar, M. ., Grieve, S. M., Etkin, A., Koslow, S. H., & Williams, L. M. (2013). Using Standardized fMRI Protocols to Identify Paterns of Prefrontal Circuit Dysregulation that are Common and Specific to Cognitive and Emotional Tasks in Major Depressive Disorder: First Wave Results from the iSPOT-D Study. *Neuropsychopharmacology*, *38*, 863–871.
- Kornstein, S. G., McIntyre, R. S., Thase, M. E., & Boucher, M. (2014). Desvenlafaxine for the treatment of major depressive disorder. *Expert Opinion. Pharmacotherapy*, *15*(10). <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.923403>
- Kostelac, D., Rechkemmer, G., & Briviba, K. (2003). Phytoestrogens Modulate Binding Response of Estrogen Receptors α and β to the Estrogen Response Element. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(26), 7632–7635. <https://doi.org/10.1021/jf034427b>
- Kotsiou, A., & Tesseromatis, C. (2015). Punica granatum L. Punicaceae, pomegranate fruit as functional food. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition*, *29*(1).
- Krolick, K. N., Zhu, Q., & Shi, H. (2018). Effects of Estrogens on Central Nervous System Neurotransmission: Implications for Sex Differences in Mental Disorders. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 160). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.008>
- Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. Å. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors and α and β . *Endocrinology*, *138*(3), 863–870. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4979>
- Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Van Der Saag, P. T., Van Der Burg, B., & Gustafsson, J. Å. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, *139*(10), 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>
- Kujawska, M., Jourdes, M., Kurpik, M., Szulc, M., Szaefer, H., Chmielarz, P., Kreiner, G., Krajka-Kuzniak, Mikolajczak, P., Teissedre, P.-L., & Jodynis-Liebert, J. (2019).

Neuroprotective Effects of Pomegranate Juice against Parkinson's Disease and Presence of Ellagitannins-Derived Metabolite-Urolithin A-In the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(202). <https://doi.org/DOI: 10.3390/ijms21010202>

Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>

Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. a., & Espín, J. C. (2006). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1611–1620. <https://doi.org/10.1021/jf0527403>

Lee, B., & Park, Y. (2014). *Lower serum brain-derived neurotrophic factor levels are associated with failure to achieve remission in patients with major depression after escitalopram treatment*. 1393–1398.

Lee, M. H., Lin, R. D., Shen, L. Y., Yang, L. L., Yen, K. Y., & Hou, W. C. (2001). Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonoids in *Melastoma candidum* D. Don. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5551–5555. <https://doi.org/10.1021/jf010622j>

Lener, M. S., Niciu, M. J., Ballard, E. D., Park, M., Park, L. T., Nugent, A., & Zarate Jr., C. A. (2017). Glutamate and GABA Systems the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. *Biological Psychiatry*, 81(10), 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.05.005>.Glutamate

Lethaby, A., Marjoribanks, J., Kronenberg, F., Roberts, H., Eden, J., & Brown, J. (2013). Phytoestrogens for menopausal vasomotor symptoms. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12(12), CD001395. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001395.pub4>

Lipińska, L., Klewicka, E., & Sójka, M. (2014). Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: A general review. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 13(2013), 289–299. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.3.7>

Lohoff, F. W. (2010). Overview of the genetics of major depressive disorder. *Current Psychiatry Reports*, 12(6), 539–546. <https://doi.org/10.1007/s11920-010-0150-6>

López-Rubalcava, C., Oikawa-Sala, J., Chávez-Álvarez, K.&Estrada-Camarena, E. (2005)

Analysis of the participation of the serotonergic system in the antidepressant-like action of 17beta -estradiol in the forced swimming test (fst): presynaptic or postsynaptic. (2005). 567, 2005.

- Lorigooini, Z., Salimi, N., Soltani, A., & Amini-Khoei, H. (2019). Implication of NMDA-NO pathway in the antidepressant-like effect of ellagic acid in male mice. *Neuropeptides*, 76(April), 101928. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.04.003>
- Luo, Y., Kataoka, Y., Ostinelli, E. G., Cipriani, A., & Furukawa, T. A. (2020). National Prescription Patterns of Antidepressants in the Treatment of Adults With Major Depression in the US Between 1996 and 2015: A Population Representative Survey Based Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 11(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00035>
- Machado, D. G., Bettio, L. E. B., Cunha, M. P., Santos, A. R. S., Pizzolatti, M. G., Brighente, I. M. C., & Rodrigues, A. L. S. (2008). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 587(1–3), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.021>
- Majd, M., Saunders, E. F. H., & Engeland, C. G. (2019). Inflammation and the dimensions of depression: A review. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 100800. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100800>
- Maki, P. M., Kornstein, S. G., Joffe, H., Bromberger, J. T., Freeman, E. W., Athappilly, G., Bobo, W. V., Rubin, L. H., Koleva, H. K., Cohen, L. S., & Soares, C. N. (2018). Guidelines for the evaluation and treatment of perimenopausal depression: Summary and recommendations. *Journal of Women's Health*, 0(0), 117–134. <https://doi.org/10.1089/jwh.2018.27099.mensocrec>
- Malhi, G. S., & Mann, J. J. (2018). Depression. *The Lancet*, 392(10161), 2299–2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230–243. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230s>
- Manas, E. S., Xu, Z. B., Unwalla, R. J., & Somers, W. S. (2004). Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor- α using X-ray crystallography and computational methods. *Structure*, 12, 2197–2207.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.015>

- Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., & Cesa, S. (2016). Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry*, *202*, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.106>
- Matrisciano, F., & Pinna, G. (2020). PPAR and functional foods: Rationale for natural neurosteroid-based interventions for postpartum depression. *Neurobiology of Stress*, *12*(March). <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100222>
- McCorvy, J. D., & Roth, B. L. (2015). Structure and function of serotonin G protein coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *150*, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.009>
- Medina-Mora, María Elena; Borges, Guilherme, Benjet, Corina; Lara, María del Carmen; Rojas, Estela; Fleiz, Clara; Zambrano, Joaquín; Villatoro, Jorge; Blanco, Jerónimo; Aguilar - Gaxiola, S. (2009). Estudio de los trastornos mentales en México: Resultados de la Encuesta Mundial de Salud Mental.pdf. *Epidemiología de Los Trastornos Mentales En América Latina y El Caribe*, 79–89.
- Meltzer-Brody, S., & Kanes, S. J. (2020). Allopregnanolone in postpartum depression: Role in pathophysiology and treatment. *Neurobiology of Stress*, *12*(February), 100212. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100212>
- Michelsen, K. a., Schmitz, C., & Steinbusch, H. W. M. (2007). The dorsal raphe nucleus-From silver stainings to a role in depression. *Brain Research Reviews*, *55*, 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.002>
- Middha, S. K., Usha, T., & Pande, V. (2013). HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from Punica granatum Fruit Peel. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2013*, 296236. <https://doi.org/10.1155/2013/296236>
- Mohamed, I., Shuid, a, Borhanuddin, B., & Fozi, N. (2012). The Application of Phytomedicine in Modern Drug Development. *The Internet Journal of Herbal and Plant Medicine*, *1*(2), 1–9. <http://ispub.com/IJHPM/1/2/14278>
- Molendijk, M. L., Bus, B. A. A., Spinhoven, P., Penninx, B., Kenis, G., & Prickaerts, J. (2010).

Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder : state – trait issues , clinical features and pharmacological treatment. *Molecular Psychiatry*, 16(11), 1088–1095. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.98>

Monteleone, P., Mascagni, G., Giannini, A., Genazzani, A. R., & Simoncini, T. (2018). Symptoms of menopause - Global prevalence, physiology and implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(4), 199–215. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.180>

Moore, A., Beidler, J., & Hong, M. Y. (2018). Resveratrol and depression in animal models: A systematic review of the biological mechanisms. *Molecules*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092197>

Moreira, A. C., Silva, A. M., Santos, M. S., & Sardão, V. a. (2014a). Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.01.016>

Moreira, A. C., Silva, A. M., Santos, M. S., & Sardão, V. A. (2014b). Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.01.016>

Mori-Okamoto, J., Otawara-Hamamoto, Y., Yamato, H., & Yoshimura, H. (2004). Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.006>

Mostalac-Preciado, C. R., de Gortari, P., & López-Rubalcava, C. (2011). Antidepressant-like effects of mineralocorticoid but not glucocorticoid antagonists in the lateral septum: Interactions with the serotonergic system. *Behavioural Brain Research*, 223(1), 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.008>

Naveen, S., Siddalingaswamy, M., Singsit, D., & Khanum, F. (2013). Anti-depressive effect of polyphenols and omega-3 fatty acid from pomegranate peel and flax seed in mice exposed to chronic mild stress. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 67(7), 501–508. <https://doi.org/10.1111/pcn.12100>

Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34, 13–25. <https://doi.org/10.1016/S0896->

- Niciu, M. J., Lonescu, D. F., Richards, E. M., & Zarate Jr., C. A. (2014). Glutamate and its receptor in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. *J Neural Transm*, *121*(8), 907–924. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Ochoa-de la Paz, L. D., Gulias-Cañizo, R., Ruíz-Leyja, E. D. Abril, Sánchez-Castillo, H., & Parodí, J. (2020). *The role GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology and pathophysiology.pdf*. <https://doi.org/10.24875/RMN.2000050>
- Ogundajo, A. ., Imoru, J. ., & Asaolu, F. . (2014). Quercetin Potentiates Hepatoprotective and Antioxidant Response to Intraperitoneal, Intravenous, Subcutaneous and Oral Administration in Wistar Rats. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, *4*(38), 57–61. <https://doi.org/10.15272/ajbps.v4i38.629>
- Ohno, Y. (2012). New Insight into the Therapeutic Role of 5-HT1A Receptors in Central Nervous System Disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, *10*(2), 148–157. <https://doi.org/10.2174/187152410791196341>
- Okada, M., Hayashi, N., Kometani, M., Nakao, K., & Inukai, T. (1997). Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17beta-estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, *73*, 93–96. <https://doi.org/10.1254/jjp.73.93>
- Olivares-Morales, A., Hatley, O. J. D., Turner, D., Galetin, A., Aarons, L., & Rostami-Hodjegan, A. (2014). The use of ROC analysis for the qualitative prediction of human oral bioavailability from animal data. *Pharmaceutical Research*, *31*(3), 720–730. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1193-2>
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, *753*, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- Ordway, G. A., Schenk, J., Stockmeier, C. A., May, W., & Klimek, V. (2003). Elevated agonist binding to α 2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. *Biological Psychiatry*, *53*(4), 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01728-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01728-6)
- Organization, W. H. (2017). *Depression and other common mental disorder. Global Health Estimates*.
- Packová, D., Maruniaková, N., Halenár, M., Carbonell-barrachina, Á. A., Kolesárová, A., &

- Dagmarapacková, I. (2014). *Effective Compounds of Pomegranate and Their Effect on Animal Cells*. 2012–2014.
- Pandarakalam, J. P. (2018). *Challenges of treatment-resistant depression*. 30(3), 273–284.
- Pandey, M., Debnath, M., Gupta, S., & Chikara, S. K. (2011). Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3(March), 27–37. <http://www.academicjournals.org/jpp>
- Papoutsi, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G. P., & Moutsatsou, P. (2005). Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7715–7720. <https://doi.org/10.1021/jf0510539>
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. a., & Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, 90, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>
- Pathak, L., Agrawal, Y., & Dhir, A. (2013). Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(7), 863–880. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.794783>
- Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(4), 400–419. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.03.003>
- Pérez Sales, P. (2004). *Psicología y psiquiatría transcultural. Bases prácticas para la acción*. <https://www.edesclee.com/img/cms/pdfs/9788433018441.pdf>
- Pestana-Oliveira, N., Kalil, B., Leite, C. M., Carolino, R. O. G., Debarba, L. K., Elias, L. L. K., Antunes-Rodrigues, J., & Anselmo-Franci, J. A. (2018). Effects of estrogen therapy on the serotonergic system in an animal model of perimenopause induced by 4-vinylcyclohexen diepoxide (VCD). *ENeuro*, 5(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0247-17.2017>
- Pettorruso, M., Andrea, G., Martinotti, G., Cocciolillo, F., Miuli, A., Muzio, I. Di, Collevicchio, R., Verrastro, V., De-giorgio, F., Janiri, L., Giannantonio, M., Giuda, D. Di, & Camardese, G. (2020). *Hopelessness, Dissociative Symptoms, and Suicide Risk in Major Depressive Disorder: Clinical and*. 1–11.
- Phillips, C. (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plasticity*, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/7260130>

- Picazo, O., Estrada-Camarena, E., & Hernandez-Aragon, A. (2006). Influence of the post-ovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *European Journal of Pharmacology*, 530, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.024>
- Pinto-Meza, A., Usall, J., Serrano-Blanco, A., Suárez, D., & Haro, M. (2006). *Gender differences in response to antidepressant treatment prescribed in primary care. Does menopause make a difference?* <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.02.010>
- Pitsillou, E., Bresnehan, S. M., Kagarakis, E. A., Wijoyo, S. J., Liang, J., Hung, A., & Karagiannis, T. C. (2020). The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. *Molecular Biology Reports*, 47(1), 753–770. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05129-3>
- Price, G., & Patel, D. A. (2020). *Drug Bioavailability* (T. I. (FL): S. Publishing (Ed.); [Updated 2).
- Quigley, E. M. M. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(12). <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0802-6>
- Rachman, I. M., Unnerstall, J. R., Pfaff, D. W., & Cohen, R. S. (1998). Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13941–13946. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13941>
- Rafful, C., Medina-Mora, M. E., Borges, G., Benjet, C., & Orozco, R. (2012). Depression, gender, and the treatment gap in Mexico. *Journal of Affective Disorders*, 138(1–2), 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.12.040>
- Rajewska, J., & Rybakowski, J. K. (2003). Depression in premenopausal women: Gonadal hormones and serotonergic system assessed by D-fenfluramine challenge test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(4), 705–709. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00085-X)
- Razafsha, M., Behforuzi, H., Harati, H., Wafai, R. A. L., Khaku, A., Mondello, S., Gold, M. S., & Kobeissy, F. H. (2013). An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience*, 240, 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.045>

- Récamier-Carballo, S., Estrada-Camarena, E., Reyes, R., & Fernández-Guasti, A. (2012). Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. *Behavioural Brain Research*, *233*(2), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.034>
- Rocha, B. A., Fleischer, R., Schaeffer, J. M., Rohrer, S. P., & Hickey, G. J. (2005). 17 β -Estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor- β knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology*, *179*(3), 637–643. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2078-1>
- Rodríguez-Landa, J. F., Hernández-Figueroa, J. D., Hernández-Calderón, B. del C., & Saavedra, M. (2009). Anxiolytic-like effect of phytoestrogen genistein in rats with long-term absence of ovarian hormones in the black and white model. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*(2), 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.12.024>
- Romo-Vaquero, M., García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Beltrán, D., Tomás-Barberán, F. a., Espín, J. C., & Selma, M. V. (2015). Interindividual variability in the human metabolism of ellagic acid: Contribution of Gordonibacter to urolithin production. *Journal of Functional Foods*, *17*, 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.040>
- Rosenblat, J. D., Cha, D. S., Mansur, R. B., & McIntyre, R. S. (2014). Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *53*, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.01.013>
- Rubió, L., Maciá, A., & Motilva, M.-J. (2014). Impact of various factors on Pharmacokinetics of Bioactive Polyphenols: An Overview. *Current Drug Metabolism*, *15*, 62–76. <https://doi.org/10.1080/1875-5453.2014.958000>
- Sahara, S., Yanagawa, Y., O'Leary, D. D. M., & Stevens, C. F. (2012). The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *Journal of Neuroscience*, *32*(14), 4755–4761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6412-11.2012>
- Santollo, J., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., & Eckel, L. A. (2010). Activation of ER α is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Endocrinology*, *150*(5), 872–877. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.007>

- Sassarini, D. J. (2016). Depression in midlife women. *Maturitas*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.09.004>
- Schmitt, E., & Stopper, H. (2001). Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutrition and Cancer*, 41, 145–149. https://doi.org/10.1207/S15327914NC41-1&2_20
- Seeram, N. P., Aronson, W. J., Zhang, Y., Henning, S. M., Moro, A., Lee, R. P., Sartippour, M., Harris, D. M., Rettig, M., Suchard, M. a., Pantuck, A. J., Beldegrun, A., & Heber, D. (2007). Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7732–7737. <https://doi.org/10.1021/jf071303g>
- Seeram, N. P., Lee, R., & Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, 348, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.029>
- Serafini, G., Adavastro, G., Canepa, G., De Berardis, D., Valchera, A., Pompili, M., Nasrallah, H., & Amore, M. (2018). The efficacy of buprenorphine in major depression, treatment-resistant depression and suicidal behavior: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082410>
- Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Desai, P. B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Jakate, A. S., Creutzinger, V., & Heubi, J. E. (2003). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *The Journal of Nutrition*, 133(August 2002), 1027–1035.
- Setiawan, E., Wilson, A. A., Mizrahi, R., Rusjan, P. M., Miler, L., Rajkowska, G., Suridjan, I., Kenndy, J. L., Rekkas, V., Houle, S., & Meyer, J. H. (2015). Role of Translocator Protein Density, a Marker of Neuroinflammation in the Brain During MAJOR Depressive Episodes. *JAMA Psychiatry*, 72(9), 268–275. <https://doi.org/doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.2427>
- Shapero, Benjamin G.; Black, Shimirit k.; Liu, Richard T.; Klugman, Joshua; Bender, Rachel E.; Abramson, Lyn Y.; Alloy, L. B. (2014). Stressful Life Events and Depression Symptoms.pdf. *Journal of Clinical Psychology*, 70(3), 209–223.
- Sharma, J., & Maity, A. (2010). Pomegranate Phytochemicals : Nutraceutical and Therapeutic Values. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*.
- Shima, N., Yamaguchi, Y., & Yuri, K. (2003). Distribution of estrogen receptor β mRNA-

- containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anatomical Science International*, 78(2), 85–97. <https://doi.org/10.1046/j.0022-7722.2003.00042.x>
- Sloley, B. D., Urichuk, L. J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J. J., Pang, P. K. T., & Coutts, R. T. (2000). Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of Ginkgo Biloba Leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(4), 451–459. <https://doi.org/10.1211/0022357001774075>
- Soares, C N, Almeida, O. P., Joffe, H., & Cohen, L. S. (2001). Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry*, 58(June 2001), 529–534.
- Soares, Claudio N. (2013). Depression in Peri- and Postmenopausal Women: Prevalence, Pathophysiology and Pharmacological Management. *Drugs & Aging*, 30, 677–685. <https://doi.org/10.1007/s40266-013-0100-1>
- Soares, Claudio N. (2014). Mood disorders in midlife women: Understanding the critical window and its clinical implications. *Menopause*, 21(2), 198–206. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000193>
- Souza, L. C., de Gomes, M. G., Goes, A. T. R., Del Fabbro, L., Filho, C. B., Boeira, S. P., & Jesse, C. R. (2013). Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 40(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.09.003>
- Sreeja, S., Santhosh Kumar, T. R., Lakshmi, B. S., & Sreeja, S. (2012). Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(7), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.03.015>
- Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., Azeez, J. M., & Sreeharshan, S. (2014). Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/686921>
- Stein, P., Baldinger, P., Kaufmann, U., Christina, R. M., Hahn, A., Höflich, A., Kranz, G. S., Savli, M., Wadsak, W., Mitterhauser, M., Winkler, D., Kasper, S., & Lanzenberger, R. (2014). Relation of progesterone and DHEAS serum levels to 5-HT1A receptor binding potential in pre- and postmenopausal women. *Psychoneuroendocrinology*, 46, 52–63.

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.04.008>

- Sullivan, P. F., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*, *157*(10), 1552–1562. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>
- Sun, Z., Biela, L. M., Hamilton, K. L., & Reardon, K. F. (2012). Concentration-dependent effects of the soy phytoestrogen genistein on the proteome of cultured cardiomyocytes. *Journal of Proteomics*, *75*(12), 3592–3604. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.001>
- Suzuki, H., Barros, R. P. A., Sugiyama, N., Krishnan, V., Yaden, B. C., Kim, H.-J., Warner, M., & Gustafsson, J.-Å. (2013). Involvement of estrogen receptor β in maintenance of serotonergic neurons of the dorsal raphe. *Molecular Psychiatry*, *18*(6). <https://doi.org/10.1038/mp.2012.62>
- Tadi, A., Wagner, S., Friedrich, K., Peetz, D., Borysenko, L., Dreimüller, N., Hiemke, C., & Lieb, K. (2011). *The early non-increase of serum BDNF predicts failure of antidepressant treatment in patients with major depression: A pilot study*. *35*, 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.011>
- Tellez-Vargas, J. (2000). La Noradrenalina y Su Rol En La Depresión. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, *29*(1), 50–73.
- ter Horst, G. J. (2010). Estrogen in the limbic system. *Vitamins and Hormones*, *82*(10), 319–338. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82017-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82017-5)
- Tian, X. J., Yang, X. W., Yang, X., & Wang, K. (2009). Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics*, *367*(1–2), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.023>
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). Pharmacotherapy of Depression. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Second, Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Tomás-Barberán, F. a., González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. a., Selma, M. V., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2016). Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Molecular Nutrition and Food Research*, 1–35. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500901>

- Tomás-Barberán, F. A., Seeram, N. P., & Espín, J. C. (2006). Bioavailability of Pomegranate polyphenols. In *Pomegranates. Ancient Roots to Modern Medicine*.
- Trebatická, J., & ůuračková, Z. (2015). Psychiatric disorders and polyphenols: Can they be helpful in therapy? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/248529>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)
- Valdés-Sustaita, B., López-Rubalcava, C., González-Trujano, M. E., García-Viguera, C., & Estrada-Camarena, E. (2017). Aqueous extract of pomegranate alone or in combination with citalopram produces antidepressant-like effects in an animal model of menopause: Participation of estrogen receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18122643>
- Valvassori, S. S., Budni, J., Varela, R. B., & Quevedo, J. (2013). Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1168>
- van Elswijk, D. a, Schobel, U. P., Lansky, E. P., Irth, H., & van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.07.001>
- Vargas, K. G., Milic, J., Zaciragic, A., Wen, K., Jaspers, L., Nano, J., Dhana, K., Bramer, W. M., Kraja, B., van Beeck, E., Ikram, M. A., Muka, T., & Franco, O. H. (2016). The functions of estrogen receptor beta in the female brain: A systematic review. *Maturitas*. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.05.014>
- Vaváková, M., ůuračková, Z., & Trebatická, J. (2015). Markers of Oxidative Stress and Neuroprogression in Depression Disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/898393>
- Vega-Rivera, N. M., Fernández-Guasti, A., Ramírez-Rodríguez, G., & Estrada-Camarena, E.

- (2013). Acute stress further decreases the effect of ovariectomy on immobility behavior and hippocampal cell survival in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1407–1417. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.12.008>
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/789764>
- Villas Boas, G. R., Boengen de Lacerda, R., Paes, M. M., Gubert, P., Almeida, W. L. da C., Rescia, V. C., de Carvalho, P. M. G., de Carvalho, A. A. V., & Oesterreich, S. A. (2019). Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *European Journal of Pharmacology*, 851(October 2018), 99–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.02.024>
- Vini, R., & Sreeja, S. (2015). Punica granatum and its therapeutic implications on breast carcinogenesis: A review. *BioFactors*, 41(2). <https://doi.org/10.1002/biof.1206>
- Voineskos, D., Daskalakis, Z. J., & Blumberger, D. M. (2020). Management of treatment-resistant depression: Challenges and strategies. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 16, 221–234. <https://doi.org/10.2147/NDT.S198774>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86(2), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.003>
- Walf, A. a., Rhodes, M. E., & Frye, C. a. (2004). Antidepressant effects of ER??-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.03.023>
- Walker, F. R. (2013). A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacology*, 67, 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.10.002>
- Wang, C., Shi, L., Fan, L., Ding, Y., Zhao, S., Liu, Y., & Ma, C. (2013). Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 42, 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.031>

- Warfvinge, K., Krause, D. N., Maddahi, A., Edvinsson, J. C. A., Edvinsson, L., & Haanes, K. A. (2020). Estrogen receptors α , β and GPER in the CNS and trigeminal system - molecular and functional aspects. *Journal of Headache and Pain*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s10194-020-01197-0>
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., & Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2331–2371. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>
- Worsley, R., Davis, S. R., Gavrillidis, E., Gibbs, Z., Lee, S., Burger, H., & Kulkarni, J. (2012). Hormonal therapies for new onset and relapsed depression during perimenopause. *Maturitas*, 73(2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.06.011>
- Wu, S., & Tian, L. (2017). Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*punica granatum*). In *Molecules* (Vol. 22). <https://doi.org/10.3390/molecules22101606>
- Xiao, W. Z., Zhou, W. H., Ma, Q., Cui, W. G., Mei, Q. Y., & Zhao, X. (2019). Serotonergically dependent antidepressant-like activity on behavior and stress axis responsivity of acacetin. *Pharmacological Research*, 146(December 2018), 104310. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104310>
- Yang, F., Tao, J., Xu, L., Zhao, N., Chen, J., Chen, W., Zhu, Y., & Qiu, J. (2014). Estradiol decreases rat depressive behavior by estrogen receptor beta but not alpha: No correlation with plasma corticosterone. *NeuroReport*, 25(2), 100–104. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000052>
- Yi, L. T., Li, C. F., Zhan, X., Cui, C. C., Xiao, F., Zhou, L. P., & Xie, Y. (2010). Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(7), 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.024>
- Youdim, M. B. H., Edmondson, D., & Tipton, K. F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(April), 295–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1883>
- Yu, Y. W. Y., Tsai, S. J., Hong, C. J., Chen, T. J., Chen, M. C., & Yang, C. W. (2005). Association study of a Monoamine oxidase A gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology*, 30(9),

1719–1723. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300785>

- Yuan, T., Ma, H., Liu, W., Niesen, D. B., Shah, N., Crews, R., Rose, K. N., Vattem, D. a., & Seeram, N. P. (2016). Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS Chemical Neuroscience*, 7, 26–33. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00260>
- Zanardi, R., Rossini, D., Magri, L., Malaguti, a., Colombo, C., & Smeraldi, E. (2007). Response to SSRIs and role of the hormonal therapy in post-menopausal depression. *European Neuropsychopharmacology*, 17, 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.11.001>
- Zand, R. S., Jenkins, D. J., & Diamandis, E. P. (2000). Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62(Figure 2), 35–49.
- Zava, D. T., Blen, M., & Duwe, G. (1997a). Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environmental Health Perspectives*, 105 Suppl(April), 637–645. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s3637>
- Zava, D. T., Blen, M., & Duwe, G. (1997b). Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environmental Health Perspectives*, 105 Suppl(April), 637–645. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s3637>
- Zhang, F. F., Peng, W., Sweeney, J. A., Jia, Z. Y., & Gong, Q. Y. (2018). Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 24(11), 994–1003. <https://doi.org/10.1111/cns.12835>
- Zhang, L., Fu, Q., & Zhang, Y. (2011). Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(4), 1444–1449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.077>
- Zorumski, C. F., Paul, S. M., Izumi, Y., Covey, D. F., & Mennerick, S. (2013). Neurosteroids, stress and depression: Potential therapeutic opportunities. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(1), 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.10.005>
- Zuccari, G., Baldassari, S., Ailuno, G., Turrini, F., Alfei, S., & Caviglioli, G. (2020). Formulation strategies to improve oral bioavailability of ellagic acid. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/APP10103353>

