



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Influencia de la condición endocrina sobre el efecto tipo  
antidepresivo y ansiolítico del agonista inverso de H<sub>3</sub>R,  
clobenpropit: diferencias por sexo”**

T E S I S

Q. F. B. Karen Itzel Hernández Bellido

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS  
EN  
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPEÚTICA EXPERIMENTAL

DIRECTORA DE LA TESIS

Dra. Carolina López Rubalcava

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 17 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional sed sur; bajo la dirección de la Dra. Carolina López Rubalcava y el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca que me fue otorgada con el número 718031.

*“Un científico es un aventurero que salta a la penumbra intentando encontrar un nuevo camino y lo hace transitable para el que lo sigue”*

Así que ha ti que has decido recorrer este camino.

*“Estudiar no es un acto de consumir ideas, sino de crearlas y recrearlas”*

Benito Taibo

## **Agradecimientos**

A la Dra. Carolina López por brindarme el punto de partida para la realización del proyecto, así como el material y guía para su conclusión; a la Dra. Erica Estrada por darle sentido a la mayoría de mis divagaciones y animarme a seguirme cuestionando y a la Dra. Gabriela Rodríguez por sus acertados comentarios y observaciones que enriquecieron este trabajo. Sin el apoyo de estas grandes científicas simplemente este trabajo no existiría.

A Isabel Beltran, la cirujana de ratón más rápida y divertida que tuve la oportunidad de conocer, por todas sus enseñanzas y paciencia, gracias por comprometerte tanto o más con este trabajo de lo que seguramente te correspondía.

A mis compañeros de laboratorio: Héctor, Luis, Helena, Brenda y Mónica por acompañarme y ayudarme en el proceso de realización de experimentos; por las puntuales observaciones y acertados consejos. Además del invaluable tiempo invertido en comer rico.

A Dani mi asesora de diapositivas y redacción, compañera de debate, asistente recurrente de experimentos, terapeuta de medio tiempo y porrista frecuente entre muchos más papeles que desempeño como mi amiga más cercana en el cinvest.

A Abril, Citlalli y German por seguir aquí, a pesar del tiempo y la distancia. Gracias por hacer más de lo que me atrevía a pedir; por escuchar, impulsar y comprender. Por acompañarme en esta travesía cada uno a su particular manera y nutrir mi vida de magia y fantasía.

A Lizbeth, por encontrar más memes científicos de los que creía posible y por la música y las malas películas cuando me sentí abrumada. Gracias por aceptarme como tu hermanita. A May por cubrir todas las esquinas y las continuas porras. Gracias por no dejarme sola con lo fácil que era hacerlo.

A Fran por no dar las cosas por sentado y animarme a nunca rendirme y siempre buscar alternativas. Por lo mucho que aprendí de mi país limítrofe.

A mis padres por su apoyo, comprensión y animo que nunca disminuyo a pesar de la distancia y complicaciones que la vida puso ante nosotros. Por brindarme las bases y el entorno para desarrollar mi curiosidad. Por valorar mi conocimiento, pero también enfatizar mis aspectos más humanos. Por considerarme una experta y hacerme sentir invaluable.

Al resto de mi familia por sus ánimos y consuelo en los momentos más inesperados. Por considerarme en más estima de lo que me creo yo misma capaz.

A los ratones empleados, por ser el material fundamental para el desarrollo de este trabajo y los sujetos que dieron respuesta a fin de cuentas a mis preguntas.

## Índice de contenido

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Depresión	3
1.1. Fisiopatología de la depresión	4
1.2. Tratamiento de la depresión	6
1.3. Estudio preclínico de la depresión	9
1.3.1. Prueba de nado forzado	9
2. Ansiedad	10
2.1. Tratamiento para la ansiedad	14
2.2. Estudio preclínico de la ansiedad	15
2.2.1. Enterramiento defensivo	16
2.2.2. Laberinto elevado en cruz	17
3. La ansiedad y la depresión en la mujer	18
4. Histamina	21
4.1. Receptores a Histamina	22
4.1.1. Receptor H <sub>3</sub>	24
4.1.1.1. Clobenpropit	26
4.2. Histamina y hormonas ováricas	27
Justificación	28
Hipótesis	29
Objetivos	29
Objetivos generales	29
Objetivos particulares	29
Materiales y métodos	30
1. Animales	30
2. Fármacos	30
3. Técnica de ovariectomía	30
4. Actividad locomotora	31
5. Enterramiento defensivo	31

6. Laberinto elevado en cruz	32
7. Nado forzado	34
8. Diseño experimental	34
8.1. Comparación del efecto tipo antidepresivo y ansiolítico de clobenpropit.	34
8.2. Determinación del efecto de diferentes dosis fisiológicas de 17- $\beta$ estradiol en las acciones ansiolíticas y antidepresivas de clobenpropit.	35
9. Análisis estadístico	36
Resultados	36
1. Efecto de la administración de clobenpropit en ratones macho, hembra intactas y hembra OVX en las conductas tipo ansiedad y depresión.	36
1.1. Efecto de clobenpropit en el modelo de enterramiento defensivo.	36
1.2. Efecto de clobenpropit en el laberinto elevado en cruz.	38
1.3. Efecto de clobenpropit en la prueba de nado forzado.	39
1.4. Efecto de clobenpropit en las evaluaciones motrices.	41
2. Efecto de la administración de E <sub>2</sub> en hembras OVX en modelos de ansiedad y depresión.	41
2.1. Efecto de E <sub>2</sub> en el modelo de enterramiento defensivo.	42
2.2. Efecto de la administración de E <sub>2</sub> en la prueba de laberinto elevado en cruz.	43
2.3. Efecto de E <sub>2</sub> en la prueba de nado forzado.	43
2.4. Efectos de la administración de E <sub>2</sub> en las evaluaciones motoras.	44
3. Efecto de la administración de clobenpropit en combinación de E <sub>2</sub> en ratones hembra OVX en modelos de ansiedad y depresión.	45
3.1. Efecto de la combinación de E <sub>2</sub> y clobenpropit en el modelo de enterramiento defensivo.	45
3.2. Efecto de la combinación de E <sub>2</sub> y clobenpropit en el modelo de laberinto elevado en cruz.	46
3.3. Efecto de la combinación de E <sub>2</sub> y clobenpropit en el modelo de nado forzado.	48

3.4. Efecto de la administración de E <sub>2</sub> y clobenpropit en las evaluaciones motoras.	50
Discusión	50
1. Motricidad de los sujetos experimentales.	50
2. Efectos de la administración de clobenpropit en modelos de ansiedad en ratones macho, hembra intactas y ovariectomizadas.	51
3. Efectos de la administración de clobenpropit en el modelo de nado forzado en ratones macho, hembra intactas y ovariectomizadas.	56
4. Efectos tipo ansiolítico y antidepresivo de la administración exógena de E <sub>2</sub> , en Hembras OVX.	58
5. Efectos de clobenpropit en conjunto con E <sub>2</sub> en ratones hembra OVX en la conducta tipo ansiedad.	60
6. Los efectos de clobenpropit en conjunto con E <sub>2</sub> en la conducta tipo depresión.	62
Conclusión	63
Perspectiva	64
Bibliografía	64

### Índice de figuras

Figura 1. Sitios de acción de los antidepresivos en las terminales nerviosas noradrenérgicas y serotoninérgicas.	8
Figura 2. Representación de las fluctuaciones naturales en los niveles de estrógenos periféricos a lo largo de la vida humana femenina y la incidencia de depresión.	19
Figura 3. El sistema histaminérgico en el cerebro humano.	22
Figura 4. Vías de transducción de las señales de los receptores de histamina.	23
Figura 5. Vías de señalización de H <sub>3</sub> R.	25
Figura 6. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado.	27

Figura 7. Diagrama del laberinto elevado en cruz.	33
Figura 8 Efecto de clobenpropit en el tiempo total de enterramiento en la prueba de enterramiento defensivo.	37
Figura 9 Efecto de la administración de clobenpropit en la latencia al enterramiento en prueba de enterramiento defensivo.	37
Figura 10. Efecto del clobenpropit en el número de entradas a brazos abiertos en laberinto en forma de cruz.	38
Figura 11. Efecto de clobenpropit en el tiempo total en brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz.	39
Figura 12 Efecto de la administración de clobenpropit en la prueba de nado forzado, conducta de inmovilidad.	40
Figura 13 Efecto de la administración de clobenpropit en las conductas activas en la prueba de nado forzado.	40
Figura 14. Efectos de E <sub>2</sub> en el modelo de enterramiento defensivo.	42
Figura 15. Efecto de E <sub>2</sub> en prueba de laberinto elevado en cruz.	43
Figura 16. Efecto de E <sub>2</sub> en la prueba de nado forzado.	44
Figura 17. Efecto de la combinación de clobenpropit con E <sub>2</sub> en la prueba de Laberinto elevado en cruz.	46
Figura 18. Efecto de la combinación de clobenpropit con E <sub>2</sub> en la prueba de Laberinto elevado en cruz.	47
Figura 19. Efecto de la combinación de clobenpropit con E <sub>2</sub> en la prueba de nado forzado.	49

## Índice de tablas

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico del trastorno de ansiedad generalizada.	13
Tabla 2. Evaluación de la motricidad en la prueba de actividad locomotora y laberinto elevado en cruz de ratones macho, hembras ovariectomizadas y hembras intactas.	41

Tabla 3. Evaluación de la motricidad en la prueba de actividad locomotora y laberinto elevado en cruz de ratones hembra ovariectomizadas con administración de E<sub>2</sub>. 44

Tabla 4. Evaluación de la motricidad en la prueba de actividad locomotora y laberinto elevado en cruz de ratones hembra ovariectomizadas con administración de E<sub>2</sub> y clobenpropit. 50

### Abreviaturas

5-TH <sub>1A</sub>	Receptor de serotonina 1 <sup>a</sup>
ANOVA	Análisis de varianza
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CIE-10	Clasificación internacional de las enfermedades Ed. 10
CTRL	Control
DSM-V	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales Ed .5
E <sub>2</sub>	Estradiol, 17-β estadiol
ERα	Receptor a estrógenos alfa
ERβ	Receptor a estrógenos beta
GABA	Acido gama aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor a acido gama aminobutírico. A
H <sub>3</sub> R	Receptor de histamina 3
HPA	Eje hipotálamo hipófisis adrenales
IMAO	Inhibidores de la monoamino oxidasa
IRN	inhibidores de la recaptación de noradrenalina
IRSN	inhibidores de la recaptación de serotonina noradrenalina
ISRS	inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
LEC/ EPM	laberinto elevado en cruz
OVX	ovarectonizados
SNC/CNS	sistema nervioso central
TCA	antidepresivos tricíclicos
TM	núcleo tuberomamilar

## Resumen

La depresión y la ansiedad son un problema de salud pública por su amplia incidencia y baja tasa de remisión con los tratamientos actuales, por ello aún se indagan nuevos mecanismos farmacológicos para tratarlos. Los agonistas inversos de H<sub>3</sub>R, como el clobenpropit, aumentan la liberación de histamina y otras monoaminas en el SNC lo que favorece procesos de plasticidad neuronal por lo que representan una nueva propuesta para tratar trastornos psiquiátricos como la ansiedad y la depresión. La investigación preclínica de los agonistas inversos de H<sub>3</sub>R como clobenpropit, indican que tienen efectos antidepresivos y ansiolíticos en roedores machos. Sin embargo, ambas patologías son dos veces más comunes en mujeres y la concentración de E<sub>2</sub> circulante repercute en la efectividad de los tratamientos actuales. Por lo tanto, el propósito de este estudio es determinar la efectividad de clobenpropit en ratones hembra en distintos estadios de concentración de E<sub>2</sub> para estimar si los agonistas inversos de H<sub>3</sub>R podrían utilizarse para el tratamiento de la ansiedad y depresión en mujeres. Para esto se organizaron cuatro grupos experimentales de ratones adultos un grupo control, administrado con solución salina vehículo de clobenpropit, y tres dosis de clobenpropit 1.25, 2.5 y 5 mg/kg i.p. en cinco tipos de sujetos experimentales: machos, hembras intactas, hembras OVX, hembras OVX administradas con 1 y 3 µg s.c. de E<sub>2</sub>. Para verificar el efecto tipo antidepresivo del clobenpropit se empleó la prueba de nado forzado y para analizar su efecto sobre la conducta tipo ansiedad se utilizaron las pruebas de enterramiento defensivo y laberinto elevado en cruz (LEC). Para descartar efectos inespecíficos de los tratamientos se evaluó la actividad locomotora en todos los sujetos. Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos modificó significativamente la actividad locomotora de los ratones. Clobenpropit demostró solo tener efecto tipo ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo en machos. En el LEC la dosis efectiva tipo ansiolítica varió entre los distintos tipos de sujetos experimentales y el efecto fue más intenso en los machos. Los efectos diferenciales entre machos y hembras podrían ser consecuencia de diferencias en la modulación del sistema histaminérgico entre sexos. Respecto de los efectos tipo antidepresivo, clobenpropit fue efectivo únicamente en los machos en el rango de dosis empleado. Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos con clobenpropit fue efectivo en hembras. De hecho, este compuesto bloqueó los efectos tipo ansiolítico y tipo antidepresivo de E<sub>2</sub>. Por lo tanto, podemos concluir que el uso de agonistas inversos de H<sub>3</sub>R no parece ser útil como un método para tratar la depresión y ansiedad en mujeres.

## **Abstract**

Depression and anxiety are widespread psychiatric disorders with a higher incidence in women. Even though there are treatments for both disorders their success rates are low, therefore the search for new pharmacological strategies continues. The H3R is a new proposal target for the treatment of both disorders: the use of an inverse agonist, increase the release of histamine and monoamines in the central nervous system, favoring neuroplasticity processes. Preclinical investigations shows that clobenpropit, an H3R inverse agonist, have antidepressant- and anxiolytic -like effects in male rodents, however its effect in a female model is still unknown. The aim of this study was to determine if the effect of clobenpropit in male mice could be replicated in female mice, evaluating its effect with different estradiol (E2) levels. For this purpose, we administered male and female (naïve, ovariectomized (OVX), and OVX administered with 1 and 3 ug of E2 s.c.) adult mice with clobenpropit i.p (0, 1.25, 2.5 and 5 mg/kg). Thirty minutes after administration we assessed: the depression-like behavior using the forced swim test; the anxiety-like behavior using the elevated plus maze and the defensive burying tests; and the presence of unspecified effects using the open field test. In male mice, clobenpropit presented anxiolytic- and antidepressant-like effect in the dose range used. In female mice, clobenpropit lacked antidepressant-like effect, and the only anxiolytic-like effect observed was in the elevated plus maze test in the naïve and OVX groups; further, the clobenpropit administration blockades the anxiolytic-type and antidepressant-type effects of E2. The differentiated effect observed could be a consequence of differences in the modulation of the histaminergic system among both sexes. In conclusion, the use of H3R inverse agonists could not be a method to treat depression and anxiety in women.

## **Introducción**

La depresión y la ansiedad son los principales padecimientos psiquiátricos en el mundo y en la población mexicana (Richardson y Barkham, 2020; Cárdenas et al. 2010; Arenas y Puigcerver, 2009). La población con mayor incidencia de estos trastornos son mujeres (Mori y Caballero, 2010; Arenas y Puigcerver, 2009), por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos para la depresión y la ansiedad debe enfocarse en los sujetos femeninos (Verma y Jain, 2016). El objetivo principal de la presente tesis es estudiar la efectividad de agonistas inversos del receptor de histamina 3 (H<sub>3</sub>R) como el clobenpropit, en sujetos femeninos para tratar dichos trastornos. Por lo tanto, a continuación, se presentan aspectos generales de la depresión, la ansiedad y el sistema histaminérgico que fueron necesarios para proponer este estudio.

### **1. Depresión**

La depresión es un trastorno del estado de ánimo caracterizado por sentimientos de culpa, abatimiento, deterioro cognitivo y la incapacidad de sentir placer ante estímulos que antes lo generaban. Estos síntomas en conjunto impiden al paciente desarrollar sus actividades cotidianas. Actualmente se estima que aproximadamente 98.7 millones de personas en todo el mundo padecen depresión (Richardson y Barkham, 2020). La prevalencia de por vida para la depresión varía de 8 a 12% en la población adulta (Üstün et al., 2004). En México la depresión es el principal trastorno psiquiátrico, dado que alrededor del 6.4 % de la población mexicana padece algún grado de depresión diagnosticado (Cárdenas et al. 2010).

De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V) y con la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-10) existen diversas formas de presentación del trastorno de depresión. En el DSM-V la depresión se divide en las siguientes categorías: trastorno depresivo mayor, distimia y trastorno depresivo no especificado, con base en la severidad de los síntomas. En la CIE-10 la depresión se incluye entre los trastornos del humor (o afectivos) y se clasifica en: episodio depresivo leve, moderado, grave sin síntomas psicóticos,

grave con síntomas psicóticos y otros tipos de episodios depresivos como estados depresivos sin especificación o atípicos (Pérez-Padilla et al., 2017).

Tanto el DSM-V como la CIE10 señalan como criterios de diagnóstico para el trastorno de depresión la presentación diaria, en un periodo de dos semanas, de al menos 5 de los siguientes síntomas (London-Pérez et al., 2017):

- Estado de ánimo depresivo o irritable (tristeza profunda).
- Disminución del interés en las actividades placenteras y la capacidad de experimentar placer (anhedonia).
- Aumento o pérdida de peso significativo (cambio de > 5% en un mes).
- Insomnio o hipersomnia.
- Agitación o retardo psicomotor.
- Fatiga o pérdida de energía.
- Sentimientos de inutilidad o de culpa excesiva.
- Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse.
- Pensamientos recurrentes de muerte o suicidio.

### **1.1 Fisiopatología de la depresión**

La depresión se debe a la interacción de factores ambientales, genéticos y epigenéticos que atenúan la transmisión monoaminérgica en el cerebro. La teoría monoaminérgica establece que existe una disminución en la tasa de liberación de estos neurotransmisores, principalmente noradrenalina, dopamina y serotonina, ocasionando un desbalance en la transmisión nerviosa, que genera cambios metabólicos y fisiológicos principalmente en hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (Hernández et al., 2016).

La terapia farmacológica actual se centra en revertir la atenuación de la transmisión monoaminérgica. A pesar de que los antidepresivos incrementan los niveles de monoaminas de forma instantánea, los efectos clínicos solo se observan después

de varias semanas de tratamiento (Mulinari, 2012). Es importante señalar que en alrededor del 40% de los pacientes no se presentan los efectos deseados (Mori y Caballero, 2010). En consecuencia, se ha planteado que deben de existir otros mecanismos, que interactúan con la deficiencia de monoaminas, implicados en el origen y persistencia de la enfermedad.

Por otra parte, se ha reportado una relación entre las citocinas proinflamatorias y los estados del ánimo. Las citocinas proinflamatorias producen alteraciones en la neuroplasticidad, causan atrofia y muerte neuronal, lo que a su vez favorece la manifestación de síntomas depresivos como la anhedonia, la fatiga, el cambio en el apetito y el retraso psicomotor (Barden, 2004). Además, las citocinas proinflamatorias ejercen su efecto depresivo al incrementar la activación de la hormona liberadora de corticotropinas, acción que causa la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que favorece un aumento en los niveles de glucocorticoides (Barden, 2004). Hay receptores a glucocorticoides en las células serotoninérgicas que modulan negativamente la actividad del receptor 5TH<sub>1A</sub> y alteran la función del sistema serotoninérgico. Por otra parte, el tratamiento crónico con antidepresivos disminuye las concentraciones de interleucinas proinflamatorias como interleucina 1b y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . La activación del sistema inmune en momentos específicos del neurodesarrollo o su activación desproporcionada ante estresores podría ser el origen de un subsecuente episodio de depresión (Pérez-Padilla et al., 2017).

También se ha planteado que la depresión puede ser el resultado de experiencias estresantes de la vida que causan daños neuronales y por consiguiente defectos en el procesamiento cerebral (Mulinari, 2012). Se demostró que el estrés psicosocial causa atrofia de las células piramidales de la región CA3 en el hipocampo y disminuye la neurogénesis en la circunvolución dentada de ratones adultos. Con ello se postula que estos efectos del estrés podrían contribuir a la reducción del volumen del hipocampo observado en pacientes deprimidos (Doboszewska et al., 2017). Estudios preclínicos y clínicos han sugerido que la fisiopatología de la

depresión está asociada con la incapacidad de los sistemas neuronales para presentar plasticidad (Castrén, 2013).

La vulnerabilidad para la depresión inducida por el estrés y la acción terapéutica de los tratamientos antidepresivos se producen a través de mecanismos intracelulares que disminuyen y aumentan, respectivamente, los factores neurotróficos necesarios para la supervivencia o la función de las neuronas (Duman et al., 1997). Estudios preclínicos han demostrado que el estrés reduce la expresión y actividad del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo y que esta reducción se puede prevenir mediante el tratamiento con antidepresivos (Lee y Kim 2010). La síntesis y la activación de las vías de señalización del BDNF son necesarias para observar los efectos conductuales de los fármacos antidepresivos en roedores (Castrén et al.,2007).

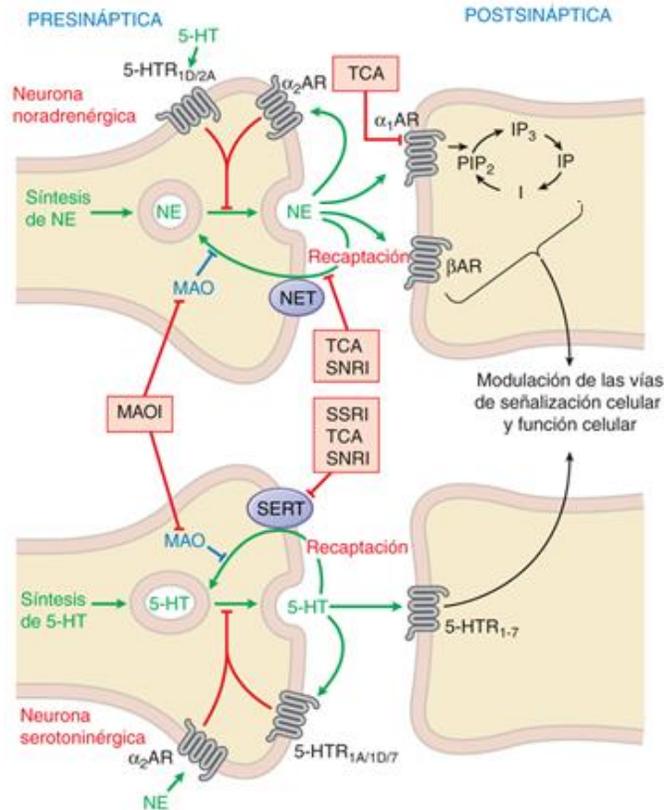
La hipótesis neurotrófica de la depresión propone que la depresión está asociada con niveles reducidos de BDNF cerebral, lo que a su vez causa una alteración de la plasticidad neuronal en estructuras cerebrales relevantes para el procesamiento de emociones (Pérez-Padilla et al., 2017; Lee y Kim, 2010). El tratamiento con antidepresivos en pacientes con trastorno depresivo por cuatro semanas restaura la concentración disminuida de BDNF hasta valores normales (Lee y Kim 2010). Los antidepresivos reducen los síntomas depresivos mediante la acción de BDNF promoviendo varias formas de plasticidad neuronal, incluida la neurogénesis, la sinaptogénesis y la maduración neuronal, lo que genera una recuperación gradual de redes neuronales a través de mecanismos de plasticidad neuronal inducida por actividad. Los factores neurotróficos en sí mismos no controlan el estado de ánimo, pero actúan como herramientas necesarias en la modulación de la actividad de redes neuronales específicas, cuya función fisiológica influye en el estado de ánimo (Castrén et al.,2007).

## **1.2 Tratamiento de la depresión**

Los antidepresivos empleados actualmente en la clínica se diseñaron con el objetivo de aumentar la liberación y permanencia de monoaminas en el espacio sináptico (figura 1), tanto de forma inmediata como consistente a través del tiempo. Sin

embargo, se requiere de al menos 4 semanas de tratamiento antidepresivo para que el paciente presente una mejoría, y existen grupos de pacientes resistentes al tratamiento (Hernández et al. 2016; Mori y Caballero, 2010).

Existen cinco clases principales de antidepresivos en la práctica clínica: los antidepresivos tricíclicos (TCA), los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (IRN), los inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN) y los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI). Los diversos antidepresivos, inhiben por diferentes mecanismos la recaptura y degradación de noradrenalina, serotonina y dopamina; como consecuencia de esto se incrementa la interacción entre los neurotransmisores y sus receptores. Dicha interacción modifica la acción de las proteínas G, las vías de señalización intracelular y la fosforilación de la proteína quinasa A o la proteína quinasa C generando la activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos que cambian la actividad basal de la neurona, estos cambios pueden llevar de horas a días (O'Donnell et al., 2019).



**Figura 1. Sitios de acción de los antidepresivos en las terminales nerviosas noradrenérgicas (arriba) y serotoninérgicas (abajo).** Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI), los inhibidores de la recaptura de noradrenalina y serotonina (SNRI) y los antidepresivos tricíclicos (TCA) aumentan la neurotransmisión noradrenérgica o serotoninérgica al bloquear el transportador de noradrenalina o serotonina (NET o SERT) en las terminales presinápticas. Los inhibidores de la MAO (MAOI) inhiben la degradación de noradrenalina (NE) y serotonina (5-HT). El tratamiento prolongado con varios antidepresivos desensibiliza a los autorreceptores y heterorreceptores presinápticos produciendo efectos sostenidos en la neurotransmisión monoaminérgica (modificado de O'Donnell et al., 2019).

Todos los antidepresivos tienen efectos secundarios indeseables (Xu et al., 2012). El rango de efectos adversos con los ISRS (náuseas, mareos, anorexia) generalmente se considera menos grave que el de los antidepresivos tricíclicos (boca seca, sedación, hipotensión postural, dificultad en la micción), por lo que un ISRS generalmente se recomienda como tratamiento de primera línea (Tyrer y Baldwin, 2006). Sin embargo, la mayoría de los pacientes no responde

adecuadamente al primer tratamiento por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos aún persiste.

### **1.3 Estudio preclínico de la depresión**

Los modelos animales son esenciales en la investigación preclínica sobre la neurobiología de los trastornos psiquiátricos y ayudan a evaluar fármacos candidatos para tratarlos (Bourin, 2018). En los modelos animales solo se pueden modelar de forma individual algunos síntomas específicos de los trastornos psiquiátricos medibles, denominados endofenotipos. Se han descrito los siguientes endofenotipos para depresión en animales: anhedonia, desesperanza conductual, aislamiento social, cambios en el apetito, alteraciones en el peso corporal, cambios neuroanatómicos, alteraciones neuroendocrinas y alteraciones del sueño (Holmes, 2003).

Un modelo animal debe contemplar no solo replicar las características esenciales de la depresión en humanos, mostrando similitud o equivalencia en los comportamientos evaluados (validez aparente), sino que también predecirá de manera confiable la actividad antidepressiva en un nuevo compuesto (validez predictiva). Finalmente, el modelo conductual debe demostrar la relación biológica con la enfermedad que intenta modelar (la validez de constructo) (Bourin, 2018).

#### **1.3.1 Prueba de nado forzado**

La prueba de nado forzado clásicamente se empleó como modelo de conducta para descubrir nuevos medicamentos para tratar la depresión (Petit-Demouliere et al., 2005) y además es clave para estudiar los mecanismos neurobiológicos de la depresión (Bourin, 2018). Porsolt y cols. (1977) describieron por primera vez el modelo de nado forzado en ratones como "un método de comportamiento para inducir un estado deprimido en ratones". La metodología se basa en colocar a los ratones individualmente en cilindros de vidrio llenos de agua obligando al animal a nadar y mantenerse por arriba de la superficie del agua. Después de una actividad vigorosa, cesan los intentos de escape y el animal adopta una postura inmóvil. Se considera que un ratón está en postura inmóvil cuando deja de luchar y permanece

flotando inmóvil en el agua, haciendo solo los movimientos necesarios para mantener su cabeza fuera del agua (Porsolt et al., 1977). El estado de inmovilidad ha sido denominado "desesperanza conductual", endofenotipo de la depresión, con base en la idea antropomórfica de que los animales tienen la sensación de que no pueden escapar del cilindro (Petit-Demouliere et al., 2005). La administración de fármacos antidepresivos disminuye el tiempo que el animal permanece en la postura de inmovilidad (Porsolt et al. 1977)

La prueba de nado forzado, lejos de la expresión de las características clínicas de la depresión, tiene un buen enfoque traslacional, lo que significa que los tratamientos y métodos evaluados con la prueba de nado forzado tienen resultados semejantes en la patología en humanos (Bourin, 2010). El comportamiento y las características bioquímicas de los animales que adoptan la postura de inmovilidad, inducida por la prueba de nado forzado, ha llevado a creer que la situación en la que es colocado el animal *per se* proporciona un modelo animal de depresión. Posterior a los trabajos de Porsolt se propuso una mejora en la prueba de nado forzado, que consiste en contemplar otros dos parámetros: la conducta de nado y la conducta de escalamiento. Se sugirió que la conducta de escalamiento está involucrada en la respuesta inicial a la situación de prueba, mientras que la natación puede ser un comportamiento exploratorio secundario asociado con el escape. Los ISRS reducen la inmovilidad y aumentan la natación, mientras que los IRN reducen la inmovilidad y aumentan el escalamiento, sin afectar la natación (Detke et al., 1995; Bourin, 2018). La prueba de nado forzado también es sensible a diferencias de género y al estado hormonal de los sujetos evaluados (Petit-Demouliere et al., 2005). Los estudios comparativos indican que los roedores hembra tienen tiempos menores de inmovilidad y esto está directamente relacionado con la concentración de hormonas sexuales circulantes (Kokras et al., 2015).

## **2. Ansiedad**

La ansiedad alude a un estado de agitación e inquietud desagradable caracterizado por la anticipación del peligro inminente, acompañado de sensaciones corporales; es decir, es la combinación entre síntomas cognitivos y fisiológicos. Se manifiesta

como una reacción de sobresalto, donde el individuo trata de buscar una solución o salida al peligro, lo que provoca un estado generalizado de alerta y activación (Sierra et al., 2003). La ansiedad cumple una función adaptativa y prepara al individuo para hacer frente a posibles amenazas (Reyes-Ticas; 2010).

Si la ansiedad supera la normalidad en cuanto a los parámetros de intensidad, frecuencia y duración, o bien se relaciona con estímulos no amenazantes para el organismo, pierde su función adaptativa y se convierte en un trastorno (Reyes-Ticas; 2010). La incapacidad para inhibir adecuadamente el miedo es una característica central de los trastornos de ansiedad; las personas con trastornos de ansiedad evitan por completo situaciones que provoquen sus miedos o emplean comportamientos de seguridad desadaptativos (Sierra et al., 2003). Como trastorno, la ansiedad se asocia a una pérdida de control ante los potenciales riesgos de la vida cotidiana.

La ansiedad es el segundo padecimiento psiquiátrico, después de la depresión, con mayor prevalencia en la población en general (Orozco y Baldares, 2012). Además, la carga social, ocupacional y económica asociada a este padecimiento es similar a la de la depresión mayor (Tyrer y Baldwin, 2006). Alrededor del 20% de la población general padecerá a lo largo de su vida algún problema de ansiedad con suficiente importancia como para requerir tratamiento (Baeza et al., 2008). Sin embargo, solo dos de cada cinco pacientes buscarán tratamiento. Los estudios epidemiológicos en Europa sugieren que la enfermedad tiene una prevalencia de por vida de 4.3–5.9%. La tasa de remisión total o parcial a largo plazo (5 años o más) es únicamente del 38-41% (Tyrer y Baldwin, 2006). En México el trastorno de ansiedad tiene una prevalencia en la población general de alrededor del 3%, con mayor incidencia en personas de entre 40-50 años y en menor grado, en la población mayor de 60 años (Arenas y Puigcerver, 2009).

La vulnerabilidad para desarrollar trastornos de ansiedad es individual y depende de los estilos de afrontamiento ante amenazas comunes. Un estilo de afrontamiento puede definirse como: "un conjunto coherente de respuestas de estrés conductual y fisiológico que es consistente con el tiempo y que es característico de un

determinado grupo de individuos". Los estilos de afrontamiento son más o menos comparables con los rasgos de "temperamento" o "personalidad" en los humanos, y forman la base de las diferencias individuales, que son esenciales para mantener la capacidad de adaptación de la especie (o población) en condiciones ambientales cambiantes. Los aspectos genéticos, epigenéticos y aprendidos del estilo de afrontamiento individual siguen siendo objeto de debate. Los individuos pueden clasificarse ampliamente en dos categorías: los proactivos y los reactivos. Dentro de cada categoría de estilo de afrontamiento, todavía hay un amplio espacio para una gran variabilidad interindividual (Steimer, 2011).

Las diferencias individuales en los estilos de afrontamiento y en la capacidad de lidiar con el miedo aprendido, los conflictos, los recuerdos del miedo y la anticipación de eventos adversos son los factores más importantes que determinan la vulnerabilidad a los trastornos de ansiedad. Los factores de predisposición genética y epigenética también juegan un papel importante, ya sea en sí mismos o en combinación con lo anterior (Steimer, 2011).

El trastorno de ansiedad se caracteriza por un estado de hipervigilancia, irritabilidad, problemas para conciliar el sueño, contracturas musculares en espalda, cuello y hombros, así como una sobre actividad del sistema nervioso simpático que genera boca seca, náuseas, mareo, sofoco, problemas gastrointestinales y taquicardia principalmente (Orozco y Baldares, 2012; Reyes-Ticas; 2010). En general, aunque el trastorno de ansiedad no es incompatible con la vida, como es el caso de la depresión, sí disminuye la calidad de vida drásticamente y limita el potencial de los sujetos afectados.

A grandes rasgos los trastornos de ansiedad se pueden clasificar por el objeto o situación que desencadena la ansiedad o exacerba los síntomas, que si no es capaz de determinarse se considera trastorno de ansiedad generalizado. En todo caso los criterios de diagnóstico del trastorno de ansiedad generalizado (tabla 1) son aplicables al resto de los trastornos de ansiedad para un diagnóstico preliminar (Baeza et al., 2008).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico del trastorno de ansiedad generalizada.

	<b>CIE-10</b>	<b>DSM-IV</b>
Síntoma principal	Tensión prominente, preocupación y sentimientos de aprensión sobre los eventos y problemas cotidianos.	Excesiva ansiedad y preocupación (expectativa aprensiva) sobre una serie de eventos o actividades
Característica principal adicional	..	Dificultad para controlar la preocupación.
Duración de los síntomas.	Al menos 6 meses	Al menos 6 meses
Número de síntomas necesarios para el diagnóstico.	Al menos cuatro, incluido un síntoma de excitación autónoma	Al menos tres
<b>Síntomas específicos</b>		
Excitación autónoma	Palpitaciones, sudoración, temblor, sequedad de boca.	..
Pecho y abdomen	Dificultad para respirar, sensación de asfixia, dolor en el pecho, náuseas.	..
Estado mental	Mareos, sentimientos de irrealidad (despersonalización o depresión), miedo a perder el control, miedo a morir.	Dificultad para concentrarse o mente en blanco
General	Sofocos o escalofríos, entumecimiento u hormigueo, tensión muscular o dolores y molestias, inquietud e incapacidad para relajarse, sensación de nudo en la garganta (dificultad para tragar)	Inquietud o sensación de tensión o nerviosismo, fatiga, irritación, tensión muscular.
Alteración del sueño	..	Dificultad para conciliar el sueño o quedarse dormido, sueño inquieto insatisfactorio
Efectos sobre el funcionamiento social.	..	Angustia o impedimento clínicamente significativo en funciones sociales, ocupacionales u otras funciones importantes
criterios de exclusión	Síntomas no causados por un trastorno físico como el hipertiroidismo, un trastorno mental orgánico o un trastorno relacionado con sustancias (p.	La alteración no es causada por efectos fisiológicos directos de una sustancia o medicamento, o por una dolencia general (por ejemplo, hipertiroidismo), y no ocurre

CIE-10	DSM-IV
Ej., Abstinencia de benzodiazepinas)	exclusivamente durante un trastorno del estado de ánimo, psicótico o trastorno generalizado del desarrollo.

*Modificada de Tyrer y Baldwin, 2006*

Existe una clara comorbilidad entre la depresión y la ansiedad patológica; hasta un 60% de los pacientes con depresión mayor refieren periodos de ansiedad prolongados que antecedieron a la aparición de la depresión (Kokras et al., 2019). La superposición de ambas enfermedades es tan común que al trastorno combinado se le ha llamado “cotimia” y se le da un trato separado en CIE-10 como "trastorno mixto de ansiedad y depresión", pero solo cuando "ningún tipo de síntoma está presente en la medida que justifique un diagnóstico si se presentara solo" (Tyrer y Baldwin, 2006).

## 2.1 Tratamiento para la ansiedad

El tratamiento de primera elección para los trastornos de ansiedad patológica es el uso de benzodiazepinas. Estos fármacos tienen como mecanismo de acción la facilitación de la apertura del canal de cloro de los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub>, disminuyendo la excitación neuronal en sistema nervioso central (SNC) lo que también genera sus efectos sedantes e hipnóticos, que limitan su uso prolongado (Brunton et al., 2019). Otras alternativas farmacológicas son los antidepresivos principalmente ISRS, cuyos efectos secundarios ya han sido abordados; buspirona, derivado de azapironas y agonista parcial de receptores 5TH<sub>1A</sub> y pregabalina, ligando del sitio auxiliar de la unidad  $\alpha_2\delta$  de los canales de calcio dependientes de voltaje (Brunton et al., 2019). Estos dos últimos fármacos tienen reportes de abuso por generar episodios de euforia, además de insomnio (Schjerning et al., 2016).

La elección del medicamento depende del grado de los efectos adversos percibido y los riesgos en cada paciente, la presencia de síntomas depresivos coexistentes y la necesidad de un inicio de acción temprano. Las benzodiazepinas pueden ser efectivas en 15 a 60 min, pero están asociadas a fenómenos de tolerancia y dependencia, mientras que la buspirona tarda hasta 72 h en actuar y su acción suele

ir precedida de una disforia leve. Los antidepresivos requieren de al menos 2 semanas para producir una mejoría clínicamente significativa. En general, todos los tratamientos actuales para tratar la ansiedad se encuentran ligados a riesgos por sus efectos secundarios, principalmente los efectos sedantes en el caso de las benzodiazepinas (Tyrer y Baldwin, 2006), por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos aun es una necesidad.

## **2.2 Estudio preclínico de la ansiedad**

La investigación sobre los tratamientos psicofarmacológicos de la ansiedad es un área activa. Se están reevaluando los medicamentos antiguos y se han ampliado sus indicaciones, mientras que en los últimos años se han agregado con éxito nuevos agentes importantes, como los ISRS. Actualmente se están sometiendo a pruebas nuevos compuestos con un perfil completamente diferente en comparación con los utilizados, probablemente con menos efectos adversos (Bourin, 2015).

Los modelos animales permiten el estudio de los mecanismos que subyacen a comportamientos específicos, su fisiopatología, y ayudan a desarrollar a agentes farmacológicos (Bourin et al., 2007). Sin embargo, la ansiedad no es una enfermedad unitaria, sino un fenómeno complejo que probablemente involucra orígenes etiológicos variados y muchos sistemas neuroquímicos diferentes. Además, en los animales no se pueden modelar todos los aspectos de la ansiedad humana. La aceptación clínica de la heterogeneidad del trastorno de ansiedad sugiere que existen sustratos neurobiológicos distintos para cada caso. Por lo tanto, es necesario examinar diferentes pruebas en animales para reflejar esas diferencias (Bourin, 2015).

Los modelos de ansiedad se pueden clasificar según la naturaleza del estímulo aversivo y la respuesta obtenida “enfrentamiento”, lo que sugiere que el control neuronal de la ansiedad puede diferir dependiendo de si la interpretación de una señal aversiva es innata o aprendida, y de si causa la emisión de una respuesta o por el contrario inhibe un comportamiento continuo y recompensado (Bourin et al., 2007).

El término "afrontamiento" se refiere a respuestas fisiológicas, psicológicas y conductuales destinadas a evitar daños o angustia; es conceptualmente equivalente a "mecanismos de defensa" y se aplica tanto a humanos como a animales. Existen dos estrategias principales y alternativas para enfrentar los desafíos o amenazas ambientales y/o psicosociales. Una es una estrategia de afrontamiento pasiva o reactiva (conservación/retirada), destinada a proteger al organismo de las posibles consecuencias de la amenaza. La otra es una estrategia de afrontamiento activa o proactiva, destinada a eliminar la fuente de amenaza, ya sea escapando o enfrentándola, respuesta originalmente descrita como la respuesta de "pelear o huir" (Steimer, 2011). Los modelos animales de miedo y ansiedad intentan aproximarse a las condiciones naturales bajo las cuales se producen tales estados emocionales.

Como ninguno de los modelos descritos a continuación involucra comportamientos patológicos relacionados con la ansiedad, se han descrito como modelos animales de ansiedad de "estado". La ansiedad de estado es la que se observa en respuesta a un estresor no condicionado y a la forma en que el estresor es introducido. En tales procedimientos, los sujetos experimentan ansiedad, en un momento particular en el tiempo, por la presencia de un estímulo ansiogénico y la ansiedad desaparece cuando el estímulo es retirado (Bourin et al., 2007).

### **2.2.1 Enterramiento defensivo**

El enterramiento defensivo se refiere al comportamiento típico de los roedores al desplazar el material de la cama con movimientos vigorosos de sus patas delanteras y movimientos de palanca de sus cabezas, dirigidos hacia una variedad de estímulos nocivos que representan una amenaza cercana e inmediata, como un diodo electrificado montado en la pared. Los roedores usualmente emplearán el material de cama para enterrar el objeto nocivo y de esta manera virtualmente eliminar el riesgo (De Boer y Koolhaas, 2003). En general, las respuestas conductuales y fisiológicas que se muestran en el paradigma se reconocen como una estrategia activa, que podría estar asociada a un proceso de aprendizaje (reflejo condicionado), dependiendo de cómo se presente el escenario (Bourin, 2015; Steimer, 2011).

La duración del comportamiento de enterramiento del objeto nocivo se considera el principal parámetro a evaluar, debido a que esta conducta se considera el único comportamiento defensivo motivado por un estado de miedo/ansiedad. El tiempo promedio dedicado al enterramiento varía considerablemente entre estudios y entre individuos, y típicamente representa una fracción (3–30%) del tiempo de observación total de la prueba estándar de 10-15 minutos. El tiempo dedicado a la cobertura del objeto aversivo disminuye con la administración previa de benzodiazepinas y otros fármacos con efectos ansiolíticos, extrapolando la sensibilidad a éstos en seres humanos. La evaluación de la conducta de enterramiento defensivo es adecuada para detectar propiedades ansiolíticas potenciales de nuevos fármacos. Además, al requerir la integración de distintos reflejos, este modelo parece ser especialmente valioso para desentrañar los circuitos neuronales y los mecanismos neuroquímicos que subyacen a la generación de respuestas de afrontamiento activas y pasivas, así como diferentes expresiones de ansiedad (De Boer y Koolhaas, 2003).

### **2.2.2 Laberinto elevado en cruz**

El laberinto elevado en cruz (LEC) se ha utilizado ampliamente como una herramienta en la investigación de las bases biológicas y neuroquímicas de la ansiedad, para detectar fármacos moduladores de la ansiedad o genotipos de roedores. El LEC tiene la forma de un 'signo matemático de "más" (+) con dos brazos elevados abiertos enfrentados entre sí y separados por un cuadrado central y dos brazos de las mismas dimensiones, pero cerrados con paredes paralelos a los brazos abiertos. El laberinto se eleva del suelo para que los brazos abiertos combinen elementos de desconocimiento, apertura y elevación. La prueba de LEC se basa en la aversión natural de los roedores por los espacios abiertos y utiliza el conflicto entre la tendencia natural a la exploración y la aversión a los lugares abiertos y elevados. Los perfiles de conducta provocados en el LEC parecen incluir elementos de neofobia, exploración y conflicto de aproximación/evitación. El aparato a menudo se conoce como un modelo de conflicto conductual espontáneo, incondicionado, que evalúa un tipo de afrontamiento pasivo (Bourin et al., 2007).

Los roedores generalmente mostrarán un patrón de comportamiento caracterizado por evitar los brazos abiertos, con una preferencia constante por los brazos cerrados. El perfil de preferencia en orden es cerrado → centro → abierto, indicativo de una inclinación por las secciones relativamente seguras del laberinto. Esta tendencia es suprimida por los ansiolíticos y potenciada por agentes ansiogénicos (Bourin, 2015).

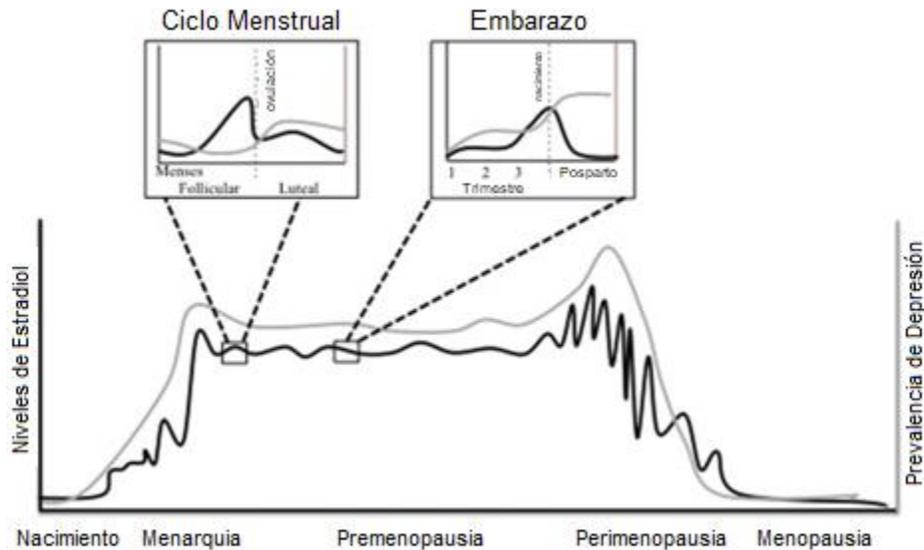
Debido a la superposición de efectos ansiolíticos y sedantes o psicoestimulantes de la mayoría de los fármacos una estrategia usual al usar modelos animales de ansiedad es realizar primero una prueba de actividad locomotora independiente para evitar falsos positivos en las pruebas de ansiedad (Bourin, 2015).

### **3. La ansiedad y la depresión en la mujer**

Las mujeres son la población más afectada por la depresión y los trastornos de ansiedad, en comparación con los varones en una relación 2:1. La prevalencia se mantiene en todos los grupos etarios en el caso de la depresión. En relación con sus homólogos varones los pacientes femeninos reportan una mayor cantidad y duración de episodios depresivos (Mori y Caballero, 2010). El trastorno de ansiedad generalizada declina su incidencia en hombres conforme avanza la edad, mientras que en los sujetos femeninos la incidencia incrementa (Arenas y Puigcerver, 2009).

Las fluctuaciones hormonales drásticas que ocurren a lo largo de la vida de la mujer parecen coincidir con la vulnerabilidad a las alteraciones del estado de ánimo. El riesgo de depresión y ansiedad en mujeres aumenta al inicio de la pubertad y las alteraciones del estado de ánimo, como el trastorno disfórico premenstrual, se asocian con cambios hormonales durante la menstruación. La fuerte caída en la producción de  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ) en la menopausia coincide con déficits cognitivos y mayor riesgo de depresión. Durante el embarazo, el período con mayor concentración de hormonas ováricas entre otras, las mujeres tienden a tener una respuesta de estrés atenuada y tienen un menor riesgo de trastornos del estado de ánimo que las mujeres no embarazadas (Cover et al., 2014). Sin embargo, la disminución dramática en los niveles hormonales después del embarazo predispone a un riesgo significativo de depresión posparto (Borrow y Cameron, 2014 Figura

2). Estos datos sugieren que las fluctuaciones de E<sub>2</sub> y otras hormonas sexuales influyen en las mujeres para aumentar el riesgo de desarrollar trastornos del estado de ánimo (Borrow y Cameron, 2014; Cover et al., 2014; Walf y Frye 2006).



**Figura 2. Representación de las fluctuaciones naturales en los niveles de estrógenos periféricos a lo largo de la vida humana femenina y la incidencia de depresión.** La línea negra representa la fluctuación de los estrógenos, la línea gris señala el índice de depresión (modificado de Borrow y Cameron, 2014).

Existe una correlación entre la incidencia de depresión en las mujeres y las etapas reproductivas asociadas con la mayor fluctuación en la producción de hormonas ováricas (figura 2). Estas etapas incluyen la fase premenstrual del ciclo menstrual, el período posparto y la perimenopausia (Borrow y Cameron, 2014). Entre la población femenina, los individuos más susceptibles a padecer trastornos del estado de ánimo pertenecen al grupo en la perimenopausia, etapa de transición entre la etapa reproductiva y la no reproductiva. La perimenopausia, es caracterizada por una mayor fluctuación hormonal que termina en la caída en la producción de estrógenos y progestinas. Además, las mujeres posmenopáusicas reportan una disminución en la eficacia de los fármacos antidepresivos en relación con las mujeres premenopáusicas (Pae et al., 2009).

Las mujeres comprenden el 60% de las personas con trastorno de ansiedad generalizada y son más propensas a desarrollar trastornos psiquiátricos

comórbidos, tienen un peor pronóstico y un deterioro más evidente en comparación con sus homólogos varones (Cover et al., 2014). Los estudios epidemiológicos sugieren que las mujeres pueden tener un mayor riesgo de desarrollar trastornos de ansiedad o exacerbación de sus síntomas actuales, durante diferentes fases de su vida reproductiva, como la pubertad, la menstruación, el embarazo, el posparto y la menopausia. Estos períodos de riesgo elevado coinciden con tiempos de fluctuaciones hormonales drásticas, lo que sugiere un papel de las hormonas gonadales en el inicio, mantenimiento y persistencia de los trastornos de ansiedad en las mujeres. (Maeng y Milad 2015).

Los estrógenos son las principales hormonas sexuales femeninas, debido a su implicación en los aspectos femeninos de la reproducción y otras conductas asociadas; son producidos por los ovarios y la glándula suprarrenal. Los cuatro estrógenos primarios son estrona, estradiol ( $E_2$ ), estriol y estetrol. El  $E_2$  es un esteroide neuroactivo potente (Melcangi et., 2016) y el más abundante en mujeres no embarazadas (Cover et al., 2014). La actividad de  $E_2$  sobre el SNC produce efectos ansiolíticos y antidepresivos asociados a la neurogénesis, sinaptogénesis, supervivencia neuronal y regulación del tono serotoninérgico, entre otros, mediante la activación de sus receptores nucleares y membranales (Melcangi et. al, 2016; Konkraks et al. 2015; Walf y Frye 2006).

En mujeres, el tratamiento con  $E_2$  combinado con ISRS disminuye los síntomas de la depresión con mayor eficiencia que la terapia con ISRS sola. El  $E_2$  modula la transmisión serotoninérgica, regulando la expresión de distintos receptores de serotonina, principalmente el  $5TH_{1A}$  (Borrow y Cameron, 2014). En el hipocampo, área cerebral relevante en la etiología de la depresión y el trastorno de ansiedad, el  $E_2$  aumenta la plasticidad sináptica (Spencer et al. 2008), mejorando el desempeño en pruebas de memoria y aprendizaje en mujeres, en periodos específicos del ciclo hormonal, caracterizados por un incremento en la concentración de  $E_2$ , como la fase folicular (Kokras et al., 2015).

Los estudios en roedores han mostrado que el estradiol facilita la extinción del miedo, tanto en la tarea de evitación pasiva como en la prueba de laberinto elevado

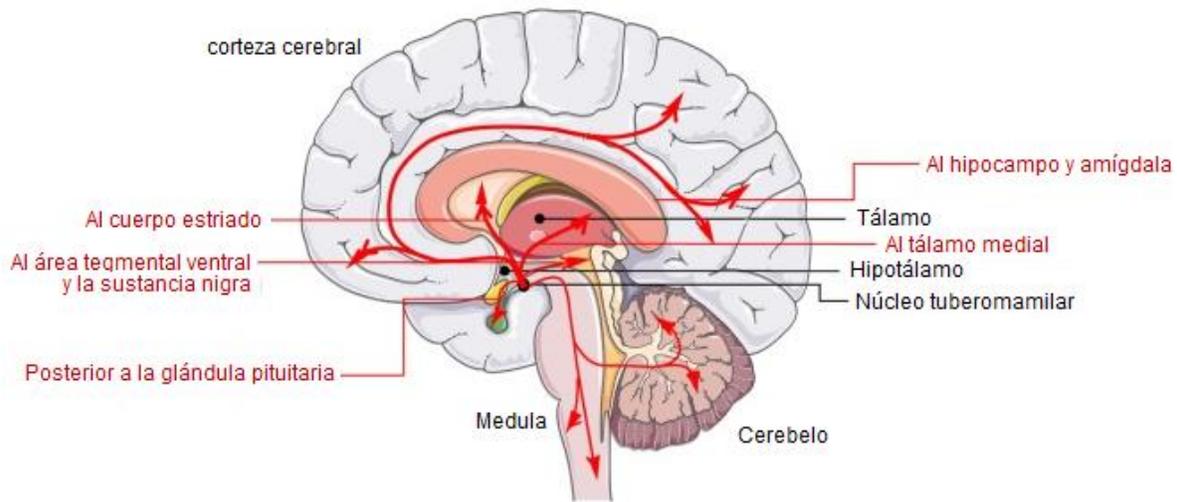
en cruz y en las tareas condicionadas de aversión al gusto (Cover et al., 2014). La administración por vía subcutánea de 0.1 mg/kg de E<sub>2</sub> a ratones hembra ovariectomizados (OVX) aumentó el tiempo de permanencia en el espacio central del campo abierto, el tiempo en el brazo abierto del laberinto elevado en cruz, el tiempo en el cuadrante abierto del laberinto cero y la interacción social; es necesaria la presencia de ER $\beta$  para obtener dichos resultados (Walf et al., 2008). En la amígdala la activación del receptor a estrógenos ER $\alpha$  disminuye las conductas tipo ansiedad ante estímulos novedosos en roedores (Spiteri et al., 2010). En la prueba de nado forzado se ha reportado que los roedores hembra que son tratados con E<sub>2</sub> presentan un menor tiempo de inmovilidad con respecto a sus controles, por lo que el E<sub>2</sub> se considera un compuesto con potencial antidepressivo por sí mismo (Kokras et al., 2015).

#### **4. Histamina**

La histamina es una amina biogénica de amplia distribución en el organismo que actúa como mediador local en el intestino, la piel y el sistema inmunitario y como neurotransmisor en el sistema nervioso (Zimmermann et al., 2011). En el SNC los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas están confinados en un área del hipotálamo posterior, denominada núcleo tuberomamilar (TM), ubicado, entre los cuerpos mamilares y el quiasma óptico (figura 3) (Haas y Panula, 2003).

Las neuronas del TM envían proyecciones divergentes a muchas áreas diferentes del cerebro, con una superposición considerable y sin un patrón topográfico (Sadek et al., 2016). Las neuronas histaminérgicas pueden incluso enviar colaterales axónicas descendentes y ascendentes. Se han identificado dos vías histaminérgicas: ascendente y descendente. La vía ascendente proyecta a la superficie ventral del cerebro, proporcionando inervación al hipotálamo, la banda diagonal, el septum y los bulbos olfatorios. Además, esta vía abandona el TM dorsalmente, siguiendo el lado lateral del tercer ventrículo para inervar el tálamo, el hipocampo, la amígdala y estructuras del cerebro anterior (Brown et al., 2001). La vía descendente inerva el tallo cerebral, el cerebelo y la médula espinal. La vía

descendente recibe una menor cantidad de proyecciones que la vía ascendente (Sadek et al., 2016).

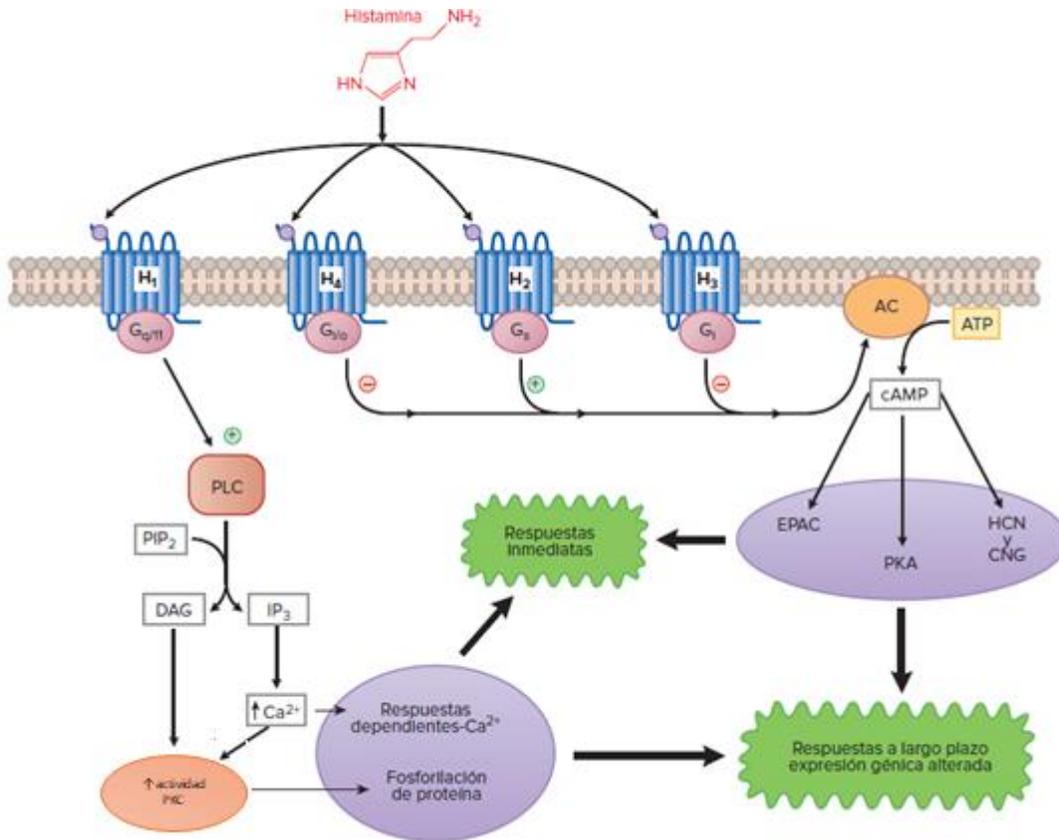


**Figura 3. El sistema histaminérgico en el cerebro humano.** El esquema muestra origen y proyecciones de terminales nerviosas histaminérgicas (Modificado de Sadek et al., 2016).

La histamina juega un papel clave como neurotransmisor en la regulación de funciones básicas del organismo, incluidas el ciclo de sueño-vigilia, el balance metabólico, la homeostasis endocrina, la plasticidad sináptica y el aprendizaje (Haas y Panula, 2003). También produce cambios fisiológicos complejos en el resto del organismo como: inflamación, contracción del músculo liso, dilatación de los capilares, quimiotaxis, producción de citocinas y secreción de ácido gástrico. Estos efectos biológicos se producen a través de cuatro subtipos de receptores acoplados a proteínas G: el receptor H<sub>1</sub>, el receptor H<sub>2</sub>, el receptor H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R) y el receptor H<sub>4</sub> (figura 4) (Panula et al., 2015).

#### 4.1 Receptores a Histamina

Todos los receptores a histamina tienen actividad constitutiva, que se define como la capacidad de desencadenar señalización intracelular incluso en ausencia de la unión de un agonista (Simons, 2004).



**Figura 4. Vías de transducción de las señales de los receptores de histamina.** Los receptores  $H_1$  activan el recambio de fosfatidilinositol a través de proteínas  $G_{q/11}$ . Los otros subtipos de receptores se acoplan positivamente (receptor  $H_2$ ) o negativamente (receptor  $H_3$  y  $H_4$ ) a la actividad adenilato ciclasa a través de proteínas  $G_s$  y  $G_{i/o}$ , respectivamente (Modificado de Brunton et al., 2019).

Los receptores  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$  se expresan de forma prominente en el cerebro en compartimentos celulares específicos (Haas y Panula, 2003). El receptor  $H_1$  se expresa ampliamente en el hipotálamo y otras regiones límbicas. Se encuentra principalmente en la postsinapsis y está acoplado a la fosfolipasa C, que produce 1,2-diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato, lo que lleva a la activación de la proteína quinasa C (Panula et al, 2015). El receptor  $H_2$  se expresa en el hipocampo, la amígdala y los ganglios basales. En la mayoría de los tejidos donde se expresa el receptor  $H_2$ , se acopla a la proteína  $G_s$  y aumenta la producción de AMPc mediada por la estimulación de la adenilato ciclasa (Monczor y Fernandez, 2016), pero también se puede acoplar a la proteína  $G_{q/11}$ , lo que da como resultado la formación

de fosfato de inositol y aumenta la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  (Panula 2015). Los H<sub>3</sub>R se concentran principalmente en tálamo, corteza prefrontal, hipotálamo e hipocampo (Soliani et al., 2020). Se localizan de forma predominante en la presinapsis y están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (figura 4). Estos receptores median la inhibición presináptica de la liberación de histamina y de otros neurotransmisores (Brown et al., 2001).

#### 4.1.1 Receptor H<sub>3</sub>

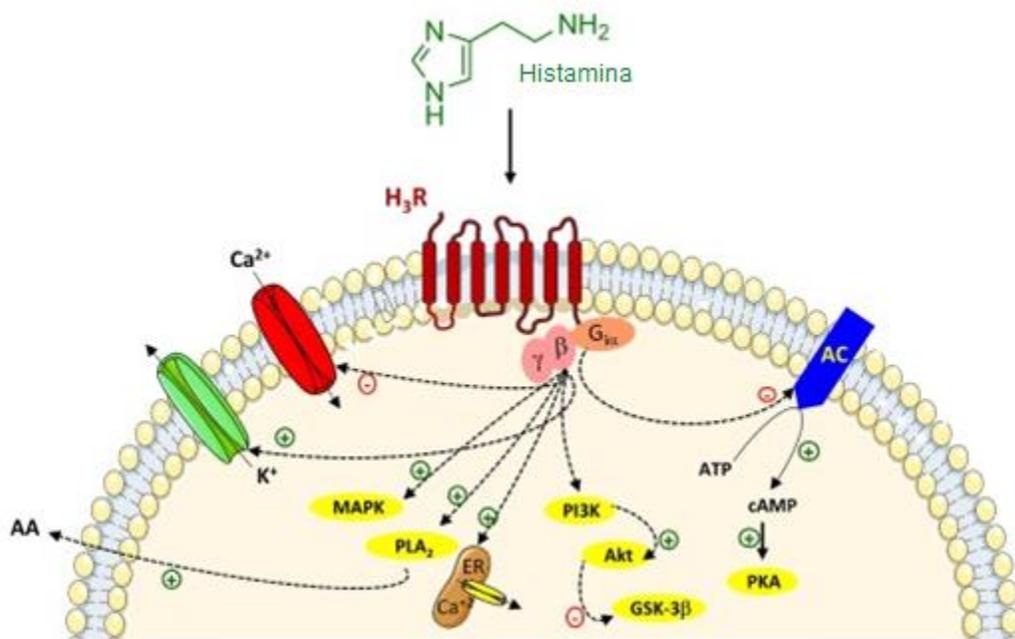
El H<sub>3</sub>R fue descubierto en 1983 y actualmente se han reportado 20 isoformas funcionales de este receptor en humanos (Bongers et al., 2007), que muestran una farmacodinamia heterogénea (Sadek et al., 2016).

Además de las isoformas funcionales, se han identificado también algunas isoformas no funcionales. Las isoformas no funcionales consisten en un receptor truncado que comprende solo una parte de una isoforma de longitud completa. Las isoformas no funcionales carecen de parte proximal del receptor, el dominio amino terminal hasta el segundo dominio transmembranal o está truncada la región C-terminal. El ARNm de las isoformas no funcionales se expresa casi en la misma proporción que el de las funcionales en cerebro de rata, y son capaces de dimerizar con las isoformas funcionales. Se ha reportado que también pueden dimerizar con receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Ellenbroek y Ghiabi, 2014). Este fenómeno podría afectar negativamente la expresión de los H<sub>3</sub>R funcionales en la superficie celular (Bongers et al., 2007).

Aunque los H<sub>3</sub>R existen en la periferia tienen una expresión predominante y heterogénea en el SNC. En ratón la expresión de H<sub>3</sub>R, se concentra en el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo, la corteza prefrontal, los ganglios basales y varios sistemas de proyección aminérgica, como es el caso de las neuronas noradrenérgicas del *locus cerúleo* (Panula et al., 2015). En humanos, el H<sub>3</sub>R se encuentran expresado en ganglios basales, cerebelo, tálamo, complejo amigdalino, hipocampo, sustancia negra, corteza frontal, hipotálamo y cuerpo calloso (Soliani et al., 2020). La localización clásica de H<sub>3</sub>R es en la presinapsis, sin embargo, dentro

de los ganglios basales, y especialmente dentro del estriado dorsal y ventral, la gran mayoría de los H<sub>3</sub>R se ubican postsinápticamente (Ellenbroek y Ghiabi, 2014).

La principal función asociada a los H<sub>3</sub>R, ubicados en las terminales del axón y en el soma de las neuronas histaminérgicas (Brown et al., 2001), es regular la síntesis y liberación de histamina. Además, existe evidencia de su capacidad para modular la liberación de serotonina, noradrenalina, dopamina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato y acetilcolina actuando como heterorreceptor en las terminales presinápticas (Haas et al., 2008).



**Figura 5. Vías de señalización de H<sub>3</sub>R** (modificado de Sadek et al., 2016).

El H<sub>3</sub>R a través de la subunidad α de la proteína G<sub>i/o</sub>, que está acoplada negativamente a la adenilato ciclasa (figura 5), reduce el calcio intracelular por la inhibición de los canales de calcio de tipo N y P en las neuronas. La subunidad β de la proteína G del H<sub>3</sub>R, genera interacciones complejas con otros receptores acoplados a proteínas G, activando otras vías de señalización, incluida la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la Akt /PKB, glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3β) y la fosfolipasa A2 (PLA2) (figura 5), que están involucradas en la plasticidad neuronal (Sadek 2016).

El H<sub>3</sub>R se ha relacionado con la modulación del ciclo sueño/vigilia, con la ansiedad y con la discriminación sensorial (Rizk et al., 2004). También se ha relacionado con las conductas de ingesta y enfermedades neuro-inflamatorias (Haas et al., 2008).

Debido a su ubicación y función, el H<sub>3</sub>R se considera un objetivo farmacológico potencial para tratar trastornos relacionados con la neurodegeneración del SNC (Panula et al., 2015; Haas et al., 2008) como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad y la esquizofrenia (Sadek 2016). Además, los antagonistas de H<sub>3</sub>R han demostrado un efecto anticonvulsivo y una contribución positiva al tratamiento de la adicción a las drogas (Soliani et al., 2020). En conjunto, los fármacos que tienen como blanco terapéutico al H<sub>3</sub>R han mostrado aplicaciones potenciales en trastornos neuropsiquiátricos (Wijtmans et al., 2007).

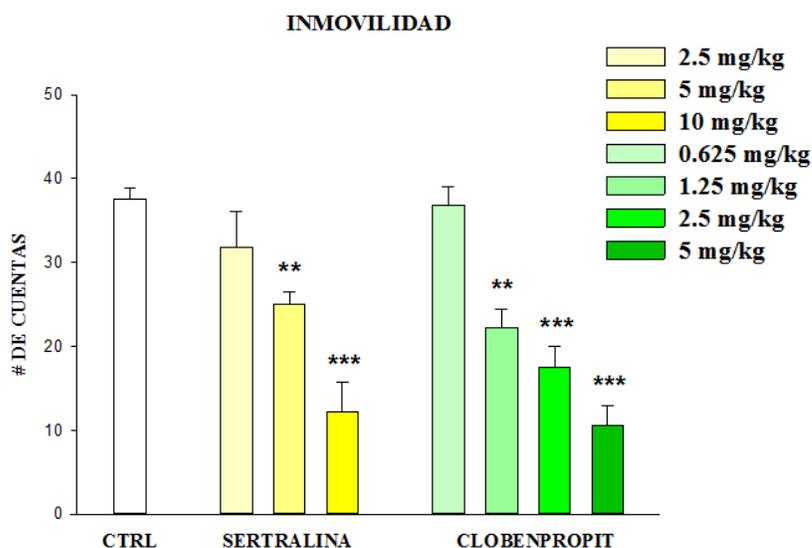
Los receptores H<sub>3</sub>R existen en equilibrio entre sus conformaciones inactivas y activas. La cantidad de receptores en conformación activa y la eficacia con la que se unen a la proteína G determinan el nivel de actividad constitutiva del receptor. Los agonistas inversos de estos receptores son agentes que estabilizan el estado inactivo del receptor, inhibiendo así la actividad constitutiva (Sadek et al., 2016). Se ha reportado que los agonistas inversos del H<sub>3</sub>R mejoran la atención y la memoria generando efectos pro cognitivos, (Soliani et al., 2020; Femenía et al., 2015; Panula et al. 2015) y tienen potencial como antidepresivos (Macha-Gutiérrez 2017; Femenía et al., 2015; Pérez-García et al., 1999). Sus efectos sobre la conducta tipo ansiedad son contradictorios (Soliani et al., 2020; Eissa et al., 2018; Femenía et al., 2015; Bahi et al., 2014), probablemente ocasionado por las distintas metodologías empleadas. Todos los estudios conductuales con agonistas inversos del H<sub>3</sub>R reportados se han realizado en roedores machos.

#### **4.1.1.1 Clobenpropit**

El clobenpropit es un agonista inverso del H<sub>3</sub>R (pK<sub>i</sub> = 9.5), que disminuye la actividad intrínseca del receptor y, por lo tanto, aumenta la liberación del neurotransmisor de las terminales sinápticas que lo expresan (Panula et al. 2015). Pertenece al grupo de los imidazoles; estructuralmente es un éster

imidotiocarbámico que consiste en una isotiolurea que contiene los sustituyentes S-3-(imidazol4-il) ´propilo y N-4-clorobencilo.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha reportado que clobenpropit funciona como antidepresivo en la prueba de nado forzado, disminuyendo la conducta de inmovilidad, en ratones macho adolescentes; este efecto fue comparable al de sertralina, un antidepresivo ISRS (Macha-Gutiérrez 2017) (figura 6).



**Figura 6. Efecto de clobenpropit sobre la conducta de inmovilidad en ratones adolescentes macho en el modelo de nado forzado.** Tanto el clobenpropit como la sertralina disminuyen la conducta de inmovilidad con respecto al control (tomado de Mancha-Gutiérrez 2017).

Clobenpropit tiene efectos tipo ansiolítico modestos; revierte la conducta tipo ansiedad en ratas macho “Flinders sensitive Line” (una variante de Sprague-Dawley susceptible al estrés) en las pruebas de supresión de alimentación en ambiente novedoso, interacción social y caja luz/obscuridad, a la dosis de 5 mg/kg (Femenía et al., 2015) y no altera la conducta tipo ansiedad en la prueba de evitación discriminativa en el laberinto elevado en cruz, una prueba modificada del LEC que incluye elementos disuasorios en uno de los brazos cerrados (Soliani et al., 2020).

## 4.2 Histamina y hormonas ováricas

El sistema histaminérgico está ligado a la función reproductiva. La histamina estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas en las neuronas

GT1-1, que son las neuronas productoras de esta hormona, de manera sostenida, reversible y dependiente de la dosis (Noris et al., 1995). Además, el 79% de las neuronas del TM expresan ER $\alpha$  en su núcleo (Bruneau et al., 2014) y la tasa de recambio de histamina en el hipotálamo aumenta con la administración exógena de E<sub>2</sub> (Gotoh et al., 2009).

El tamoxifen, antagonista de receptores nucleares a estrógenos, inhibe la liberación de histamina y serotonina en los mastocitos, que son las principales células del sistema inmune secretoras de histamina a nivel periférico (Vliagoftis et al., 1992). Así mismo, el tamoxifen y otros de sus derivados, antagonizan las acciones proliferativas de histamina en cultivos celulares de tumores cancerígenos de seno y lecho cervical, a través de su interacción alostérica con los receptores nucleares a estrógenos (Brandes et al., 1987). El clobenpropit puede estimular hasta en un 70% la actividad de la enzima citocromo P450 11A1, enzima que cataliza la conversión del colesterol en pregnenolona, compuesto de partida para la síntesis de todos los esteroides gonadales (Mast et al., 2013).

Existe una mayor unión de la histamina a sus receptores en ratas hembra que en machos, un efecto que está relacionado con el E<sub>2</sub> (Ghi et al., 1991). En distintos núcleos hipotalámicos la expresión de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> está influenciada por la presencia de hormonas ováricas (Mori et al., 2014). En la periferia, la expresión de los receptores H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub> es mayor en los ganglios vagales de ratas hembra adultas en comparación con machos de la misma edad y se requiere la presencia de hormonas ováricas para mantener la alta expresión (Li et al., 2015).

## **Justificación**

El uso de agonistas inversos del H<sub>3</sub>R representa una alternativa para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de los trastornos de ansiedad y depresión. Hasta el momento se ha descrito su potencial antidepressivo en ratones macho, sin embargo, dado que la mayor prevalencia de trastornos del estado de ánimo se presenta en la población femenina y debido a la evidencia de que las hormonas sexuales, principalmente E<sub>2</sub>, modulan algunos aspectos de la actividad del sistema

histaminérgico, es necesario determinar la influencia de E<sub>2</sub> en los efectos antidepresivos y ansiolíticos de un agonista inverso H<sub>3</sub>R como clobenpropit.

### **Hipótesis**

- Clobenpropit tendrá efectos ansiolíticos y antidepresivos en ratones adultos macho y hembra.
- El 17β estradiol facilitará el efecto ansiolítico y antidepresivo de clobenpropit en ratones hembra.

### **Objetivos**

#### **Objetivos generales**

1. Comparar los efectos tipo antidepresivo y tipo ansiolítico de clobenpropit (agonista inverso de H<sub>3</sub>R) en ratones adultos macho, hembra intactas y hembras ovariectomizadas
2. Determinar la influencia de 17-β estradiol en el efecto tipo antidepresivo y tipo ansiolítico de clobenpropit en ratones hembra ovariectomizados.

#### **Objetivos particulares**

1. Determinar los efectos de clobenpropit en ratones macho adultos en modelos de ansiedad y depresión.
2. Determinar los efectos de clobenpropit en ratones hembra adultas intactas en modelos de ansiedad y depresión.
3. Establecer los efectos de clobenpropit en ratones hembra adultas ovariectomizadas en modelos de ansiedad y depresión
4. Evaluar el efecto de diferentes dosis de 17-β estradiol, simulando niveles fisiológicos de dos de las condiciones del ciclo estral, en las acciones ansiolíticas y antidepresivas de clobenpropit en ratones adultos hembra ovariectomizados.

## **Materiales y métodos**

### **1. Animales**

Se usaron ratones adultos de 3 meses de edad de la cepa Swiss-Webster. Los animales fueron alojados en grupos de 10 animales, en jaulas de acrílico transparente (24 × 13.5 × 12.5 cm). Los animales se aclimataron en el bioterio por 2 semanas previo al inicio de las intervenciones quirúrgicas y hasta la realización de las pruebas conductuales. Se mantuvieron en condiciones de luz/oscuridad 12:12 en ciclo invertido, la luz se encendió a las 21:00 hrs, con agua y comida *ad libitum*. Todos los animales se manipularon de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y siguiendo el protocolo 379-02 aprobado por el CICUAL.

### **2. Fármacos**

Clobenpropit, N'- [(4-clorofenil)metil] -1- [3-(3H-imidazol -4il) propilsulfanil] formamidina, obtenido de Alomene labs (CAS N. 145231-35-2) (Santacruz, CDMX, Mexico), fue solubilizado en solución salina al 0.9% para su empleo. Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, Toluca, México) solubilizado en etanol que para facilitar su disolución en solución salina 0.9%; el etanol representa el 8% de la solución final. 17-β estradiol (Sigma-Aldrich, Toluca, México) solubilizado en aceite de maíz. Tribromoetanol y clobenpropit se administraron vía intraperitoneal (i.p.), 17-β estradiol se administró vía subcutánea (s.c.).

### **3. Técnica de ovariectomía**

Para la cirugía se empleó como anestésico tribromoetanol en solución al 2%, a una dosis de 15 mg /kg vía i.p. Una vez establecida la fase III de anestesia, se colocó al sujeto experimental en decúbito dorsal y se eliminó el pelaje del área ventral. Se realizó una incisión de forma horizontal, con una longitud de 3 mm y se separó el tejido conectivo para cortar la pared muscular, en el mismo sentido del primer corte, con una longitud de 3 mm. Usando unas pinzas de punta fina se procedió a la búsqueda de los oviductos dentro de la cavidad abdominal y se expusieron los oviductos junto con los ovarios. Se ligaron los oviductos de forma conjunta desde la

base y se cortaron por arriba de la ligadura para evitar el sangrado. Los ovarios junto con los oviductos fueron retirados y se reintrodujo el tejido de la matriz; procediendo a suturar primero el músculo con punto de cruz y subsecuentemente la piel en punto sencillo. La sangre superficial se retiró con algodón humedecido con alcohol/benzidamida. Posterior a la cirugía se monitoreó la condición del animal, poniendo especial atención al estado de la sutura en la búsqueda de abultamientos o abscesos. Una vez transcurridas 2 semanas de recuperación, los animales pasaron a las pruebas conductuales.

#### **4. Actividad locomotora**

El objetivo de usar la prueba de actividad locomotora es determinar que los ratones no tengan impedimentos motores por las manipulaciones previas a las pruebas conductuales. Se permitió deambular al ratón por 5 min en una caja de acrílico con las paredes opacas y piso dividido en 12 cuadros de 11x11 cm. En este caso se contabilizó el número de cuadros que el ratón cruzó en dicho tiempo, tomando como cruce cuando el animal coloca 3/4 partes de su cuerpo en un cuadro y no regresa al cuadro inmediato anterior. Además, se registró el número de veces que se realizó la conducta exploratoria vertical: la acción del ratón de erguirse, con o sin apoyo de las paredes, colocando su peso únicamente en sus extremidades posteriores (Rivadeneira-Domínguez et al., 2009). Las variables medidas en esta prueba permiten estimar la acción estimulante o depresora de los fármacos a nivel del SNC al generar un aumento y disminución, respectivamente, de la conducta motora horizontal y vertical espontánea de los roedores (Saini et al. 2016).

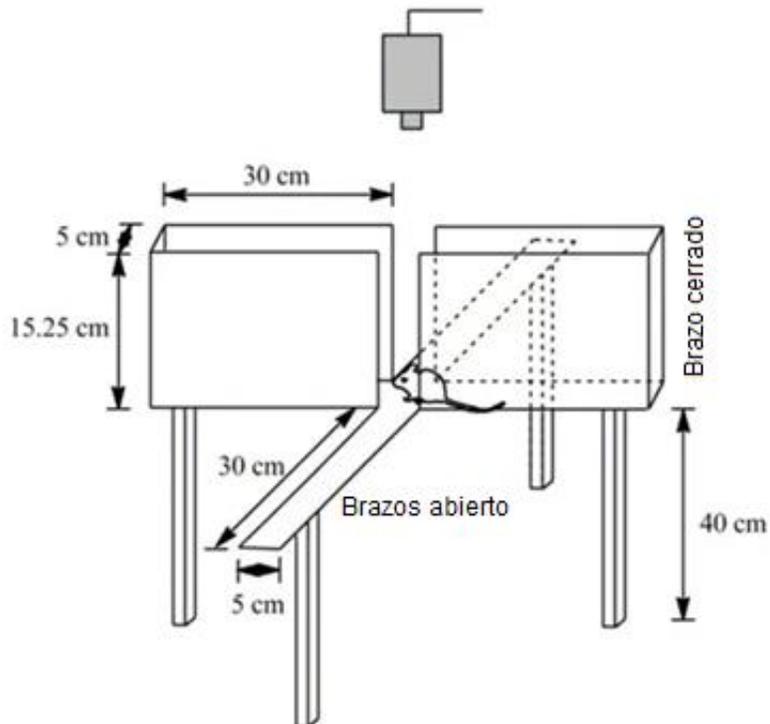
#### **5. Enterramiento defensivo**

El modelo de enterramiento defensivo se basa en el comportamiento natural que presentan los roedores de desplazar el material de la cama con movimientos alternativos de empuje y arroje hacia adelante con sus patas delanteras y la cabeza dirigidos a fuentes aversivas (De Boer y Koolhaas, 2003; Treit, 1981). Para esta prueba se empleó una caja de acrílico transparente de 24 x 13.5 x 12.5 cm, las mismas dimensiones que las de las cajas hogar. La caja experimental contiene un electrodo de 7 cm de largo que emerge de una de sus paredes, a 2 cm por encima

del material de la cama que consiste en aserrín fino. Al contacto con el electrodo el ratón recibió una descarga eléctrica de 0.3 mA. Cada sujeto experimental fue introducido de forma individual, su comportamiento se registró durante 10 minutos. Una vez que el animal recibió el primer choque, se midió el tiempo que el animal demoró en empezar a presentar la conducta de enterramiento defensivo, denominado latencia del enterramiento y que nos indica la reactividad de los ratones ante el estímulo aversivo. Un aumento en el parámetro nos indica efectos sedativos de los fármacos administrados por lo que descarta falsos positivos si este se ve acompañado de la reducción en el tiempo total de enterramiento (De Boer y Koolhaas, 2003). También, se midió el tiempo total de enterramiento, la disminución en este tiempo indica una menor conducta tipo ansiedad (Fernández-Guasti et al., 1999).

## **6. Laberinto elevado en cruz**

El LEC es un ensayo de comportamiento ampliamente utilizado para roedores y ha sido validado para evaluar los efectos ansiolíticos o ansiogénicos de los agentes farmacológicos y las hormonas esteroides. La prueba se basa en la propensión de los roedores a permanecer en espacios oscuros y cerrados y el miedo incondicionado a las alturas y espacios abiertos. Al ratón se le permite explorar una arena en forma de cruz que presenta dos brazos abiertos de 30 cm de largo y 5 cm de ancho sin paredes y dos brazos cerrados, con paredes de 15.25 cm de alto. El laberinto está unido a un soporte de modo que se eleva a 40 cm de la superficie en la que se ubica (Figura 7) (Zhang et al 2012; Walf y Frye 2007; Lister, 1987).



**Figura 7. Diagrama del laberinto elevado en cruz..** El diagrama muestra las dimensiones del laberinto empleadas para el estudio la conducta tipo ansiedad en ratones (Modificado de Zhang et al, 2012).

El ratón fue colocado en el centro del laberinto mirando en dirección a un brazo abierto y se le permitió deambular libremente por 5 min. Se contabilizó el número de entradas y tiempo de permanencia en cada tipo de brazo (abierto / cerrado) y el número de veces que el roedor realizó asomadas al vacío, tomando como una asomada al vacío cuando el ratón se aproximó a los bordes del brazo abierto dejando su cabeza por fuera de la plataforma y mirando hacia abajo del brazo abierto. El aumento de la actividad (número de entradas y asomadas al vacío) y tiempo de permanencia en los brazos abiertos refleja una disminución en la conducta tipo ansiedad (Walf y Frye, 2007). En conjunto el total de entradas indistintamente del tipo de brazo, cruces totales, se empleó como un indicativo de actividad motriz general en la arena (Zhang et al 2012).

## **7. Nado forzado**

La prueba de nado forzado comúnmente empleada para la detección de fármacos con potencial antidepressivo se basa en la inducción de una conducta tipo desesperanza, al forzar a nadar al roedor dentro de un cilindro sin posibilidad de escapatoria. Posterior a un intento inicialmente frenético de escapar, los ratones asumen una postura de flotación descrita como conducta de inmovilidad, realizando los movimientos mínimos necesarios para mantener su cabeza sobre la superficie del agua. La administración de fármacos antidepressivos ocasiona la disminución de la conducta de inmovilidad a costa del aumento de conductas activas. Las conductas activas son el nado, caracterizado por movimientos activos favoreciendo el desplazamiento dentro del cilindro y el escalamiento, descrito como movimientos vigorosos de las extremidades delanteras contra las paredes del cilindro (Xu et al, 2012; Porsolt et al. 1977).

La prueba se realizó colocando al ratón dentro de un cilindro transparente de 13 cm de diámetro y 24 cm de altura, que contiene agua a 24 °C, a una profundidad de 10 cm, durante 6 min. La prueba se videograbó al igual que el resto de las pruebas conductuales y el análisis de la conducta se realizó en los últimos 4 min de la prueba, en periodos de 5 segundos, identificando la conducta predominante (Macha-Gutiérrez 2017). Se registro como la frecuencia de expresión de la conducta inmovilidad y de conductas activas (nado y escalamiento) teniendo un total de cuarenta y ocho observaciones en cada registro.

## **8. Diseño experimental**

### **8.1. Comparación del efecto tipo antidepressivo y ansiolítico de clobenpropit.**

Se emplearon ratones de 14 semanas edad machos, hembras intactas y hembras que fueron ovariectomizadas (OVX) a las 12 semanas de edad. Se formaron cuatro grupos experimentales de cada tipo de sujeto experimental (n=16-20). Al grupo denominado control se le administró solución salina al 0.9% 5 mL/kg, i.p. y a los otros tres grupos clobenpropit, a las dosis de 1.25, 2.5 y 5 mg/kg i.p. En el caso

particular de las hembras OVX se formó un grupo experimental adicional al que se le administró una dosis de 0.625 mg/kg i.p. de clobenpropit. En todos los casos las administraciones se realizaron 30 min antes de las pruebas conductuales.

Para las pruebas conductuales cada grupo experimental fue dividido en dos subgrupos (n=8-10). Un subgrupo fue evaluado en la prueba de actividad locomotora y subsecuentemente en la prueba de enterramiento defensivo. El segundo subgrupo, fue evaluado en la prueba de LEC y posteriormente en la prueba de nado forzado. Todas las pruebas conductuales fueron videograbadas para su posterior análisis.

### **8.2. Determinación del efecto de diferentes dosis fisiológicas de 17- $\beta$ estradiol en las acciones ansiolíticas y antidepresivas de clobenpropit.**

Se emplearon ratones hembra de 14 semanas de edad, ovariectomizadas a las 12 semanas de edad. Se formaron dos grupos experimentales, al primero se le administró una dosis total de 3  $\mu$ g de 17- $\beta$  estradiol ( $E_2$ ), dosis que produce concentraciones semejantes a las obtenidas en la fase proestro (Walf et al., 2008) del ciclo estral y corresponde al pico máximo de concentración de  $E_2$ . Al segundo grupo experimental se le administró una dosis total 1  $\mu$ g de  $E_2$ , que produce concentraciones hormonales que asemejan una fase de diestro en los roedores. La administración de  $E_2$  se realizó vía s.c.

Pasadas 48 horas de la administración de  $E_2$  (3  $\mu$ g o 1  $\mu$ g), se formaron cuatro grupos experimentales (n=16); a tres de ellos se les administró clobenpropit a las dosis de 1.25, 2.5 y 5 mg/kg. Al grupo restante denominado control, se le administró el vehículo de clobenpropit (5 mL/kg). Clobenpropit y su vehículo se administraron 30 min previos a la realización de las pruebas conductuales.

Las pruebas conductuales se realizaron de la misma forma que el experimento 1. Cada grupo experimental fue dividido en 2 subgrupos teniendo mínimo 8 sujetos experimentales en cada subgrupo. Cada subgrupo fue evaluado en 2 pruebas conductuales, el primero en la prueba de actividad locomotora y después en enterramiento defensivo. El segundo en la prueba de LEC y posteriormente en la

prueba de nado forzado. Todas las pruebas fueron videograbadas para su posterior análisis.

## **9. Análisis estadístico**

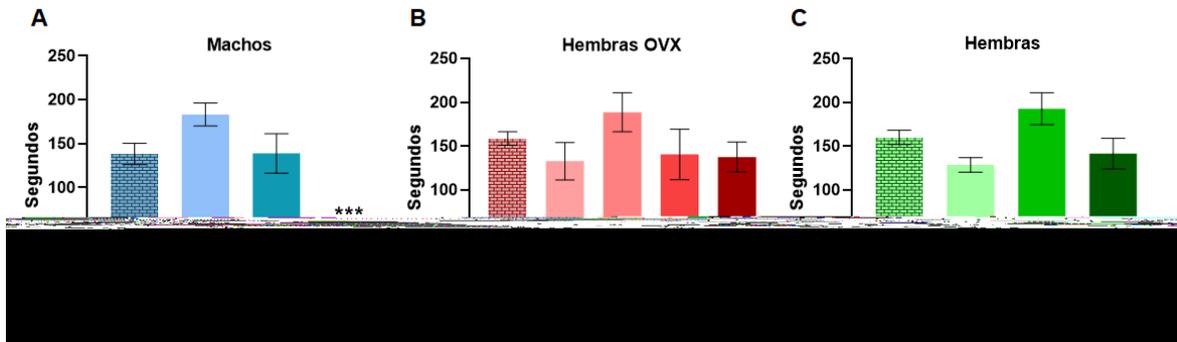
El análisis estadístico para las pruebas de actividad locomotora, enterramiento defensivo y nado forzado se llevó a cabo mediante un ANOVA de una vía y como prueba post-hoc, la prueba de Dunnett; en todos los casos se comparó contra el control. Para la prueba del LEC, dado que las variables no presentaron una distribución normal, el análisis se realizó con el ANOVA para datos no paramétricos Kruskal-Wallis y el análisis post-hoc se realizó mediante la prueba de Dunn; en todos los casos se comparó contra el control. Se consideró como significativa una  $p \leq 0.05$ . En todos los casos el análisis se realizó con el Software Sigma plot 12. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar en forma de gráficos de barra realizados con el programa GraphPad Prism 8 o tablas con los mismos datos.

## **Resultados**

### **1. Efecto de la administración de clobenpropit en ratones macho, ratones hembra intactas y hembra OVX en las conductas tipo ansiedad y depresión**

#### **1.1. Efecto de clobenpropit en el modelo de enterramiento defensivo**

La figura 8 muestra los resultados del tiempo total de enterramiento en la prueba de enterramiento defensivo. Únicamente los machos tratados con la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit redujeron el tiempo dedicado al enterramiento (figura 8 A) indicando un efecto tipo ansiolítico de clobenpropit. Las hembras intactas y las OVX no fueron afectadas por clobenpropit en este parámetro (figura 8 B y C). Los resultados del ANOVA de una vía fueron: ratones macho  $F_{(3,32)} = 12.657$   $P < 0.001$ ; hembras OVX  $F_{(4,39)} = 1.251$   $P = 0.308$ ; hembras intactas  $F_{(3,31)} = 2.241$   $P = 0.112$ .



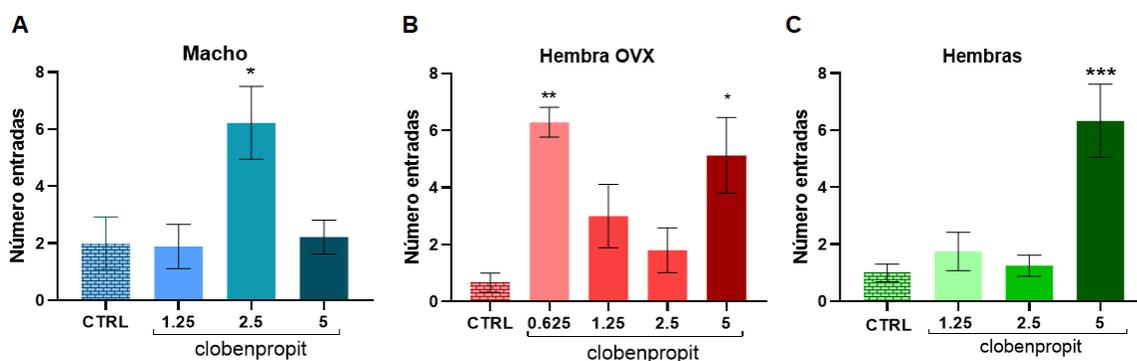
**Figura 8. Efecto de clobenpropit en el tiempo total de enterramiento en la prueba de enterramiento defensivo.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). OVX = ovariectomizadas; CTRL = grupo control. \*\*\* $p<0.001$  Prueba de Dunnett vs CTRL.

En la figura 9 se presentan los resultados de la latencia de enterramiento en la prueba de enterramiento defensivo. En los machos la dosis de 1.25 mg/kg de clobenpropit disminuye la latencia de enterramiento, lo que indica que clobenpropit mejoró su reactividad ante el estímulo aversivo con respecto al grupo control (figura 9 A). Por otra parte, la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit en las hembras OVX, aumentó este parámetro indicando posibles efectos sedantes del fármaco (figura 9 B). Por último, el clobenpropit no produjo cambios en la latencia de enterramiento en las hembras intactas (figura 9 C). Los resultado del ANOVA de una vía fueron: ratones macho  $F_{(3,32)}=15.207$   $P= 0.002$ ; hembras OVX  $F_{(4,39)}=13.118$   $P= 0.011$ ; hembras intactas  $F_{(3,31)}= 2.56$   $P= 0.464$ .

**Figura 9. Efecto de la administración de clobenpropit en la latencia al enterramiento en prueba de enterramiento defensivo.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). OVX = ovariectomizadas; CTRL = grupo control. \* $p<0.05$  prueba de Dunnett vs CTRL

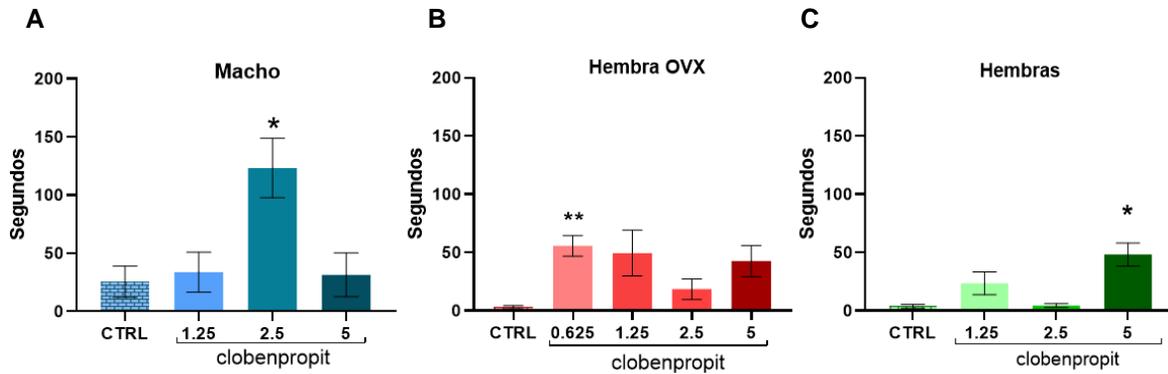
## 1.2. Efecto de clobenpropit en el laberinto elevado en cruz

En la figura 10 se muestra el efecto de clobenpropit en el número de entradas a brazos abiertos en los tres grupos estudiados (machos, hembras intactas y hembras OVX). En este caso se observó un aumento en el número de entradas a brazos abiertos en los machos a la dosis de 2.5 mg/kg de clobenpropit (figura 10 A); en hembras OVX en las dosis de 0.625 y 5 mg/kg de clobenpropit (figura 10 B) y en hembras intactas a la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit (figura 10 C). Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis fueron: ratones macho  $H_{(3)}= 10.305$   $P=0.016$ ; hembras OVX  $H_{(4)}=15.34$   $P=0.004$ ; hembras intactas  $H_{(3)}=12.37$   $P=0.006$ .



**Figura 10. Efecto del clobenpropit en el número de entradas a brazos abiertos en laberinto en forma de cruz.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). OVX = ovariectomizadas; CTRL = grupo control. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  prueba de Dunn vs CTRL.

En la figura 11 se muestra el efecto de clobenpropit en el tiempo total en brazos abiertos en la prueba del LEC. Se puede observar un aumento en el tiempo total en los brazos abiertos en machos a la dosis de 2.5 mg/kg de clobenpropit (figura 11 A); en hembras OVX a la dosis de 0.625 mg/kg de clobenpropit (figura 11 B) y en hembras intactas a la dosis de 5 mg/kg (figura 11 C). Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis fueron: ratones macho  $H_{(3)}= 12.967$   $P=0.005$ ; hembras OVX  $H_{(4)}= 13.75$   $P=0.0083$ ; hembras intactas  $H_{(3)}= 10.6$   $P=0.014$ .

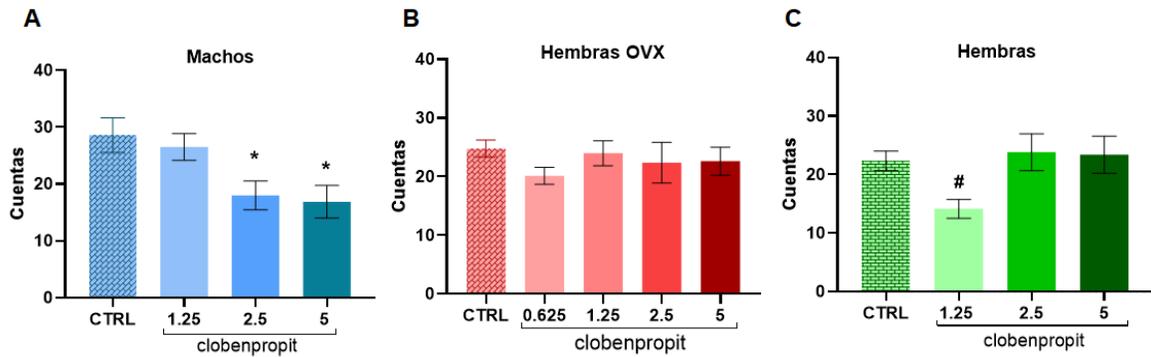


**Figura 11. Efecto de clobenpropit en el tiempo total en brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). OVX = ovariectomizadas; CTRL = grupo control. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  prueba de Dunn vs CTRL.

Sobre el número de asomadas al vacío, los datos no mostraron cambios entre los tratamientos y tipos de sujetos experimentales, por lo tanto, no se presentan. El aumento en el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en esa área del LEC, indica una reducción de las conductas tipo ansiedad (Walf y Frye, 2007). La dosis de clobenpropit con efectos tipo ansiolítico varía entre los tipos de sujetos evaluados.

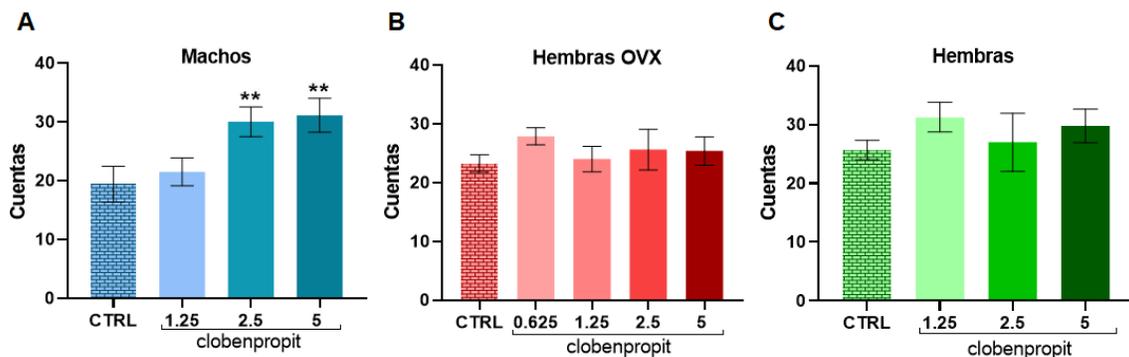
### 1.3. Efecto de clobenpropit en la prueba de nado forzado

En la figura 12 se observa el efecto de clobenpropit en la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado. La administración de clobenpropit indujo un efecto tipo antidepressivo al disminuir la conducta de inmovilidad en los machos a las dosis de 2.5 mg/kg y 5 mg/kg (figura 12 A). En las hembras OVX clobenpropit no generó efectos en la conducta de inmovilidad (figura 12B). En el caso de las hembras intactas, clobenpropit sólo produjo una tendencia a disminuir la conducta de inmovilidad a la dosis de 1.25 mg/kg (figura 12 C). Los resultados del ANOVA de una vía fueron: ratones macho  $F_{(3,31)}= 4.785$   $P=0.008$ ; hembras OVX  $F_{(4,38)}= 0.540$   $P=0.708$ ; hembras intactas  $F_{(3,23)}=3.977$   $P=0.023$ .



**Figura 12 Efecto de la administración de clobenpropit en la prueba de nado forzado, conducta de inmovilidad.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). OVX = ovariectomizadas; CTRL = grupo control \* $p<0.05$ , # $p= 0.054$  prueba de Dunnett vs CTRL.

La figura 13 muestra el efecto de clobenpropit en las conductas activas en la prueba de nado forzado. En este caso, clobenpropit a las dosis de 2.5 y 5 mg/kg incrementó las conductas activas en los machos (figura 13 A), mientras que en las hembras intactas y OVX no se observaron efectos significativos (figura 13 B y C). Los resultados del ANOVA de una vía fueron: ratones macho  $F_{(3,31)}=4.785$   $P=0.008$ ; hembras OVX  $F_{(4,38)}= 0.540$   $P=0.708$ ; hembras intactas  $F_{(3,23)}=0.661$   $p= 0.586$ .



**Figura 13 Efecto de la administración de clobenpropit en las conductas activas en la prueba de nado forzado.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). OVX = ovariectomizadas; CTRL = grupo control \*\* $p<0.01$  prueba de Dunnett vs CTRL

#### 1.4. Efecto de clobenpropit en las evaluaciones motrices

La evaluación de la actividad locomotora, mostró que la administración de clobenpropit en las dosis empleadas no produjo cambios significativos en la actividad motora de los ratones con respecto a sus controles ( $p > 0.05$ , tabla 2). En la prueba de actividad locomotora no se observaron efectos por la administración de clobenpropit en las dos variables evaluadas número de cuadros cruzados y conducta vertical. El número de cruces totales en la prueba de LEC es un indicativo del desplazamiento general de los ratones en el paradigma: las hembras intactas a la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit aumentaron este parámetro con respecto al control (tabla 2).

Tabla 2. *Evaluación de la motricidad en la prueba de actividad locomotora y laberinto elevado en cruz de ratones macho, hembras ovariectomizadas y hembras intactas.*

Grupo	Tratamiento		Actividad locomotora		L. elevado Cruz
			Cuadros cruzados	Conducta vertical	Cruces totales
Machos	S. salina 0.9%	CTRL	131 ± 9.481	41.82 ± 3.763	10.5 ± 1.052
	Clobenpropit (mg / kg)	1.25	157 ± 12.2	47.5 ± 4.717	9.111 ± 1.486
		2.5	156 ± 10.12	61.14 ± 4.166	12.78 ± 1.839
		5	103.6 ± 13.53	40.5 ± 3.021	13.22 ± 1.412
	Análisis estadístico ANOVA post hoc Dunnett n=8		F <sub>(3,37)</sub> =3.985 P=0.016 CTRL vs todos NS	F <sub>(3,37)</sub> =3.985 P=0.016 CTRL vs todos NS	F <sub>(4, 36)</sub> =2.229 P=0.0852
Hembras ovariectomizadas	S. salina 0.9%	CTRL	131 ± 9.481	44.8 ± 3.913	9.833 ± 1.376
	Clobenpropit (mg / kg)	0.625	100.4 ± 12.58	41.33 ± 3.913	13.71 ± 1.267
		1.25	165 ± 10.6	49.25 ± 4.008	13.78 ± 1.362
		2.5	141.8 ± 15.05	37.00 ± 2.952	10.30 ± 1.116
		5	105.3 ± 9.973	38.13 ± 5.058	13.44 ± 1.303
Análisis estadístico ANOVA post hoc Dunnett n=8		F <sub>(4, 35)</sub> =5.093 P=0.0024 CTRL vs todos NS	F <sub>(4, 35)</sub> =1.181 P=0.3362 CTRL vs todos NS	F <sub>(4, 36)</sub> =2.229 P=0.0852 NS	
Hembras Intactas	S. salina 0.9%	CTRL	137.3 ± 13.52	47.86 ± 3.439	9.333 ± 1.726
	Clobenpropit (mg / kg)	1.25	129.6 ± 11.99	43.33 ± 3.169	10.13 ± 1.302
		2.5	148.9 ± 6.631	46.71 ± 2.317	9.426 ± 0.7825
		5	144.6 ± 10.3	50 ± 3.878	<b>15.67 ± 1.52**</b>
	Análisis estadístico ANOVA n=8		F <sub>(3, 23)</sub> = 0.5365 P=0.6619	F <sub>(3, 24)</sub> = 0.6736 P=0.5766	F <sub>(3, 23)</sub> = 4.688 P=0.0107

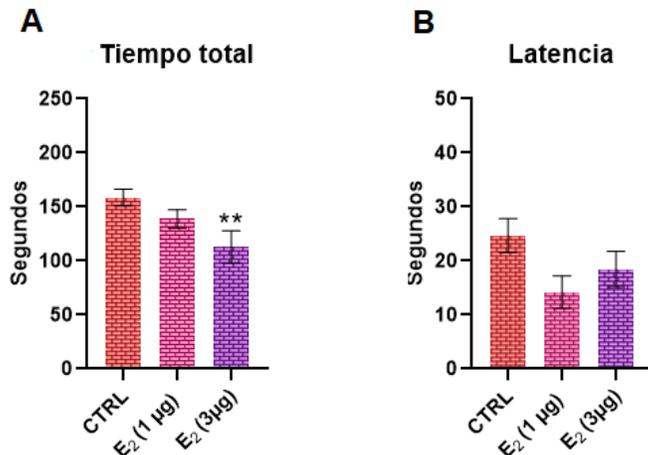
\*\* $p < 0.01$ . prueba de Dunn vs CTRL

## 2. Efecto de la administración de E<sub>2</sub> en hembras OVX en modelos de ansiedad y depresión

Dado que la concentración circulante de E<sub>2</sub> tiene influencia sobre las conductas tipo ansiedad y depresión (Walf & Frye 2006), en el presente trabajo se analizaron los efectos de la administración de E<sub>2</sub> solo y en combinación con clobenpropit. En esta sección se muestran los efectos de E<sub>2</sub> en las pruebas de enterramiento defensivo, del LEC y nado forzado en ratones hembra OVX.

### 2.1. Efecto de E<sub>2</sub> en el modelo de enterramiento defensivo.

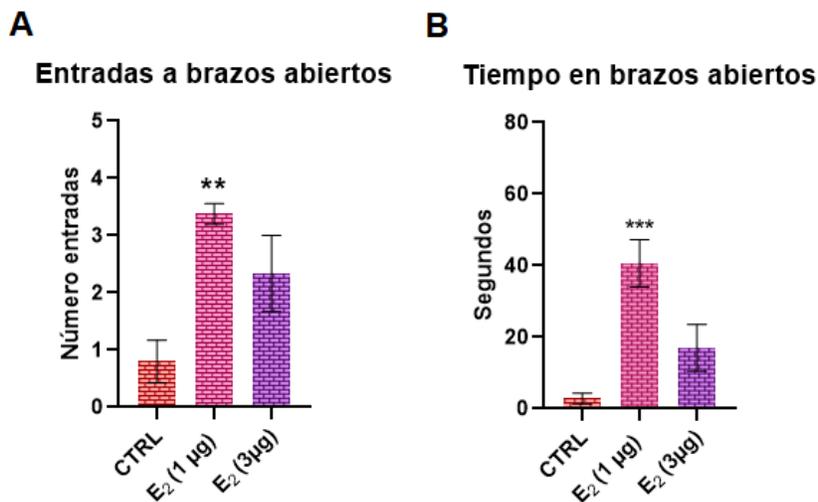
Los resultados de la administración de E<sub>2</sub> en la prueba de enterramiento defensivo se observan en la figura 14. La administración de 3 µg de E<sub>2</sub> generó efectos tipo ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo al reducir el tiempo total de enterramiento (figura 14 A), sin modificar la latencia al enterramiento (figura 14 B). Los resultados del ANOVA de una vía fueron para tiempo total de enterramiento  $F_{(2,22)}= 5.894$   $p=0.010$  y para Latencia al enterramiento  $F_{(2,22)}= 2.848$   $p=0.086$ .



**Figura 14. Efectos de E<sub>2</sub> en el modelo de enterramiento defensivo.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n= 8-10$  por grupo). CTRL = grupo control **A.** Tiempo total de enterramiento en segundos **B.** Latencia al enterramiento en segundos. \*\* $p<0.01$  prueba de Dunnett vs CTRL.

## 2.2. Efecto de la administración de E<sub>2</sub> en la prueba de laberinto elevado en cruz.

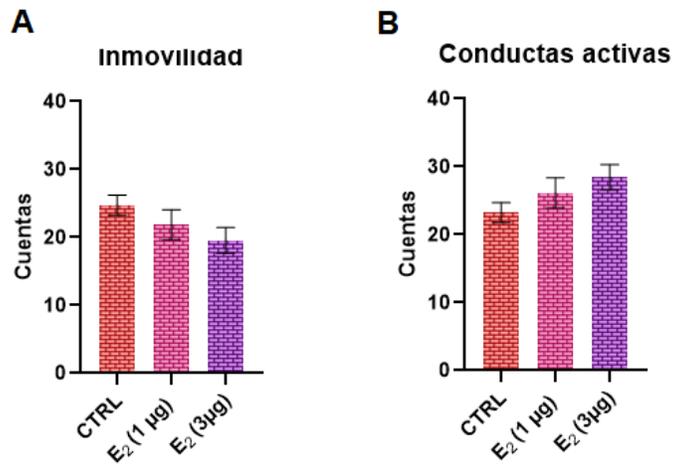
En la figura 15 se muestran los resultados de la administración de E<sub>2</sub> en la prueba del LEC. La administración de 1 µg de E<sub>2</sub> generó efectos tipo ansiolítico al aumentar el número de entradas a brazos abiertos (figura 15 A) y tiempo en brazos abiertos (figura 15 B). La dosis de 3 µg de E<sub>2</sub> también aumentó los parámetros evaluados, sin embargo, esto fue menor a la dosis de 1 µg de E<sub>2</sub>; debido a la mayor dispersión de los datos este resultado no fue estadísticamente significativo. Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis fueron:  $H_{(2)}=8.832$   $P=0.002$  para número de entradas a brazos abiertos y  $H_{(2)}=13.46$   $P=0.002$  para el tiempo total en brazos abiertos.



**Figura 15. Efecto de E<sub>2</sub> en prueba de laberinto elevado en cruz.** La figura muestra la media ± E.E. (n= 8-10 por grupo). CTRL = grupo control **A.** Número de entradas a brazos abiertos **B.** Tiempo total en brazos abiertos. \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.01 prueba de Dunn vs CTRL

## 2.3. Efecto de E<sub>2</sub> en la prueba de nado forzado.

Los resultados de la prueba de nado forzado en la figura 16 nos muestran que las dosis de E<sub>2</sub> empleadas producen una tendencia a disminuir la conducta de inmovilidad aumentando las conductas activas, sin embargo, no se alcanza significancia estadística. Los resultados del ANOVA fueron:  $F_{(2,23)}=2.054$   $P=0.153$  para la conducta de inmovilidad y  $F_{(2,23)}=2.054$   $P=0.153$  para las conductas activas.



**Figura 16. Efecto de E<sub>2</sub> en la prueba de nado forzado.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. (n= 8-10 por grupo). CTRL = grupo control **A.** Conducta de Inmovilidad. **B.** Conductas activas.

#### 2.4. Efectos de la administración de E<sub>2</sub> en las evaluaciones motoras.

Sobre los efectos motrices ocasionados por la administración de E<sub>2</sub> (tabla 3), los parámetros evaluados por la prueba de actividad locomotora y el número de cruces totales en la prueba del LEC indican que no existen alteraciones en la motricidad de los ratones hembra OVX por la administración de E<sub>2</sub>.

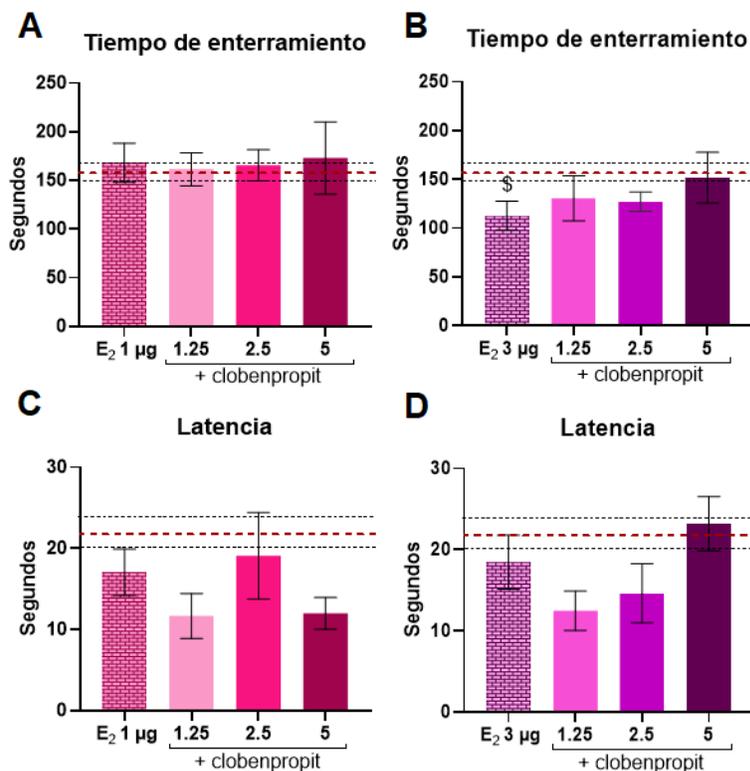
Tabla 3. *Evaluación de la motricidad en la prueba de actividad locomotora y laberinto elevado en cruz de ratones hembra ovariectomizadas con administración de E<sub>2</sub>*

Tratamiento	Actividad locomotora		L. elevado Cruz
	Cuadros cruzados	Conducta vertical	Cruces totales
Ctrl	131 $\pm$ 9.481	44.80 $\pm$ 3.021	10.67 $\pm$ 0.8028
E <sub>2</sub> (1 µg)	123 $\pm$ 17.71	48.88 $\pm$ 6.189	13.50 $\pm$ 1.15
E <sub>2</sub> (3 µg)	123 $\pm$ 15.84	46.71 $\pm$ 5.702	11.33 $\pm$ 1.563
ANOVA de una vía	F <sub>(2, 21)</sub> = 0.1058 P=0.9001	F <sub>(2, 22)</sub> = 0.1875 P=0.8303	F <sub>(2, 17)</sub> = 1.598 P=0.2312

### **3. Efecto de la administración de clobenpropit en combinación con E<sub>2</sub> en ratones hembra OVX en modelos de ansiedad y depresión**

#### **3.1. Efecto de la combinación de E<sub>2</sub> y clobenpropit en el modelo de enterramiento defensivo**

En la figura 17 se muestran los efectos de clobenpropit en ratones hembra OVX pretratados con E<sub>2</sub> (1 o 3 µg). Clobenpropit en combinación con E<sub>2</sub> no produjo efectos tipo ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo al no alterar el tiempo total de enterramiento (figura 17 A y B). Con respecto a la latencia al enterramiento se observó una tendencia a aumentar la reactividad de los sujetos con las dosis bajas de clobenpropit (figura 17 D) al disminuir la latencia al enterramiento, sin embargo, este efecto no resultó estadísticamente significativo. Los resultados del ANOVA fueron:  $F_{(3,28)}=0.374$   $p= 0.772$  para tiempo total de enterramiento en hembras OVX con 1 µg de E<sub>2</sub>;  $F_{(3,29)}=0.253$   $p= 0.858$  para tiempo total de enterramiento en hembras OVX con 3 µg de E<sub>2</sub>;  $F_{(3,28)}=1.176$   $p= 0.337$  para latencia de enterramiento en hembras OVX con 1 µg de E<sub>2</sub> y  $F_{(3,29)}=2.217$   $p= 0.11$  para latencia al enterramiento de hembras OVX con 3 µg E<sub>2</sub>.

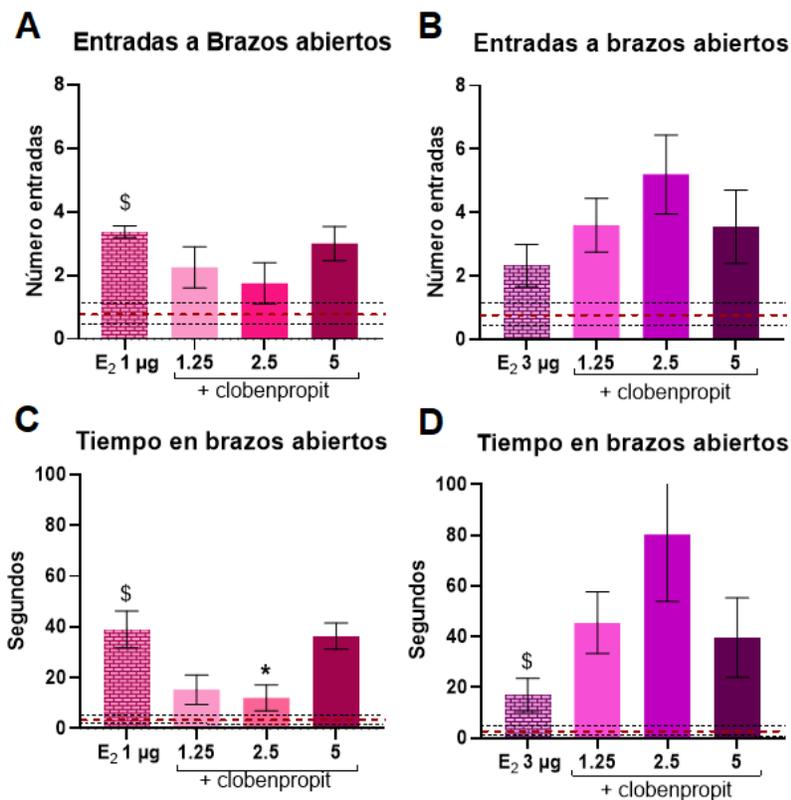


**Figura 17 Efecto de la combinación de clobenpropit con E<sub>2</sub> en la prueba de Laberinto elevado en cruz.** la figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n=6-8$  por grupo). Las líneas horizontales discontinuas en las gráficas indican los valores de ratones hembra OVX sin la administración de E<sub>2</sub>. **A.** Tiempo total de enterramiento en hembras OVX con 1  $\mu$ g de E<sub>2</sub>. **B.** Tiempo total de enterramiento en hembras OVX con 3  $\mu$ g de E<sub>2</sub>. **C.** Latencia de enterramiento en hembras OVX con 1  $\mu$ g de E<sub>2</sub>. **D.** Latencia al enterramiento de hembras OVX con 3  $\mu$ g E<sub>2</sub>.  $\$p<0.05$  T-Student vs hembras OVX sin tratamiento (líneas discontinuas).

### 3.2. Efecto de la combinación de E<sub>2</sub> y clobenpropit en el modelo de laberinto elevado en cruz

La figura 18 muestra los efectos de clobenpropit en combinación con E<sub>2</sub> en el LEC. En este caso, clobenpropit revirtió los efectos tipo ansiolítico de 1  $\mu$ g de E<sub>2</sub> disminuyendo el número de entradas a brazos abiertos y el tiempo en brazos abiertos (figura 18 A y C). También en la figura 18 C se observa que la dosis de 2.5 mg/kg de clobenpropit redujo el tiempo en brazos abiertos hasta los valores control de hembras OVX sin la administración de E<sub>2</sub> (líneas discontinuas). La administración de clobenpropit en las hembras tratadas con 3  $\mu$ g de E<sub>2</sub> muestra una tendencia a

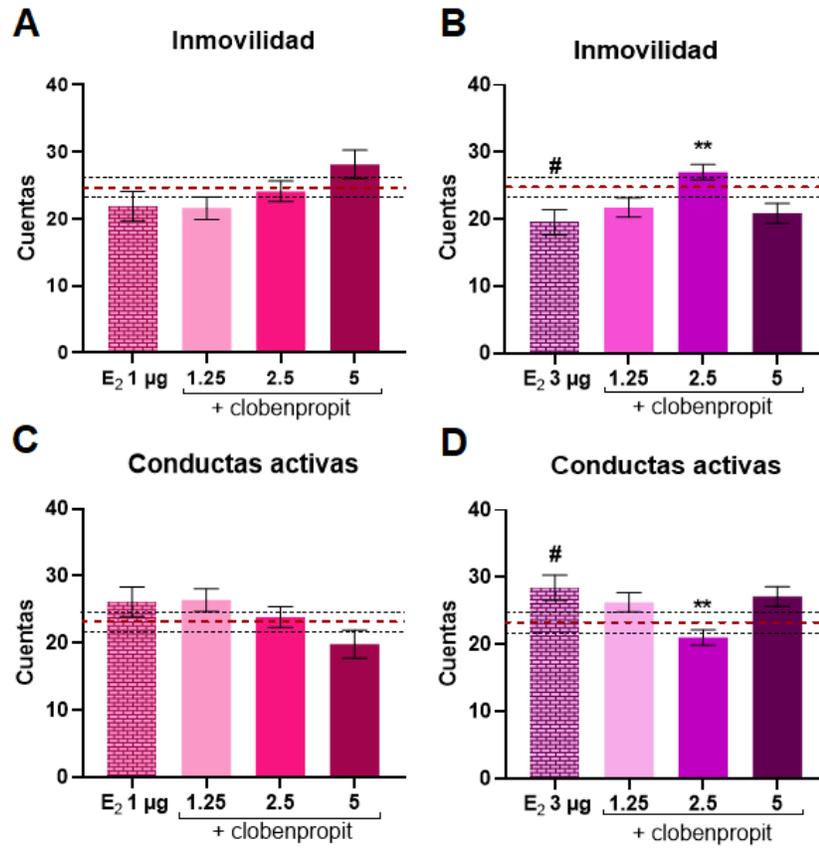
aumentar el número de entradas en brazos abiertos (figura 18 B) y el tiempo de permanencia en los mismos (figura 18 D). Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis fueron:  $H_{(3)}=0.267$   $P=0.848$  para el número de entradas a brazos abiertos en hembras OVX con  $1 \mu\text{g}$  de  $E_2$ ;  $H_{(3)}=0.714$   $P=0.511$  para el número de entradas a brazos abiertos en hembras OVX con  $3 \mu\text{g}$  de  $E_2$ ;  $H_{(3)}=11.715$   $P=0.008$  para tiempo total en brazos abiertos hembras OVX con  $1 \mu\text{g}$  de  $E_2$  y  $H_{(3)}=2.89$   $P=0.409$  para tiempo total en brazos abiertos en hembras OVX con  $3 \mu\text{g}$  de  $E_2$ .



**Figura 18. Efecto de la combinación de clobenpropit con  $E_2$  en la prueba de Laberinto elevado en cruz.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n=6-8$  por grupo). Las líneas horizontales discontinuas en las gráficas indican los valores de ratones hembra OVX sin la administración de  $E_2$ . **A.** Número de entradas a brazos abiertos en hembras OVX con  $1 \mu\text{g}$  de  $E_2$ . **B.** Número de entradas a brazos abiertos en hembras OVX con  $3 \mu\text{g}$  de  $E_2$ . **C.** Tiempo total en brazos abiertos hembras OVX con  $1 \mu\text{g}$  de  $E_2$ . **D.** Tiempo total en brazos abiertos en hembras OVX con  $3 \mu\text{g}$  de  $E_2$ . \* $p<0.05$  prueba Dunn's vs  $E_2$ , \$ $p<0.01$  U de Mann-Whitney vs Hembras OVX sin tratamiento (líneas discontinuas).

### **3.3. Efecto de la combinación de E<sub>2</sub> y clobenpropit en el modelo de nado forzado**

Los efectos de la combinación de E<sub>2</sub> con clobenpropit en hembras OVX en la prueba de nado forzado se muestran en la figura 19. La tendencia de E<sub>2</sub> (3 µg) a generar efectos tipo antidepresivo (p=0.0501) en la prueba de nado forzado fue bloqueada por la administración de clobenpropit (figura 19 B y D). Por otra parte, en los sujetos administrados con 3 µg de E<sub>2</sub>, la dosis de 2.5 mg/kg de clobenpropit aumenta la conducta de inmovilidad en comparación con su control (E<sub>2</sub> 3 µg), restableciendo los valores basales de hembras OVX que no fueron pretratadas con E<sub>2</sub> (figura 19 B). En las hembras con 1 µg de E<sub>2</sub> la administración de clobenpropit, contrario a lo esperado, muestra una tendencia aumentar la conducta de inmovilidad conforme la dosis de clobenpropit aumenta (figura 19 A). Los resultados del ANOVA de una vía fueron:  $F_{(3,32)}=2.468$   $P= 0.082$  para la conducta de inmovilidad en ratones OVX con 1 µg de E<sub>2</sub>;  $F_{(3,35)} =5.411$   $P= 0.004$  para la conducta de inmovilidad en ratones OVX con 3 µg de E<sub>2</sub>;  $F_{(3,32)}=2.468$   $P= 0.082$  para las conductas activas en los ratones OVX con 1 µg de E<sub>2</sub> y  $F_{(3,35)}=5.411$   $P= 0.004$  para las conductas activas en ratones OVX con 3µg de E<sub>2</sub>  $F_{(3,35)}=5.411$   $P= 0.004$ .



**Figura 19. Efecto de la combinación de clobenpropit con E<sub>2</sub> en la prueba de nado forzado.** La figura muestra la media  $\pm$  E.E. ( $n=6-8$  por grupo). Las líneas horizontales discontinuas en las gráficas indican los valores de ratones hembra OVX sin la administración de E<sub>2</sub> **A.** conducta de inmovilidad en ratones OVX con 1 µg de E<sub>2</sub> **B.** Conducta de inmovilidad en ratones OVX con 3 µg de E<sub>2</sub> **C.** Conductas activas en los ratones OVX con 1 µg de E<sub>2</sub> **D.** Conductas activas en ratones OVX con 3 µg de E<sub>2</sub>. \*\* $p < 0.01$  prueba de Dunnett vs E<sub>2</sub> 3 µg #  $p = 0.0501$  T-Student vs hembras OVX sin tratamiento (líneas discontinuas).

### 3.4. Efecto de la administración de E<sub>2</sub> y clobenpropit en las evaluaciones motoras

La administración de clobenpropit en los ratones hembra pretratados con E<sub>2</sub> no provocó cambios en la motricidad. Esto fue evidente al no generar cambios en los parámetros de la prueba de actividad locomotora, número de cuadros cruzados y conducta vertical, al igual que no produjo cambios en el número de cruces totales en el LEC (Tabla 4).

Tabla 4. *Evaluación de la motricidad en la prueba de actividad locomotora y laberinto elevado en cruz de ratones hembra ovariectomizadas con administración de E<sub>2</sub> y clobenpropit.*

Grupo	Tratamiento		Actividad locomotora		L. elevado Cruz
			Cuadros cruzados	Conducta vertical	Cruces totales
E <sub>2</sub> 1 µg	S. salina 0.9%	CTRL	123 ± 17.71	48.88 ± 6.189	13.50 ± 1.15
	Clobenpropit (mg/kg)	1.25	107.4 ± 9.215	40.89 ± 4.168	13.25 ± 0.6748
		2.5	129.6 ± 11.74	48.57 ± 4.292	12.25 ± 1.278
		5	98.86 ± 6.745	38.57 ± 3.0551	12.71 ± 1.19
	ANOVA de una vía n=8		F <sub>(3, 27)</sub> = 1.241 P=0.3141	F <sub>(3, 27)</sub> = 1.205 P=0.3269	F <sub>(3, 27)</sub> = 0.2675 P=0.8482
E <sub>2</sub> 3µg	S. salina 0.9%	CTRL	123 ± 15.84	46.71 ± 5.702	11.33 ± 1.563
	Clobenpropit (mg/kg)	1.25	103.2 ± 2.725	37.29 ± 2.296	11.6 ± 1.013
		2.5	121.1 ± 13.25	43.38 ± 3.474	11.8 ± 1.241
		5	112.4 ± 15.95	40.5 ± 5.237	12.33 ± 0.7993
	ANOVA de una vía n=8		F <sub>(3, 27)</sub> = 0.3487 P=0.7903	F <sub>(3, 28)</sub> = 0.6870 P=0.5675	F <sub>(3, 26)</sub> = 0.1525 P=0.9272

## Discusión

### 1. Motricidad de los sujetos experimentales

La evaluación de los efectos de clobenpropit en los modelos de ansiedad y depresión dependen de la capacidad de los sujetos experimentales de desplazarse y moverse con normalidad. Para verificar su condición en este aspecto, realizamos la evaluación de la actividad locomotora y el número de cruces totales en el LEC. (Saini et al. 2016).

Las distintas manipulaciones realizadas en nuestros sujetos experimentales como la administración de hormonas, la intervención quirúrgica y la administración de clobenpropit, agonista inverso de H<sub>3</sub>R, no cambiaron la motricidad general de los ratones, con excepción del grupo de hembras intactas tratadas con la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit (ver tabla 2), que tuvieron un incremento de actividad en el modelo de LEC.

Los roedores hembra, en ambientes novedosos como es el caso del LEC, muestran una mayor exploración que los sujetos masculinos. El grado de exploración de un ambiente novedoso de los roedores femeninos también ha demostrado ser susceptible a la fase del ciclo hormonal. El número de cruces totales en los sujetos femeninos con ciclos hormonales regulares, cuando están en fase estro/proestro es mayor a su contraparte masculina (Bourin, 2015). La asignación de sujetos a los grupos experimentales en el caso de las hembras intactas se realizó por aleatorización, sin considerar la fase del ciclo hormonal, por lo que es posible que el grupo administrado con la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit haya incluido una mayoría de sujetos en la fase estro/proestro, lo que podría haber favorecido un mayor número de cruces totales en este grupo experimental (Walf et al., 2009). Además, en el grupo independiente de hembras intactas en el que se realizó la evaluación de la actividad locomotora en campo abierto, ninguna de las dosis de clobenpropit produjo un aumento en la motricidad. Por ello, podríamos descartar que el incremento en la actividad locomotora en el LEC haya sido inducido por clobenpropit.

## **2. Efectos de la administración de clobenpropit en modelos de ansiedad en ratones macho, hembra intactas y ovariectomizadas**

Debido a la gran heterogeneidad de la ansiedad como patología cuando se propone un nuevo tratamiento con potencial ansiolítico, como el uso de agonistas inversos del H<sub>3</sub>R, es indispensable determinar su efectividad en distintos tipos de sujetos experimentales y condiciones de afrontamiento (Bourin, 2015; Steimer, 2011). Por ello, en la presente tesis, se decidió incluir tres tipos de sujetos experimentales: hembras intactas, hembras OVX y machos. Además, se realizaron las evaluaciones

del potencial ansiolítico de clobenpropit en dos modelos de ansiedad, el enterramiento defensivo para evaluar un afrontamiento activo y el LEC para evaluar un afrontamiento pasivo (Bourin et al., 2007).

En conjunto, los resultados obtenidos en las dos pruebas de ansiedad empleadas en este trabajo (el LEC y el enterramiento defensivo) no son similares entre sí. Esto puede deberse a que evalúan distintos tipos de afrontamiento (Treit et al., 1993) y, por lo tanto, distintos circuitos cerebrales participan en la regulación de las conductas tipo ansiedad en cada modelo. Por ejemplo, la amígdala es más relevante en el enterramiento defensivo, mientras que la participación del hipocampo es decisiva en el LEC (McHugh et al., 2004). La poca correlación entre los resultados obtenidos con los distintos modelos de ansiedad es común (Ramons, 2008), por lo que las diferencias observadas entre los modelos, enterramiento defensivo y el LEC, no está fuera de la norma.

En la prueba de enterramiento defensivo, la administración de clobenpropit solo tuvo efectos tipo ansiolítico en los ratones macho a la dosis más alta empleada (5 mg/kg). Clobenpropit no tuvo efecto en ningún grupo experimental de hembras. Se ha reportado que los roedores macho pueden ser más sensibles que las hembras a los efectos tipo ansiolítico de otros compuestos, como el diazepam, en la prueba de enterramiento defensivo (Olvera-Hernández y Fernández-Guasti, 2011). En este caso, Olvera-Hernández y Fernández-Guasti (2011) discutieron que las diferencias en los efectos de fármacos entre ambos sexos, en la prueba de enterramiento defensivo, se deben a que las hembras tienden a generar afrontamientos pasivos, como replegarse y mostrar la conducta de congelamiento. Este comportamiento disminuye el tiempo dedicado al enterramiento. Mientras que los machos responden con conductas activas como lo es la conducta de enterramiento. Es posible que esto suceda en el caso de clobenpropit en el modelo de enterramiento defensivo, donde los efectos son únicamente evidentes en los ratones macho. En trabajos futuros se tendrá que analizar más a fondo esta posibilidad.

La reactividad de los sujetos en la prueba de enterramiento defensivo se evalúa mediante la latencia al enterramiento, que es el tiempo que demora el ratón entre

recibir el primer choque eléctrico y el momento que empieza la acción de enterrar el electrodo (De Boer y Koolhaas, 2003). Los ratones macho con la dosis de 1.25 mg/kg de clobenpropit presentaron una disminución en la latencia al enterramiento, lo que indica que los sujetos son más reactivos al estímulo aversivo que produce el electrodo. Dado que histamina mejora los procesos atencionales, reduciendo el tiempo de reacción ante algunos estímulos sensoriales (Soliani et al., 2020), el aumento en la liberación de histamina, provocado por clobenpropit, podría ser la causa de la disminución de latencia de enterramiento. Sin embargo, serán necesarios estudios específicos que permitan comprobar esta teoría.

Por el contrario, las hembras OVX presentan un aumento progresivo de la latencia al enterramiento conforme aumenta la dosis de clobenpropit (figura 8 B). La disminución de la actividad constitutiva del H<sub>3</sub>R no solo aumenta la liberación de histamina, sino también de otros neurotransmisores como GABA, acetilcolina y serotonina entre otros (Haas et al., 2008). Es posible que la disminución de la reactividad en las hembras OVX se deba a un aumento en la actividad GABAérgica o de otros sistemas de neurotransmisión. Sin embargo, se tienen que realizar estudios específicos que analicen esta posibilidad.

Nuestros resultados en la prueba de LEC demuestran que cada tipo de sujeto experimental (machos, hembras intactas y hembras OVX) tiene distinta sensibilidad al potencial ansiolítico de clobenpropit. En los ratones macho, se observa un efecto tipo ansiolítico a la dosis de 2.5 mg/kg, mientras que en las hembras intactas a la dosis de 5 mg/kg y en las OVX a la dosis de 0.625 mg/kg. Se podría considerar que los ratones macho presentaron el efecto tipo ansiolítico más notable dado que la diferencia contra su control es mayor. Sin embargo, las hembras OVX presentan la mayor sensibilidad al clobenpropit al responder a la dosis más pequeña empleada.

Previo a la realización de este trabajo no existen reportes de diferencias sexuales en los efectos de agonistas inversos del H<sub>3</sub>R. Sin embargo, las mujeres presentan con mayor frecuencia patologías derivadas de una sobre-activación del sistema histaminérgico a nivel periférico, como es el caso del asma y el lupus. La incidencia de los episodios de ambas patologías se encuentra ligada a las variaciones cíclicas

de hormonas sexuales de los sujetos femeninos (Li et al., 2015). A nivel central, la histamina trasmite la sensación de comezón en la amígdala y esta actividad neuronal se registra con mayor intensidad en sujetos femeninos en comparación con los sujetos masculinos (Mueller et al., 2019). Por otra parte, se ha reportado que las ratas hembra fértiles tienen una mayor expresión de receptores de histamina en el SNC en comparación con machos de su misma edad (Ghi et al., 1991). Además, Ferretti y col. (1998) reportaron que hay una mayor tasa de liberación de histamina en las hembras adultas en comparación con los machos. Estas evidencias en conjunto nos indican que existe un dimorfismo sexual en el sistema de neurotransmisión histaminérgico que podría influir en la efectividad de clobenpropit entre nuestros grupos experimentales.

Por otra parte, algunos efectos de clobenpropit se han adjudicado a un aumento de la liberación de serotonina y catecolaminas que favorecen cambios plásticos a nivel de SNC (Mancha-Gutiérrez, 2017). Estos sistemas de neurotransmisión también reportan diferencias entre sexos en su actividad basal y en la expresión de receptores (Borrow y Cameron, 2014; Luque et al., 1992). Podemos suponer que las diferencias en la sensibilidad a clobenpropit entre machos y hembras pueden deberse al dimorfismo sexual en la neurotransmisión de estos tres sistemas de neurotransmisión (histaminérgico, serotoninérgico y catecolaminérgico) (Spoletini, et al., 2013).

Sin embargo, no podemos descartar otras posibilidades como la existencia de variaciones en el metabolismo de clobenpropit entre machos y hembras. En este caso, la tasa de biotransformación en machos es más alta que en hembras, lo que repercute en la biodisponibilidad de los fármacos como clobenpropit (Spoletini, et al., 2013). Para poder determinar con exactitud cuál es la razón para que el clobenpropit tenga distinto grado de efectividad en los sujetos macho y hembra, es necesaria la realización de estudios complementarios como estudios de biodisponibilidad y evaluar la expresión de H<sub>3</sub>R en las estructuras cerebrales relevantes en la extinción del miedo como la amígdala, corteza prefrontal e hipocampo en sujetos de ambos sexos.

Uno de los beneficios del empleo de LEC, es su sensibilidad al estado hormonal de los sujetos experimentales. El uso de LEC ha permitido determinar la influencia de distintas hormonas sexuales como E<sub>2</sub> y progesterona sobre la conducta tipo ansiedad (Walf y Frye, 2007). Nuestros resultados marcan una clara diferencia entre los ratones hembra intactos y OVX. El efecto ansiolítico en estos dos tipos de sujetos se encuentra en los extremos: mientras que la dosis efectiva de clobenpropit en las hembras OVX fue de 0.625 mg/kg, en las hembras intactas fue la más alta empleada, de 5 mg/kg. La diferencia más evidente entre ambos tipos de sujetos experimentales es la presencia de esteroides sexuales (Cover et al., 2014). Se ha reportado que estos cambios endocrinos afectan algunos tratamientos para la ansiedad, como el tratamiento con los ISRS, que pierden efectividad en pacientes con concentraciones reducidas de estrógenos (Sramek et al., 2016). También el efecto de la buspirona es sensible a las concentraciones de E<sub>2</sub>, ya que actúa a través de activar al receptor 5TH<sub>1A</sub> (Brunton et al., 2019) y el E<sub>2</sub> reduce la expresión de 5TH<sub>1A</sub> en el sistema límbico (Borrow y Cameron, 2014; Shors y Leuner, 2003).

Se ha reportado que la ovariectomía disminuye la expresión de H<sub>3</sub>R en el sistema nervioso periférico de ratas hembra (Li et al., 2015). Además, hay una disminución en la liberación de histamina a nivel central, ligada a la presencia de estrógenos (Ferretti et al., 1998). Lamentablemente se desconoce cuáles son las acciones concretas de la ovariectomía sobre la actividad y expresión de H<sub>3</sub>R en el SNC. Nuestros resultados nos hacen suponer que existe una disminución en la expresión o actividad del H<sub>3</sub>R. Sin embargo, es necesario determinar la expresión de estos receptores y su funcionalidad en ratones hembra intactas y OVX, para poder aclarar su participación en el aumento de la sensibilidad de las hembras OVX en el LEC en comparación con las hembras intactas.

En las hembras OVX, la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit aumentó el número de entrada a brazos abiertos. Sin embargo, a esta dosis no se observó un aumento en el tiempo de permanencia en brazos abiertos, por lo que el efecto ansiolítico en este caso no es claro. Walf y Frye (2007) proponen que el tiempo en brazos abiertos es el parámetro determinante de la prueba de LEC, porque es un indicador directo de

la disminución del estado tipo ansiedad sin estar influido por la predilección instintiva de los roedores a explorar los espacios novedosos, como lo es el número de entradas a brazos abiertos (Bourin, 2015). En este caso, se ha reportado que los roedores hembra tienden a explorar más los espacios novedosos que los machos (Bourin, 2015). En nuestro trabajo dado que la dosis de 5 mg/kg de clobenpropit solo aumento el número de entradas a brazos abiertos y no el tiempo en brazos abiertos se decidió considerar que este efecto no era un efecto tipo ansiolítico y que sólo está relacionado con un aumento en la motivación a explorar espacios novedosos. Sin embargo, en trabajos futuros se deberá confirmar este resultado empleado otros modelos de ansiedad como el de interacción social.

A manera de resumen nuestros resultados demuestran que existen diferencias en el efecto tipo ansiolítico de clobenpropit, de acuerdo con el sexo y estado hormonal de los sujetos experimentales. Demostrando que existe dimorfismo sexual en el funcionamiento del sistema histaminérgico. Estos resultados refuerzan la importancia de estudiar nuevos tratamientos farmacológicos para la ansiedad considerando ambos sexos y diferentes estados endocrinos.

### **3. Efectos de la administración de clobenpropit en la prueba de nado forzado en ratones macho, hembra intactas y ovariectomizadas.**

En el modelo de nado forzado, nuestros resultados muestran un efecto tipo antidepresivo de clobenpropit en ratones macho, pero no en hembras. Los resultados en machos concuerdan con lo reportado por otros investigadores, donde la administración aguda de clobenpropit reduce la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado, es decir, tiene un efecto tipo antidepresivo (Mancha-Gutiérrez 2017; Femenía et al., 2015; Pérez-García et al., 1999). Cabe señalar que los trabajos de Femenía y Pérez-García fueron realizados empleando ratas como sujetos experimentales, lo que indica que independientemente de la especie, la administración de clobenpropit produce efectos tipo antidepresivo en el sexo masculino.

En el trabajo de Mancha-Gutiérrez (2017) se usaron ratones de la misma cepa que en nuestro trabajo. En este caso observamos diferencias en la dosis mínima efectiva

entre los dos estudios. En nuestro trabajo, la dosis mínima efectiva de clobenpropit fue de 2.5 mg/kg, mientras que Mancha-Gutiérrez reporta 1.25 mg/kg como dosis mínima efectiva (Mancha-Gutiérrez, 2017). Dado que Mancha-Gutiérrez utilizó ratones adolescentes, la diferencia en la dosis efectiva podría estar ligada a las diferencias en capacidad plástica del sistema nervioso de los sujetos experimentales. Se ha reportado que la capacidad neuroplástica es más eficiente en los mamíferos adolescentes (Andersen 2003) y se considera una característica de los antidepresivos favorecer la plasticidad neuronal, además de aumentar la liberación de monoaminas en el SNC (Castrén, 2013). Por lo tanto, es posible que el aumento en la dosis mínima efectiva de clobenpropit se deba al menor grado de neuroplasticidad en los roedores macho adultos.

Respecto a nuestros resultados en hembras, las hembras OVX e intactas no mostraron cambios en el modelo de nado forzado con la administración de clobenpropit. Sin embargo, debemos señalar que las hembras intactas muestran una tendencia a disminuir la conducta de inmovilidad a la dosis 1.25 mg/kg. Es posible que este tipo de sujeto experimental sea más sensible a dosis inferiores, ya que tomando en cuenta que a nivel periférico la expresión del H<sub>3</sub>R es mayor en hembras (Li et al., 2015), este fenómeno podría replicarse en el SNC y por lo tanto las dosis más bajas de clobenpropit podrían tener efectos tipo antidepresivo en los sujetos femeninos y las dosis altas tendrían efectos inespecíficos. En trabajos futuros será necesario analizar esta posibilidad.

Por otra parte, el clobenpropit no muestra efectos en las hembras OVX en el modelo de nado forzado. Se ha reportado que la efectividad de los antidepresivos puede ser susceptible a la concentración de estrógenos circulantes (Borrow y Cameron, 2014), lo que podría modificar las acciones de clobenpropit. Como se mencionó previamente, los estrógenos regulan la expresión de los receptores de histamina en el sistema nervioso, tanto en la periferia como a nivel central (Li et al., 2015; Mori et al., 2014; Ghi et al., 1991). Por una parte, la expresión de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> en el hipocampo e hipotálamo varía de acuerdo con el ciclo estral (Mori et al., 2014), mientras que se ha reportado que el cese del ciclo hormonal disminuye la actividad

del H<sub>3</sub>R aumentando la liberación de histamina (Ferretti et. al., 1998). Por estas razones, clobenpropit podría perder su efecto antidepresivo. En este estudio, la ovariectomía anula la principal fuente de estrógenos a nivel sistémico (Cover et. al., 2014), lo que podría repercutir en la expresión del H<sub>3</sub>R, modificando la influencia de este receptor en los distintos sistemas de neurotransmisión en los que está implicado (Haas et al., 2008). Sin embargo, cabe aclarar que a la fecha no hay trabajos que analicen los efectos de la ovariectomía sobre el H<sub>3</sub>R a nivel central.

En cuanto a las conductas activas, Detke y cols. (1995) demostraron que los antidepresivos serotoninérgicos reducen la inmovilidad y aumenta la conducta de nado, mientras que los antidepresivos catecolaminérgicos reducen la inmovilidad y aumentan el escalamiento, sin afectar la natación. En nuestro trabajo no se observa una tendencia clara en las hembras intactas a incrementar en particular una sola conducta activa, por lo tanto, sólo se puede interpretar el efecto antidepresivo a través de la disminución de la conducta de inmovilidad. No obstante, esta medición no tuvo efectos estadísticamente significativos en hembras. Por lo que se concluyó que clobenpropit no tiene efectos tipo antidepresivos en hembras.

#### **4. Efectos tipo ansiolítico y antidepresivo de la administración exógena de E<sub>2</sub>, en Hembras OVX.**

Como se demostró previamente, existen diferencias en los efectos de clobenpropit entre sexos y esto podría estar relacionado con la presencia de estrógenos en los sujetos femeninos. El E<sub>2</sub> es un esteroide sexual femenino capaz de generar efectos sobre el estado de ánimo (Maeng y Milad 2015). Se ha demostrado que el E<sub>2</sub> tiene efectos tipo antidepresivo y tipo ansiolítico (Walf y Frye 2006), por ello fue necesario determinar los efectos de la administración del E<sub>2</sub> por sí mismo en los modelos utilizados en este trabajo, antes de evaluar su efecto en conjunto con clobenpropit.

Las dosis de E<sub>2</sub> empleadas en este proyecto se escogieron con el fin de obtener concentraciones sistémicas que son alcanzables naturalmente dentro de un ciclo estral. En ratones hembra OVX la administración de 1 µg de E<sub>2</sub>, simula la concentración de esta hormona en la fase metaestro/diestro y la administración de 3 µg de E<sub>2</sub>, es semejante a las fases proestro/estro (Walf et al., 2008).

En la prueba de enterramiento defensivo las hembras OVX administradas con E<sub>2</sub> (3 µg) redujeron el tiempo total de enterramiento, indicando que esta dosis tiene efectos tipo ansiolítico, sin alterar la reactividad de los sujetos al estímulo (De Boer y Koolhaas, 2003). Se ha reportado previamente que roedores con concentraciones altas de E<sub>2</sub> (proestro/estro), tienen tiempos de enterramiento menores con respecto a hembras en otras fases del ciclo (Fernández-Guasti y Picazo, 1990). También se ha demostrado que la administración exógena de E<sub>2</sub> en ratones hembra OVX en dosis comparables a la empleada en este proyecto (3 µg) producen la disminución de las conductas tipo ansiedad en otros modelos de ansiedad (Walf et al., 2009).

Sobre nuestros resultados en el LEC, el efecto tipo ansiolítico de dosis bajas de E<sub>2</sub> (1 µg) es evidente al aumentar el número de entradas y el tiempo de permanencia de los ratones en los brazos abiertos; este aumento es menos pronunciado a la dosis de 3 µg de E<sub>2</sub>. La fase de proestro, la que se pretende emular con la dosis de 3 µg de E<sub>2</sub>, favorece la exploración y permanencia en los brazos abiertos en el LEC en comparación con las otras fases del ciclo estral en roedores. Este fenómeno se debe a las altas concentraciones de progesterona y sus metabolitos que caracterizan a esta etapa (Fyre et al., 2000). Sin embargo, no es clara la influencia neta del E<sub>2</sub> en las conductas tipo ansiedad. Esta hormona tiene efectos ansiolíticos en dosis moderadas y cuando las evaluaciones se realizan 24 horas posteriores a su administración (Walf et al., 2008), mientras que dosis altas o los sistemas de liberación prolongada de E<sub>2</sub> han demostrado tener efectos ansiogénicos (Tomihara et al., 2009). La situación hormonal previa de los sujetos experimentales evaluados también puede ser un factor, ya que al ser evaluadas en los modelos nuestras hembras OVX tienen dos semanas de ovariectomía lo que puede modificar la expresión de los receptores de estrógenos y su sensibilidad, ya que ésta es dependiente de la concentración sistémica de E<sub>2</sub> (Fyre et al., 2000). Esta condición podría estar relacionada con la mayor efectividad de la dosis de 1 µg de E<sub>2</sub> en comparación con 3 µg en el LEC. En trabajos futuros deberíamos verificar esta teoría. 3

Con respecto a los efectos de E<sub>2</sub> en el modelo de nado forzado. Nuestros resultados muestran que conforme aumenta la dosis de E<sub>2</sub> en ratones hembra OVX se presenta una tendencia a la disminución de conducta de inmovilidad. En trabajos previos se ha demostrado que la administración exógena de E<sub>2</sub> disminuye la conducta de inmovilidad, sin embargo, esto se observa a dosis mayores a las empleadas en este trabajo (Kokras et al., 2015). En rata los efectos máximos de E<sub>2</sub> en dosis equivalentes se observan en las primeras 24 horas post-administración (Estrada-Camarena et al., 2003). Walf y col. (2009) reportaron efectos antidepresivos con la administración de 3 µg de E<sub>2</sub> en ratón pero las evaluaciones se realizaron en tiempos menores de 24 horas post-administración. Dado que en nuestras evaluaciones se realizaron 48 horas después de la administración de E<sub>2</sub>, es factible que ésta sea la razón por la que no se ven los efectos tipo antidepresivo.

#### **5. Efectos de clobenpropit en conjunto con E<sub>2</sub> en ratones hembra OVX en modelos de ansiedad.**

Recordando que clobenpropit por sí mismo no tuvo efectos tipo ansiolítico en el modelo de enterramiento defensivo, tanto en hembras intactas como OVX y tampoco produjo efectos en combinación con E<sub>2</sub>, podemos afirmar que la prueba de enterramiento defensivo no es sensible a este fármaco en hembras, independientemente de su condición hormonal.

Con respecto al modelo del LEC, podemos observar claramente que los efectos de la administración de clobenpropit son contradictorios. En las hembras tratadas con 1 µg de E<sub>2</sub>, la administración de clobenpropit bloquea los efectos tipo ansiolítico del E<sub>2</sub>; mientras que en los sujetos administrados con 3 µg de E<sub>2</sub>, el clobenpropit muestra una tendencia a producir efectos tipo ansiolítico al aumentar el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto. Posiblemente los efectos tipo ansiolítico de 1 µg de E<sub>2</sub> en las hembras OVX son contrarrestados por clobenpropit, mientras que los efectos moderados en los sujetos administrados con 3 µg son potenciados. De forma similar a lo observado en este trabajo, dosis bajas de histamina aumentaron y dosis altas disminuyeron los efectos tipo ansiolítico del etanol (Verma y Jain, 2016). Por lo tanto, se ha propuesto que el

sistema histaminérgico podría operar como un mecanismo compensador de las conductas tipo ansiedad (Verma y Jain, 2016), lo que supone posibles efectos bifásicos del clobenpropit como ansiolítico.

La histamina como neurotransmisor tiene efectos bifásicos en las conductas tipo ansiedad. Por ejemplo, la destrucción del núcleo tuberomamilar (único origen de neuronas histaminérgicas en el SNC) produce efectos tipo ansiolíticos en el LEC (Frisch et al., 1998). En contraposición, una dieta restringida en precursores de histamina (que agotaría el neurotransmisor de manera paulatina) favorece la aparición de conductas tipo ansiedad (Yoshikawa et al., 2014). En combinación con otras sustancias ansiolíticas como el etanol, la histamina produce efectos bifásicos sobre las conductas tipo ansiedad (Verma y Jain, 2016). El efecto bifásico de histamina es posible que sea la causa por la que vemos un efecto bifásico con la administración de clobenpropit en combinación con E<sub>2</sub> ya que el clobenpropit, por su actividad como agonista inverso, aumenta la liberación de histamina.

Ayudando la idea de que clobenpropit tiene efectos bifásicos, se ha reportado que otros agonistas inversos de H<sub>3</sub>R, generan tanto efectos tipo ansiolítico (Verma y Jain, 2016; Bahi et al., 2014) como efectos tipo ansiogénico (Mohsen et al., 2014) en la prueba del LEC. Se ha reportado que el H<sub>3</sub>R puede modular la actividad de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> postsinápticos al controlar la liberación de histamina (Chee y Menard, 2013, Yuzurihara et al., 2000). En general se considera que la activación del receptor H<sub>1</sub> media efectos ansiolíticos (Femenia et al., 2015; Chee y Menard, 2013) mientras que la del H<sub>2</sub> tiene efectos tanto ansiolíticos como ansiogénicos (Verma y Jain, 2016; Chee y Menard, 2013), lo que daría una explicación a los dos efectos de clobenpropit.

Otra posibilidad que podría explicar los efectos bifásicos de clobenpropit es a través de la participación de otros sistemas de neurotransmisión, como el sistema serotoninérgico y GABAérgico (Haas et al., 2008). En este caso, el uso de agonistas inversos del H<sub>3</sub>R aumenta la liberación de serotonina y GABA en el SNC (Sadek et al., 2016). El aumento de la actividad de ambos sistemas de neurotransmisión es el mecanismo de acción de algunos ansiolíticos clásicos como las benzodiazepinas y

los ISRS (Brunton et al., 2019). A su vez clobenpropit también aumenta la liberación de noradrenalina y acetilcolina (Haas et al., 2008) neurotransmisores que favorecen el estado tipo ansiedad (Steimer, 2011).

## **6. Los efectos de clobenpropit en conjunto con E<sub>2</sub> en el modelo de nado forzado**

La administración de clobenpropit produce un efecto tipo pro-depresivo en el modelo de nado forzado en los sujetos hembra pretratados con 1 y 3 µg de E<sub>2</sub>. Este es un efecto inesperado debido a que clobenpropit ha demostrado efectos tipo antidepresivo en esta misma prueba y en otros modelos de depresión en machos (Kumar et al., 2019; Mancha-Gutiérrez 2017; Femenía et al., 2015).

Se propone que los agonistas inversos del H<sub>3</sub>R, actúan como antidepresivos al aumentar la liberación de serotonina, dopamina, noradrenalina e histamina (Mancha-Gutiérrez 2017; Femenía et al, 2015). El aumento de la histamina favorece la liberación de arginina vasopresina y de la hormona liberadora de corticotropina, lo que a su vez induce la activación del eje HPA (Kumar et al., 2019). Se ha reportado que el incremento en la actividad del eje HPA induce conductas tipo depresión en los roedores (Konkras 2019). Los andrógenos, presentes en mayor proporción en los sujetos masculinos, modulan a la baja la actividad del eje HPA, mientras que el E<sub>2</sub> puede incrementar o disminuir la actividad del eje HPA dependiendo de la condición endocrina en sujetos femeninos (Fernández-Guasti et al., 2012). Por lo tanto, podemos sugerir que, en hembras, el incremento de la conducta tipo depresión por la administración de clobenpropit se debe a la activación del eje HPA (Konkras 2019). Sin embargo, será necesario evaluar en estudios futuros la respuesta del eje HPA tras la administración de clobenpropit tanto en hembras como en machos.

Otra posibilidad que explicaría la falta de efecto antidepresivo de clobenpropit en hembras está relacionada con la actividad del BDNF. La síntesis y las vías de señalización de BDNF son necesarias para observar los efectos tipo antidepresivo de los fármacos antidepresivos (Castrén et al.,2007). Haile y col. (2014) reportaron que la ketamina tiene un efecto tipo antidepresivo a través de un aumento rápido de

BNDF en roedores macho. Sin embargo, en hembras, el efecto tipo antidepresivo de ketamina no se observa en la fase proestro/ estro (Picart et al., 2019). Esto se debe a que el E<sub>2</sub> aumenta la expresión del BDNF y facilita la activación de sus vías de señalización, cambiando la actividad basal de este neuromodulador (Kiss et al., 2012). Los agonistas inversos del H<sub>3</sub>R, como clobenpropit, también provocan un aumento en la liberación de BDNF (Kumar et al., 2019) que podría ser bloqueado por la actividad previa de E<sub>2</sub> como sucede con la ketamina generando un efecto techo. En trabajos futuros tendremos que analizar la posible participación del BDNF en los efectos tipo antidepresivos reportados por clobenpropit.

## **Conclusión**

Los agonistas inversos del H<sub>3</sub>R se han propuesto como fármacos con potencial antidepresivo y ansiolítico, sin embargo, nunca se había probado su efectividad en individuos del sexo femenino, siendo que ésta es la población más afectada por las patologías que pretenden tratar.

Al comparar los efectos del agonista inverso de H<sub>3</sub>R, clobenpropit, en ratones de ambos sexos y distintas condiciones hormonales (en el caso de las hembras), clobenpropit resultó no ser efectivo para producir efectos tipo ansiolítico y tipo antidepresivo de forma consistente en las hembras.

Nuestros datos señalan que los efectos tipo ansiolíticos de clobenpropit son influenciados por la presencia y concentración de E<sub>2</sub> en los ratones hembra. De hecho, clobenpropit mostró efectos tipo ansiogénico y tipo depresivo en hembras OVX pretratadas con E<sub>2</sub>. Por lo tanto, nuestros resultados señalan que la disminución de la actividad intrínseca del H<sub>3</sub>R ocasionada por la administración de clobenpropit podría no ser una estrategia adecuada para tratar la patología de depresión y ansiedad en sujetos femeninos.

## Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos proponemos los siguientes estudios para resolver algunas de las incógnitas planteadas en esta tesis:

- Evaluar el efecto de la ovariectomía en ratones hembra sobre la expresión y funcionalidad del H<sub>3</sub>R en el sistema nervioso central, destacando el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (áreas relacionadas con la regulación de la ansiedad y depresión).
- Determinar si existe una variación en la expresión de H<sub>3</sub>R en hembras OVX y comparar con ratones hembra en distintas fases del ciclo estral.
- Determinar el efecto de dosis inferiores de clobenpropit en ratones hembra intactos en la prueba de nado forzado.
- Estudiar el efecto tipo ansiolítico de clobenpropit en combinación con antagonistas para los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> en ratones hembra.
- Determinar la acción de los andrógenos en el efecto antidepresivo de clobenpropit en ratones macho.
- Determinar cambios en la expresión de BDNF por la administración de clobenpropit en ratones hembra considerando la concentración de E<sub>2</sub>, circulante.

## Bibliografía

- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 3-18.
- Arenas, M. C., & Puigcerver, A. (2009). Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología (internet)*, 3(1), 20-29.
- Baeza, J., Balaguer, G., Belchi, I., Coronas, M., & Guillamón, N. (2008). Higiene y prevención de la ansiedad. España: Díaz de Santos. p. 183-187
- Bahi, A., Schwed, J. S., Walter, M., Stark, H., & Sadek, B. (2014). Anxiolytic and antidepressant-like activities of the novel and potent non-imidazole histamine

- H3 receptor antagonist ST-1283. *Drug design, development and therapy*, 8, 627.
- Barden, N. (2004). Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the pathophysiology of depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(3), 185.
- Bongers, G., Bakker, R. A., & Leurs, R. (2007). Molecular aspects of the histamine H3 receptor. *Biochemical pharmacology*, 73(8), 1195-1204.
- Borrow, A. P., & Cameron, N. M. (2014). Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: implications for female mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 13-25.
- Bourin, M. (2010). New challenges for translational psychopharmacology. *Frontiers in psychiatry*, 1, 3.
- Bourin, M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues in clinical neuroscience*, 17(3), 295.
- Bourin, M. (2018). The Use of Animal Models in Defining Antidepressant Response: A Translational Approach. In *Understanding Depression* (pp. 233-242). Springer, Singapore.
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 21(6), 567-574.
- Brandes, L. J., Bogdanovic, R. P., Cawker, M. D., & LaBella, F. S. (1987). Histamine and growth: interaction of antiestrogen binding site ligands with a novel histamine site that may be associated with calcium channels. *Cancer research*, 47(15), 4025-4031.
- Brown, R. E., Stevens, D. R., & Haas, H. L. (2001). The physiology of brain histamine. *Progress in neurobiology*, 63(6), 637-672.

- Bruneau, G., Batailler, M., Belghazi, M., Tillet, Y., & Blanc, M. R. (2014). Evidence that histaminergic neurons are devoid of estrogen receptor alpha in the ewe diencephalon during the breeding season. *General and comparative endocrinology*, 199, 86-93.
- Brunton L. L., Dandan R. H., & Knollmann B.C (Eds.) (2019) Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 13 a Ed. Mc Graw Hill education.
- Cárdenas G. E. M. Feria M. Vázquez J. Palacios L. C. de la Peña O. F. R. (2010) guía clínica para los trastornos afectivos (depresión y distimia) en niños y adolescentes. Secretaria de salud Mexico.
- Castrén, E. (2013). Neuronal network plasticity and recovery from depression. *JAMA psychiatry*, 70(9), 983-989.
- Castrén, E., Võikar, V., & Rantamäki, T. (2007). Role of neurotrophic factors in depression. *Current opinion in pharmacology*, 7(1), 18-21.
- Chee, S. S. A., & Menard, J. L. (2013). The histaminergic H1, H2, and H3 receptors of the lateral septum differentially mediate the anxiolytic-like effects of histamine on rats' defensive behaviors in the elevated plus maze and novelty-induced suppression of feeding paradigm. *Physiology & behavior*, 116, 66-74.
- Cover, K. K., Maeng, L. Y., Lebrón-Milad, K., & Milad, M. R. (2014). Mechanisms of estradiol in fear circuitry: implications for sex differences in psychopathology. *Translational psychiatry*, 4(8), e422-e422.
- De Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 145-161.
- 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(1), 66-72.

- Doboszewska, U., Wlaż, P., Nowak, G., Radziwoń-Zaleska, M., Cui, R., & Młyniec, K. (2017). Zinc in the monoaminergic theory of depression: its relationship to neural plasticity. *Neural plasticity*, 2017.
- Duman, R. S., Heninger, G. R., & Nestler, E. J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Archives of general psychiatry*, 54(7), 597-606.
- Eissa, N., Khan, N., Ojha, S. K., Łazewska, D., Kieć-Kononowicz, K., & Sadek, B. (2018). The histamine H3 receptor antagonist DL77 ameliorates MK801-induced memory deficits in rats. *Frontiers in neuroscience*, 12, 42.
- Ellenbroek, B. A., & Ghiabi, B. (2014). The other side of the histamine H3 receptor. *Trends in neurosciences*, 37(4), 191-199.
- Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., & López-Rubalcava, C. (2003). Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 28(5), 830-838.
- Femenía, T., Magara, S., DuPont, C. M., & Lindskog, M. (2015). Hippocampal-dependent antidepressant action of the H3 receptor antagonist clobenpropit in a rat model of depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(9), pyv032.
- Fernández-Guasti, A., Fiedler, J. L., Herrera, L., & Handa, R. J. (2012). Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme*, 44(8), 607.
- Fernández-Guasti, A., Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Contreras, C. M., & López-Rubalcava, C. (1999). Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 63(1), 13-20.

- Fernández-Guasti, A., & Picazo, O. (1990). The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37(1), 77-81.
- Ferretti, C., Blengio, M., Ghi, P., Adage, T., Portaleone, P., & Gamalero, S. R. (1998). Hypothalamic histamine release in normal and stressed rats is affected by sex and aging. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(1), 255-260.
- Frisch, C., Hasenöhrl, R. U., Krauth, J. y Huston, J. P. (1998). Comportamiento similar al ansiolítico después de una lesión de la región E2 del núcleo tuberomamilar. *Investigación cerebral experimental*, 119 (2), 260-264.
- Frye, C. A., Petralia, S. M., & Rhodes, M. E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(3), 587-596.
- Ghi, P., Ferretti, C., Lupi, M. L., Blengio, M., & Portaleone, P. (1991). Sexual dimorphism in [3H] histamine binding sites of rat cerebral cortex. *Pharmacological research*, 23(2), 187-193.
- Gotoh, K., Masaki, T., Chiba, S., Higuchi, K., Kakuma, T., Shimizu, H., ... & Yoshimatsu, H. (2009). Hypothalamic neuronal histamine signaling in the estrogen deficiency-induced obesity. *Journal of neurochemistry*, 110(6), 1796-1805.
- Haas, H., & Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 121.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological reviews*, 88(3), 1183-1241.
- Haile, C. N., Murrough, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Al Jurdi, R. K., Foulkes, A., ... & Newton, T. F. (2014). Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(2), 331-336.

- Hernández, H. C., Coronel, P. L., Aguilar, J. C., & Rodríguez, E. C. (2016). Neurobiología de la depresión mayor y de su tratamiento farmacológico. *Salud mental*, 39(1), 47-58.
- Holmes PV. Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Crit Rev Neurobiol*. 2003;15(2):143-74.
- Kiss, Á., Delattre, A. M., Pereira, S. I., Carolino, R. G., Szawka, R. E., Anselmo-Franci, J. A., ... & Ferraz, A. C. (2012). 17 $\beta$ -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory-and depression-related brain areas. *Behavioural brain research*, 227(1), 100-108.
- Kokras, N., Antoniou, K., Mikail, H. G., Kafetzopoulos, V., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Dalla, C. (2015). Forced swim test: what about females?. *Neuropharmacology*, 99, 408-421.
- Kokras, N., Hodes, G. E., Bangasser, D. A., & Dalla, C. (2019). Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: An obstacle to antidepressant drug development?. *British journal of pharmacology*.
- Kumar, A., Dogra, S., Sona, C., Umrao, D., Rashid, M., Singh, S. K., ... & Yadav, P. N. (2019). Chronic histamine 3 receptor antagonism alleviates depression like conditions in mice via modulation of brain-derived neurotrophic factor and hypothalamus-pituitary adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 101, 128-137.
- Lee, B. H., & Kim, Y. K. (2010). The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry investigation*, 7(4), 231.
- Li, J. N., Li, X. L., He, J., Wang, J. X., Zhao, M., Liang, X. B., ... & Chen, H. (2015). Sex-and afferent-specific differences in histamine receptor expression in vagal afferents of rats: A potential mechanism for sexual dimorphism in prevalence and severity of asthma. *Neuroscience*, 303, 166-177.

- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180-185.
- Londoño-Pérez, C., Peñate-Castro, W., & González-Rodríguez, M. (2017). Depression Men's Symptoms. *Universitas Psychologica*, 16(4), 151-169.
- Luque, J. M., de Blas, M. R., Segovia, S., & Guillamón, A. (1992). Sexual dimorphism of the dopamine- $\beta$ -hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. *Developmental brain research*, 67(2), 211-215.
- Maeng, L. Y., & Milad, M. R. (2015). Sex differences in anxiety disorders: interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and behavior*, 76, 106-117.
- Mancha-Gutiérrez. H. M. (2017) Análisis del efecto tipo antidepresivo de un agonista inverso del H3R, en ratones adolescentes macho: Interacción entre histamina y los sistemas monoaminérgicos (tesis de maestría, departamento de farmacobiología Cinvestav)
- Mast, N., Linger, M., & Pikuleva, I. A. (2013). Inhibition and stimulation of activity of purified recombinant CYP11A1 by therapeutic agents. *Molecular and cellular endocrinology*, 371(1-2), 100-106.
- McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2004). Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral neuroscience*, 118(1), 63.
- Melcangi, R. C., Giatti, S., & Garcia-Segura, L. M. (2016). Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: sex-specific features. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 67, 25-40.
- Mohsen, A., Yoshikawa, T., Miura, Y., Nakamura, T., Naganuma, F., Shibuya, K., ... & Yanai, K. (2014). Mechanism of the histamine H3 receptor-mediated increase in exploratory locomotor activity and anxiety-like behaviours in mice. *Neuropharmacology*, 81, 188-194.

- Monczor, F., & Fernandez, N. (2016). Current knowledge and perspectives on histamine H1 and H2 receptor pharmacology: functional selectivity, receptor crosstalk, and repositioning of classic histaminergic ligands. *Molecular pharmacology*, 90(5), 640-648.
- Mori, H., Matsuda, K. I., Yamawaki, M., & Kawata, M. (2014). Estrogenic regulation of histamine receptor subtype H1 expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in female rats. *PloS one*, 9(5), e96232.
- Mori, N., & Caballero, J. (2010). Historia natural de la depresión. *Revista peruana de epidemiología*, 14(2), 86-90.
- Mueller, S. M., Mueller, F., Reinhardt, J., Itin, P., Navarini, A., Stippich, C., & Borgwardt, S. (2019). Assessment of the impact of sex in intensity, skin flares and central processing of histaminergic itch—A pilot study. *Experimental Dermatology*, 28(12), 1493-1500.
- Mulinari, S. (2012). Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. *Journal of the History of the Neurosciences*, 21(4), 366-392.
- Noris, G., Hol, D., Clapp, C., & Martinez de la Escalera, G. (1995). Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1-1 cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology*, 136(7), 2967-2974.
- Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, 22
- O'Donnell J. M., Bies R. R., & Shelton R. C., (2019) Tratamiento farmacológico de trastornos de depresión y ansiedad Brunton L.L., Dandan R. H., & Knollmann B.C (Eds.) Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 13 a Ed. Mc Graw Hill education

- Olvera-Hernández, S., & Fernández-Guasti, A. (2011). Sex differences in the burying behavior test in middle-aged rats: Effects of diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(4), 532-539.
- Orozco, W. N., & Baldares, M. J. V. (2012). Trastornos de ansiedad: revisión dirigida para atención primaria. *Revista médica de costa rica y Centroamérica*, 69(604), 497-507.
- Pae, CU, Mandelli, L., Kim, TS, Han, C., Masand, PS, Marks, DM, ... y Serretti, A. (2009). Efectividad de los tratamientos antidepresivos en mujeres premenopáusicas versus posmenopáusicas: un estudio piloto sobre los efectos diferenciales de las hormonas sexuales sobre los efectos antidepresivos. *Biomedicina y farmacoterapia*, 63 (3), 228-235.
- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L., & Haas, H. L. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological reviews*, 67(3), 601-655.
- Pérez-García, C., Morales, L., Cano, M. V., Sancho, I., & Alguacil, L. F. (1999). Effects of histamine H3 receptor ligands in experimental models of anxiety and depression. *Psychopharmacology*, 142(2), 215-220.
- Pérez-Padilla, E. A., Cervantes-Ramírez, V. M., Hijuelos-García, N. A., Pineda-Cortés, J. C., & Salgado-Burgos, H. (2017). Prevalencia, causas y tratamiento de la depresión Mayor. *Revista biomédica*, 28(2), 73-98.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., & Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*, 177(3), 245-255.
- Picard, N., Takesian, A. E., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2019). NMDA 2A receptors in parvalbumin cells mediate sex-specific rapid ketamine response on cortical activity. *Molecular psychiatry*, 24(6), 828-838.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732.

- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. *Trends in pharmacological sciences*, 29(10), 493-498.
- Reyes-Ticas, J. A. (2010). *Trastornos de ansiedad: Guía práctica para diagnóstico y tratamiento*. Biblioteca virtual en salud. Barcelona, España.
- Richardson, K., & Barkham, M. (2020). Recovery from depression: a systematic review of perceptions and associated factors. *Journal of Mental Health*, 29(1), 103-115.
- Rivadeneira-Domínguez, E., Saavedra, M., Rodríguez-Landa, J. F. (2009). El tratamiento con progesterona previene las alteraciones motoras inducidas por la intoxicación con semillas de cicada (*Dioon spinulosum*) en la rata macho. *Revista de Toxicología*, 26 (2-3).
- Rizk, A., Curley, J., Robertson, J., & Raber, J. (2004). Anxiety and cognition in histamine H3 receptor<sup>-/-</sup> mice. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1992-1996.
- Sadek, B., Saad, A., Sadeq, A., Jalal, F., & Stark, H. (2016). Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behavioural brain research*, 312, 415-430.
- Saini, T., Kumar, S., Narasimhan, B. (2016). Central nervous system activities of indole derivatives: an overview. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 16 (1), 19-28.
- Schjerner, O., Rosenzweig, M., Pottegård, A., Damkier, P., & Nielsen, J. (2016). Abuse potential of pregabalin. *CNS drugs*, 30(1), 9-25.
- Shors, T. J., & Leuner, B. (2003). Estrogen-mediated effects on depression and memory formation in females. *Journal of affective disorders*, 74(1), 85-96.
- Sierra, J. C., Ortega, V., & Zubeidat, I. (2003). Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Revista mal-estar e subjetividade*, 3(1), 10-59.

- Simons, F. E. R. (2004). Advances in H1-antihistamines. *New England Journal of Medicine*, 351(21), 2203-2217.
- Soliani, A., Kubota, S. M., Corrêa, M. F., Cerutti, S. M., & Fernandes, J. P. S. (2020). Differential contribution of H3R antagonism by LINS01 compounds on memory, anxiety-like behaviour and spontaneous locomotor activity in healthy rats. *Behavioural brain research*, 377, 112230.
- Spencer, J. L., Waters, E. M., Romeo, R. D., Wood, G. E., Milner, T. A., & McEwen, B. S. (2008). Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 219-237.
- Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Ribeiro, A., Pfaff, D. W., & Ågmo, A. (2010). The role of the estrogen receptor  $\alpha$  in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. *Behavioural brain research*, 210(2), 211-220.
- Spoletini, I., Vitale, C., Malorni, W., & Rosano, G. M. (2013). Sex differences in drug effects: interaction with sex hormones in adult life. In *Sex and gender differences in pharmacology* (pp. 91-105). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sramek, J. J., Murphy, M. F., & Cutler, N. R. (2016). Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues in clinical neuroscience*, 18(4), 447.
- Steimer, T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in clinical neuroscience*, 13(4), 495.
- Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. Å., Pfaff, D. W., & Ogawa, S. (2009). Effect of ER- $\beta$  gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiology & behavior*, 96(2), 300-306.
- Treit, DR (1981). Enterramiento defensivo condicionado: un nuevo paradigma para el estudio de los agentes ansiolíticos (Tesis doctoral, Universidad de British Columbia).

- Treit, D., Pesold, C., & Rotzinger, S. (1993). Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behavioral neuroscience*, 107(5), 770.
- Tyrer, P., & Baldwin, D. (2006). Generalised anxiety disorder. *The Lancet*, 368(9553), 2156-2166.
- Üstün, T. B., Ayuso-Mateos, J. L., Chatterji, S., Mathers, C., & Murray, C. J. (2004). Global burden of depressive disorders in the year 2000. *The British journal of psychiatry*, 184(5), 386-392.
- Verma, L., & Jain, N. S. (2016). Central histaminergic transmission modulates the ethanol induced anxiolysis in mice. *Behavioural Brain Research*, 313, 38-52.
- Vliagoftis, H., Dimitriadou, V., Boucher, W., Rozniecki, J. J., Correia, I., Raam, S., & Theoharides, T. C. (1992). Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *International archives of allergy and immunology*, 98(4), 398-409.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2006). A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology*, 31(6), 1097.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), 322.
- Walf, A. A., Koonce, C. J., & Frye, C. A. (2008). Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice. *Behavioral neuroscience*, 122(5), 974.
- Walf, A. A., Koonce, C. J., & Frye, C. A. (2009). Adult female wildtype, but not oestrogen receptor  $\beta$  knockout, mice have decreased depression-like behaviour during pro-oestrus and following administration of oestradiol or diarylpropionitrile. *Journal of Psychopharmacology*, 23(4), 442-450.

- Wijtmans, M., Leurs, R., & Esch, I. D. (2007). Histamine H3 receptor ligands break ground in a remarkable plethora of therapeutic areas. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(7), 967-985.
- Yoshikawa, T., Nakamura, T., Shibakusa, T., Sugita, M., Naganuma, F., Iida, T., ... y Yanai, K. (2014). La ingesta insuficiente de L-histidina reduce la histamina cerebral y provoca comportamientos similares a la ansiedad en ratones machos. *The Journal of Nutrition*, 144 (10), 1637-1641.
- Yuzurihara, M., Ikarashi, Y., Ishige, A., Sasaki, H., Kuribara, H., & Maruyama, Y. (2000). Effects of drugs acting as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(1), 145-150.
- Xu, Y., Barish, P. A., Pan, J., Ogle, W. O., & O'Donnell, J. M. (2012). Animal models of depression and neuroplasticity: assessing drug action in relation to behavior and neurogenesis. In *Psychiatric Disorders* (pp. 103-124). Humana Press.
- Zhang, F., Liu, B., Lei, Z., & Wang, J. H. (2012). mGluR 1, 5 activation improves network asynchrony and GABAergic synapse attenuation in the amygdala: implication for anxiety-like behavior in DBA/2 mice. *Molecular brain*, 5(1), 20.
- Zimmermann AS, Burhenne H, Kaever V, Seifert R, and Neumann D (2011) Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57Bl/6 and Balb/c. *Inflamm Res* 60:1153–1159.