

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

**Acción del óxido nítrico en el efecto antidepresivo de
Punica granatum en ratones Swiss Webster machos
adultos**

T E S I S

Que presenta

Med. Cir. Alexandere Aedo Torrado

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de la tesis: Dra. Carolina López Rubalcava

Este trabajo se realizó en el laboratorio 17 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Sede Sur bajo la dirección de la Dra. Carolina López Rubalcava. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través de la beca 831431, para estudios nacionales.

A mi hermano: por su amor incondicional, te debo la vida (literalmente).

A mi papá y a Paty: por todo su apoyo, gracias por motivarme a seguir.

A Gaby: por siempre haber estado ahí, te extraño infinitamente.

A Charlie y a Frankie: por ser mi mejor compañía y hacerme reír todos los días.

We all die. The goal isn't to live forever,
the goal is to create something that will.

- Chuck Palahniuk

Agradecimientos

Gracias a todos los ratoncitos que con sus vidas nos han dado tanto, sin ustedes todo lo que hacemos sería imposible.

A la Dra. Carolina López Rubalcava por permitirme formar parte de su laboratorio, por su disposición y paciencia durante todos los altibajos y por todo su aprendizaje.

Al Dr. Emilio Galván Espinosa, quien como coordinador de maestría siempre me apoyó durante los momentos más complicados de este proceso.

A mi sínodo, el Dr. David Centurión Pacheco y la Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena, por sus aportaciones y comentarios que me permitieron culminar este trabajo de manera satisfactoria.

A Isa por toda su ayuda, por enseñarme cosas que es imposible aprender en libros y por ser uno de los pilares más importantes del laboratorio; este proyecto no hubiera sido posible sin ti.

A todos los que forman y formaron parte del laboratorio 17: Dany, Jessy, Nancy y Luis, por la convivencia, los consejos y las pláticas que hicieron del laboratorio uno de los mejores ambientes de trabajo en los que he estado.

A todos los doctores del departamento de farmacobiología por sus enseñanzas y el conocimiento que me lograron transmitir a lo largo de la maestría.

A Shareny, por facilitarme la vida con todos los pendientes y trámites que siempre hay que hacer, y siempre estar dispuesta a ayudarme.

Muchas gracias.

Tabla de contenido

Lista de abreviaturas	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas	12
Resumen	13
Abstract	15
1. Introducción:	17
1.1. Depresión	17
1.1.1. <i>Síntomas de depresión</i>	17
1.1.2. <i>Neurobiología de la depresión</i>	18
1.1.2.1. <i>Hipótesis monoaminérgica</i>	19
1.1.2.2. <i>Estrés y depresión</i>	21
1.1.2.3. <i>Neuroinflamación y estrés oxidativo</i>	24
1.1.3. <i>Tratamiento farmacológico actual – Contratiempos</i>	26
1.2. Fitofármacos	27
1.2.1. <i>Punica granatum</i>	29
1.2.1.1. <i>Punica granatum y depresión</i>	31
1.3. Óxido nítrico	32
1.3.1. <i>Óxido nítrico y neuroinflamación</i>	34
1.3.2. <i>Óxido nítrico y depresión</i>	37
1.4. Punica granatum y su relación con el óxido nítrico	38
2. Justificación:	40
3. Pregunta de investigación:	40
4. Hipótesis:	41
5. Objetivo general:	41
5.1. Objetivos particulares:	41
5.1.1. <i>Etapas 1</i>	41
5.1.2. <i>Etapas 2</i>	42
6. Materiales y métodos:	42
6.1. Sujetos experimentales:	42
6.2. Fármacos:	42
6.3. Modelos animales:	43
6.3.1. <i>Prueba de suspensión de cola</i>	43
6.3.2. <i>Prueba de nado forzado</i>	44
6.3.3. <i>Actividad locomotora</i>	46
7. Diseño experimental:	47
7.1. Experimento 1:	47
7.2. Experimento 2:	47

7.3. Experimento 3:	48
8. Análisis estadístico:	50
9. Resultados:.....	51
9.1. Establecer la dosis respuesta de <i>P. granatum</i>	51
9.1.1. Prueba de suspensión de cola	52
9.1.2. Prueba de nado forzado.....	52
9.1.3. Actividad locomotora	53
9.2. Determinar la dosis respuesta del donador de óxido nítrico nitroprusiato de sodio (SNP)	53
9.2.1. Prueba de suspensión de cola	54
9.2.2. Prueba de nado forzado.....	55
9.2.3. Actividad locomotora	55
9.3. Establecer la dosis respuesta del inhibidor de las sintasas de óxido nítrico, NG-nitro-L- arginina metil éster (L-NAME)	56
9.3.1. Prueba de suspensión de cola	57
9.3.2. Prueba de nado forzado.....	57
9.3.3. Actividad locomotora	58
9.4. Determinar la dosis respuesta del inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal 7-nitroindazol (7-NI).....	58
9.4.1. Prueba de suspensión de cola	59
9.4.2. Prueba de nado forzado.....	60
9.4.3. Actividad locomotora	60
9.5. Estudiar el efecto de dosis combinadas de <i>P. granatum</i> y nitroprusiato de sodio (SNP) ..	61
9.5.1. Prueba de suspensión de cola	62
9.5.2. Prueba de nado forzado.....	62
9.5.3. Actividad locomotora	63
9.6. Estudiar el efecto de dosis combinadas de <i>P. grantum</i> y L-NAME.....	63
9.6.1. Prueba de suspensión de cola	64
9.6.2. Prueba de nado forzado.....	65
9.6.3. Actividad locomotora	65
9.7. Estudiar el efecto de dosis combinadas de <i>P. granatum</i> y 7-nitroindazol (7-NI)	66
9.7.1. Prueba de suspensión de cola	67
9.7.3. Actividad locomotora	68
10. Resumen general de resultados:.....	69
11. Discusión:	70
11. Conclusiones:.....	82
12. Perspectivas:	83
13. Referencias:.....	84
14. Anexo I	91
14.1. Neurogénesis y neuroplasticidad	91
14.2. Neuroconectividad	92

Lista de abreviaturas

5-HT: 5-hidroxitriptamina.

7-NI: 7-nitroindazol.

ACTH (por sus siglas en inglés): Hormona adrenocorticotrópica.

ANOVA: Análisis de varianza.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BDNF (por sus siglas en inglés): Factor neurotrófico derivado del cerebro.

CRH (por sus siglas en inglés): Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa.

CRP (por sus siglas en inglés): Proteína C reactiva.

CTRL: Control.

DA: Dopamina.

eNOS (por sus siglas en inglés): Sintasa de óxido nítrico endotelial.

GABA (por sus siglas en inglés): Ácido gamma-aminobutírico.

GMPc (por sus siglas en inglés): Guanosin monofosfato cíclico.

HHA: Hipotálamo hipófisis adrenal.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-2: Interleucina 2.

IL-6: Interleucina 6.

iNOS (por sus siglas en inglés): Sintasa de óxido nítrico inducible.

ip: Intraperitoneal.

ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina.

K⁺: Potasio.

kg: Kilogramos.

L-NAME (por sus siglas en inglés): NG-nitro-L-arginina metil éster.

L-NMMA (por sus siglas en inglés): N-metilarginina.

L-NOArg (por sus siglas en inglés): N^G-nitro-L-arginina.

MAO: Monoamino oxidasa.

MAPK (por sus siglas en inglés): Proteína cinasa activada por mitógenos.

mg: Miligramos.

mPGES-1 (por sus siglas en inglés): Sintasa-1 microsomal de prostaglandina E).

NA: Noradrenalina.

NADPH (por sus siglas en inglés): Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NF-kB (por sus siglas en inglés): Factor nuclear kappa beta.

NIMH (por sus siglas en inglés): Escala de depresión de Hamilton.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NMDAR (por sus siglas en inglés): Receptor N-metil-D-aspartato.

nNOS (por sus siglas en inglés): Sintasa de óxido nítrico neuronal.

NO (por sus siglas en inglés): Óxido nítrico.

NOS (por sus siglas en inglés): Sintasa de óxido nítrico.

NOSe: Sintasa de óxido nítrico endotelial.

NOSi: Sintasa de óxido nítrico inducible.

NOSn: Sintasa de óxido nítrico neuronal.

Nrf2 (por sus siglas en inglés): Factor nuclear derivado de eritroide 2 similar al 2.

PGE2: Prostaglandina E2.

REDOX (por sus siglas en inglés): Oxidación-reducción.

ROS (por sus siglas en inglés): Especies reactivas de oxígeno.

SERT (por sus siglas en inglés): Transportador de serotonina.

SNP (por sus siglas en inglés): Nitroprusiato de sodio.

STAR*D (por sus siglas en inglés): Sequenced treatment alternatives to relieve depression.

SW: Swiss Webster.

TEC: Terapia electroconvulsiva.

TMS (por sus siglas en inglés): Estimulación magnética transcraneal.

TNF- α (por sus siglas en inglés): Factor de necrosis tumoral alfa.

Índice de figuras

Figura 1. Síntomas de depresión	18
Figura 2. Teoría unificada de la depresión	19
Figura 3. Progresión desde sensibilización al estrés hasta depresión	23
Figura 4. Factores internos y externos que afectan la neuroinflamación	25
Figura 5. Comparación frente a frente de eficacia y tolerabilidad entre 21 antidepresivos	28
Figura 6. Diagrama de bosque de las redes de meta-análisis de todos los estudios para aceptabilidad	27
Figura 7. Efectos terapéuticos de los fitofármacos	28
Figura 8. Principales actividades de los compuestos químicos extraídos de las hojas de <i>P. granatum</i>	30
Figura 9. Apreciación global de la formación y algunas funciones del óxido nítrico (NO)	32
Figura 10. Diagrama esquemático de la relación espacial entre las 3 isoformas de la sintasa de óxido nítrico (NOS)	34
Figura 11. Vía L-arginina – óxido nítrico – GMPc	39
Figura 12. Prueba de suspensión de cola	44
Figura 13. Conductas observadas durante la prueba de nado forzado	45
Figura 14. Arena utilizada para la prueba de campo abierto	46
Figura 15. Diseño experimental etapa 1	49
Figura 16. Diseño experimental etapa 2	50
Figura 17. Efecto de distintas dosis de <i>Punica granatum</i> en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	52
Figura 18. Efecto de distintas dosis de <i>Punica granatum</i> en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	52
Figura 19. Efecto de distintas dosis de <i>Punica granatum</i> en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	53

Figura 20. Efecto de distintas dosis de nitroprusiato de sodio en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	54
Figura 21. Efecto de distintas dosis de nitroprusiato de sodio en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal...	55
Figura 22. Efecto de distintas dosis de nitroprusiato de sodio en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal.....	55
Figura 23. Efecto de distintas dosis de L-NAME en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	57
Figura 24. Efecto de distintas dosis de L-NAME en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	57
Figura 25. Efecto de distintas dosis de L-NAME en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	58
Figura 26. Efecto de distintas dosis de 7-nitroindazol en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	59
Figura 27. Efecto de distintas dosis de 7-nitroindazol en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal	60
Figura 28. Efecto de distintas dosis de 7-nitroindazol en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal.....	60
Figura 29. Efecto de dosis únicas de nitroprusiato de sodio y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con nitroprusiato de sodio en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos.....	62
Figura 30. Efecto de dosis única de nitroprusiato de sodio y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con nitroprusiato de sodio en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos	62
Figura 31. Efecto de dosis única de nitroprusiato de sodio y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con nitroprusiato de sodio en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos	63

Figura 32. Efecto de dosis única de L-NAME, Punica granatum, y una combinación de Punica granatum con L-NAME en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos.....	64
Figura 33. Efecto de dosis únicas de L-NAME y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con L-NAME en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos.....	65
Figura 34. Efecto de dosis únicas de L-NAME y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con L-NAME en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos.....	65
Figura 35. Efecto de dosis única de 7- nitroindazol, Punica granatum, y una combinación de Punica granatum con 7-nitroindazol en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos.....	67
Figura 36. Efecto de dosis únicas de 7-nitroindazol y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con 7-nitroindazol en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos.....	67
Figura 37. Efecto de dosis únicas de 7-nitroindazol y Punica granatum, y una combinación de P. granatum con 7-nitroindazol en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos.....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los principales estudios que abordan la relación entre los distintos gasotransmisores y la ansiedad	36
Tabla 2. Resumen general de resultados	69

Resumen

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más prevalentes e incapacitantes a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que 322 millones de personas alrededor del mundo padecen depresión y que 800 mil muertes por suicidio están relacionadas directamente con esta patología. A pesar de que en la actualidad contamos con una gran cantidad de psicofármacos utilizados en el tratamiento de la depresión, la mayoría de ellos intervienen únicamente en los sistemas de neurotransmisores, principalmente en el sistema serotoninérgico. Cerca del 33% de los pacientes con depresión no responden a estos tratamientos convencionales lo que hace de suma importancia encontrar otros blancos terapéuticos que puedan combatir esta enfermedad.

Una de las alternativas propuestas es el sistema nitrérgico ya que diversas investigaciones han demostrado que el óxido nítrico participa en la regulación del estado de ánimo y la conducta. También se han propuesto fitofármacos como *P. granatum* que ha demostrado tener propiedades antidepresivas y actividad en el sistema nitrérgico.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar los efectos de *P. granatum* en dos modelos animales de depresión, así como determinar la participación del óxido nítrico en la conducta tipo depresión en estos mismos dos modelos. Se utilizó un donador de óxido nítrico (SNP) y dos inhibidores de sus sintetas (L-NAME y 7-NI). También se estudió la combinación de *P. granatum* con estos 3 fármacos para definir la interacción que pudiera tener *P. granatum* y sus efectos antidepresivos sobre el sistema nitrérgico.

Los resultados muestran que la administración aguda de *P. granatum* ejerce efectos antidepresivos en ambas pruebas conductuales mientras que el aumento de óxido nítrico a través de la administración aguda de su donador tuvo efectos prodepresivos en los roedores sometidos a los modelos de depresión. De forma interesante, tanto la administración del inhibidor no selectivo (L-NAME) como del

inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal (7-NI), presentan acciones duales con dosis que exhiben efectos prodepresivos y dosis con efectos antidepresivos en la prueba de nado forzado.

La combinación de *P. granatum* y SNP bloquea los efectos prodepresivos alcanzados por la administración única del donador de óxido nítrico; mientras que el efecto antidepresivo de este fitofármaco se inhibe por completo al combinarse con las dosis prodepresivas de L-NAME y 7-NI. Aunque el efecto antidepresivo de *P. granatum* principalmente se debe a su acción sobre el sistema serotoninérgico, su participación no tan significativa sobre el sistema catecolaminérgico también se ve afectada al ser combinado con los fármacos que actúan sobre las sintasas del óxido nítrico.

Podemos concluir que el óxido nítrico tiene un efecto prodepresivo que se ve bloqueado por la administración aguda de *P. granatum*. Dado que la administración de los inhibidores de la sintasa de óxido nítrico, L-NAME y 7-NI, suprimen por completo la acción antidepresiva de este fitofármaco, se propone que este efecto está siendo mediado por la interacción de *P. granatum* sobre las sintasas de óxido nítrico, principalmente la neuronal.

Abstract

Depression is one of the most prevalent and disabling psychiatric disorders worldwide. The World Health Organization estimates 322 million people around the world suffer from depression and 800 thousand deaths by suicide are directly linked to this pathology. Even though nowadays we have a great variety of psychopharmaceutic drugs used for the treatment of depression, most of them mainly target neurotransmitter systems, especially serotonin. Close to 33% of patients with depression do not respond to these conventional treatments, making it of great importance finding other therapeutic targets to treat this disease.

One of the alternatives proposed is the nitrenergic system since several investigations have linked nitric oxide with mood and behavior. Phytopharmaceuticals like *Punica granatum* have been suggested as they have shown anti-depressive properties and actions on the nitrenergic system.

This project's main goal was to evaluate the effects of *P. granatum* in two animal depression models, as well as to determine the involvement of nitric oxide in these same models using a nitric oxide donor (sodium nitroprusside) and two of its synthase inhibitors (L-NAME and 7-NI). The combination of *P. granatum* and these 3 drugs to determine the interaction between the antidepressant effects of *P. granatum* and the nitrenergic system was also studied.

Results show that acute administration of *P. granatum* has antidepressant-like effects in both behavioral tests, while the increase of nitric oxide through the acute administration of its donor had pro depressive-like effects in mice subjected to these animal models of depression. Interestingly, both the acute administration of the non-selective synthase inhibitor (L-NAME), as well as the administration of the selective nitric oxide neuronal synthase inhibitor (7-NI), showed dual actions with doses with pro depressive- like effects and others exhibiting antidepressant-like effects in the forced swimming test.

The antidepressant-like effects reached with the acute administration of *P. granatum* were partially reversed when combined with SNP, similarly as when it is combined with the pro depressive-like doses of L-NAME and 7-NI. Even though the antidepressant-like effect of *P. granatum* is mainly due to its actions on the serotonergic system, its not so prominent effects on the catecholaminergic system are also affected when combined with the drugs acting on nitric oxide.

We can conclude that nitric oxide has a pro depressive effect that is blocked by the acute administration of *P. granatum*. Since the administration of the nitric oxide synthase inhibitors, L-NAME and 7-NI, completely suppress the antidepressant action of this phytopharmaceutical drug, we propose that this effect is being caused by the interaction between *P. granatum* and the nitric oxide synthases, mainly the neuronal synthase.

1. Introducción:

1.1. Depresión

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más prevalentes e incapacitantes. La Organización Mundial de la Salud estimó que para el año 2020, sería la segunda causa de carga mundial general de morbilidad, únicamente detrás de la enfermedad isquémica, y sería la primera causa de discapacidad a nivel mundial (1,2).

Se estima que el 15% de los pacientes deprimidos acaba suicidándose. Todo episodio depresivo no tratado dura, por término medio, 10 meses. Como mínimo, el 75% de los pacientes afectados sufre un segundo episodio de depresión, generalmente en los primeros 6 meses después del inicial. El número medio de episodios depresivos a lo largo de la vida es de cinco (3).

1.1.1. Síntomas de depresión

La depresión se caracteriza por alteraciones en la cognición, regulación emocional, memoria, funciones motoras, motivación, y síntomas neurovegetativos. De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, quinta edición (DSM-V), un episodio depresivo mayor consiste en estado de ánimo triste y/o pérdida de interés (anhedonia) y al menos cuatro de los siguientes síntomas: cambios en el apetito/peso, trastornos en el sueño como insomnio o hipersomnia, agitación o retraso psicomotriz, falta de energía, ideas sobrevaloradas de culpa o minusvalía, dificultades para concentrarse y/o poner atención, e ideación suicida (Fig. 1) (3,4).

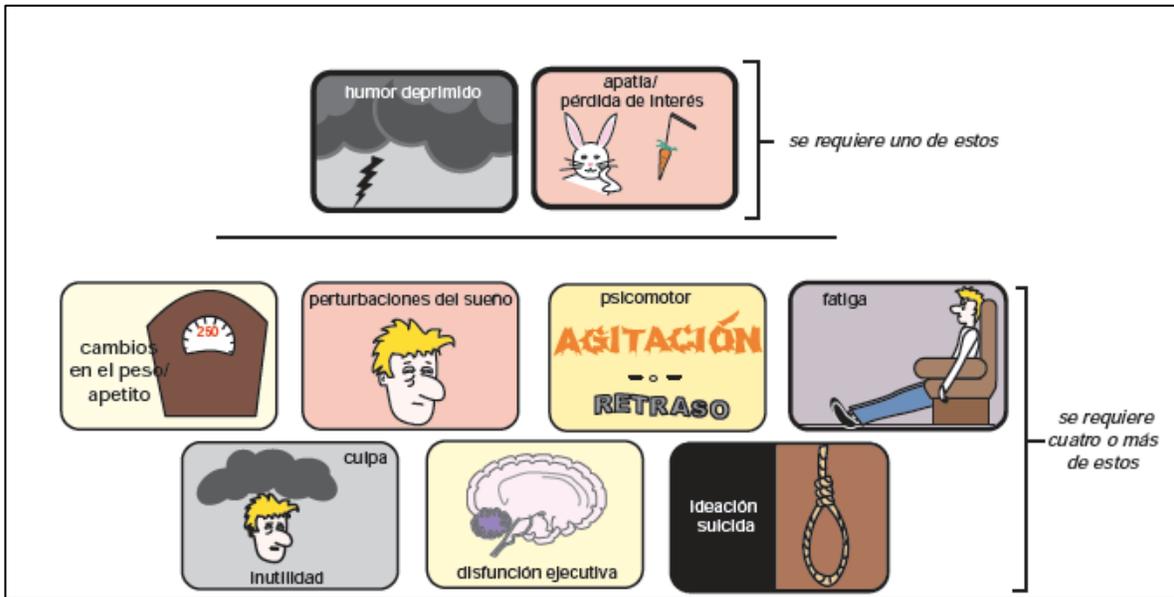


Figura 1. **Síntomas de depresión.** De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM), un episodio depresivo mayor consiste en estado de ánimo deprimido o pérdida de interés, y al menos cuatro de los siguientes: cambios en el apetito/peso, insomnio o hipersomnias, agitación o retraso psicomotor, fatiga, sentimientos de culpa o de inutilidad, disfunción ejecutiva e ideación suicida. (Stephen M. Stahl, 2013).

1.1.2. Neurobiología de la depresión

La patofisiología de la depresión no ha sido del todo elucidada. Las investigaciones implican a diversos mecanismos que incluyen alteraciones en los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico y glutamatérgico, un aumento en la inflamación, anormalidades en el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA), cambios vasculares, y una disminución en la neurogénesis y neuroplasticidad (2). Al ser un trastorno complejo que involucra factores genéticos, epigenéticos y ambientales, su expresión fenotípica también es variable (Fig. 2) (2)

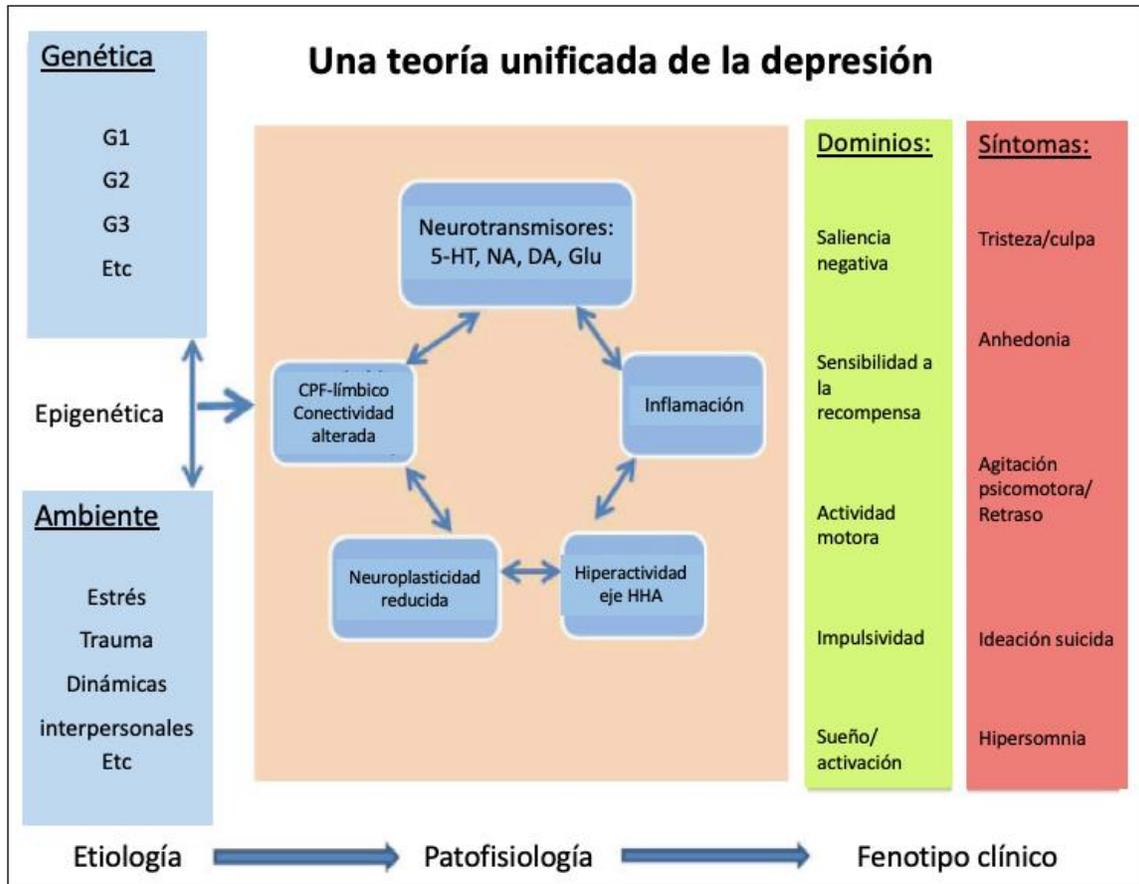


Figura 2. *Teoría unificada de la depresión*. Numerosos factores etiológicos tanto genéticos como ambientales interactúan para causar uno o más mecanismos patofisiológicos recíprocamente interactivos que, a su vez, causan expresiones sintomáticas fenotípicas en uno o más de los dominios. (Traducido y modificado de J. Dean, et al., 2017).

1.1.2.1. Hipótesis monoaminérgica

Considerada como la teoría clásica de la etiopatogenia de la depresión, hipotetiza que este trastorno es causado por una alteración en los niveles de una o más de las monoaminas (5-hidroxitriptamina [5-HT], noradrenalina [NA] y dopamina [DA]), sugiriendo que el sistema de neurotransmisión trimonoaminérgico en su conjunto puede encontrarse disfuncional en varios de sus circuitos cerebrales, con diferentes neurotransmisores implicados (4). La teoría de las aminas biogénicas se encuentra basada en la acción antidepresiva de inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (MAO) y bloqueadores de la recaptura de las monoaminas, así como en el efecto depresivo de la reserpina, una sustancia que depleta los depósitos

monoaminérgicos. Se sugiere que una escasez de noradrenalina y/o 5-HT en la hendidura sináptica conformaba la base neurobiológica de la depresión (5).

Más evidencia que apoya esta teoría incluye reducción en los metabolitos de serotonina en pacientes deprimidos, aumento de 5-HT cerebral posterior al tratamiento con antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS) e inhibidores de la recaptura de 5-HT y noradrenalina, también conocidos como antidepresivos duales. Aumento en la secreción de NA por medicamentos antidepresivos efectivos como la mirtazapina, e inhibición de su recaptura con antidepresivos tricíclicos, duales, e inhibidores de la recaptura de noradrenalina y dopamina. Asimismo, los inhibidores de la recaptura de dopamina como el bupropión, también demuestran la participación de la vía mesolímbica al explicar los síntomas neurovegetativos causados por una alteración en el sistema de motivación y recompensa (2).

No obstante, esta teoría siempre se enfrentó a dificultades como el hecho de que los tratamientos antidepresivos demoran unas semanas en mostrar efectos clínicos medibles, de tal manera que el enfoque también se trasladó a posibles cambios en las características y funciones de los receptores monoaminérgicos (5); las cuales incluyen la regulación de la expresión génica y el papel de los factores de crecimiento. El agotamiento de los neurotransmisores provoca una regulación compensatoria al alza de sus receptores postsinápticos, encontrándose mayor densidad de receptores 5-HT₂ y β -adrenérgicos en víctimas de suicidio por depresión (4,5).

Finalmente, otros neurotransmisores que no pertenecen al grupo de las monoaminas, como el glutamato también han sido implicados en la regulación del estado de ánimo. En los años 50s se reportó de manera inesperada que el medicamento antituberculosis, D-cicloserina, un modulador del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), poseía propiedades antidepresivas. Sin embargo, no fue hasta finales de los años noventa que se descubrió que una única dosis sub-anestésica

de ketamina inducía efectos antidepresivos inmediatos en pacientes con depresión grave (6). La ketamina, un inhibidor del canal abierto en los receptores de glutamato NMDA con posterior liberación de glutamato (4), se considera un potente fármaco que tiene la capacidad de ejercer su acción de manera inmediata a diferencia de los antidepresivos clásicos (2), relacionando una de las posibles causas de la depresión con neurotransmisión glutamatérgica excesiva y excitotoxicidad (6).

1.1.2.2. Estrés y depresión

El estrés es una experiencia habitual de la vida diaria que se caracteriza por la exposición a estímulos internos y externos generadores de estrés, y que requiere adaptaciones conductuales, psicológicas y fisiológicas para el mantenimiento de un estado de homeostasis. Cuando algún estresor pone a prueba la integridad de un organismo, una serie de reacciones fisiológicas que involucran al eje HHA, al sistema medular simpatoadrenal y a cascadas inflamatorias, contrarrestan la amenaza y ajustan al organismo a una nueva situación usualmente conocida como “respuesta al estrés” (7).

Mientras que se conoce a través de las teorías modernas de la depresión que un único gen no es capaz de provocar trastornos del estado de ánimo, existen muchos genes con vulnerabilidad que participan en conjunto con factores de estrés ambientales para dar lugar a fallas en el procesamiento de información en ciertos circuitos cerebrales. El gen que codifica al transportador de serotonina (SERT) es uno de estos genes vulnerables para la depresión al determinar si la amígdala de una persona reaccionará de manera excesiva a estímulos ambientales peligrosos (4). Es así como podemos decir que el estrés y la depresión se encuentran comúnmente ligados. Eventos estresores de la vida cotidiana pueden precipitar episodios depresivos en sujetos vulnerables (personas con el genotipo s de SERT) (4), y el estrés en la infancia en la forma de abuso y abandono incrementa el riesgo de depresión en etapas más tardías de la vida (Fig. 3) (2). Asimismo, modelos animales han demostrado que la exposición a estrés crónico induce una serie de anormalidades conductuales en roedores que simulan síntomas depresivos como

disminución en la ingesta de sucrosa y en comportamientos de apareamiento (anhedonia), disminución en la motivación y en comportamientos de acicalamiento, y cambios en los patrones de sueño. En décadas recientes, se han encontrado diversas anormalidades en el eje HHA asociadas con una respuesta hiperactiva al estrés en pacientes deprimidos. Algunas de estas alteraciones incluyen hipersecreción de CRH, perturbación en la retroalimentación negativa del eje HHA, glándulas adrenales aumentadas, hipercortisolemia, y una disminución en la supresión de cortisol tras la administración de dexametasona (2).

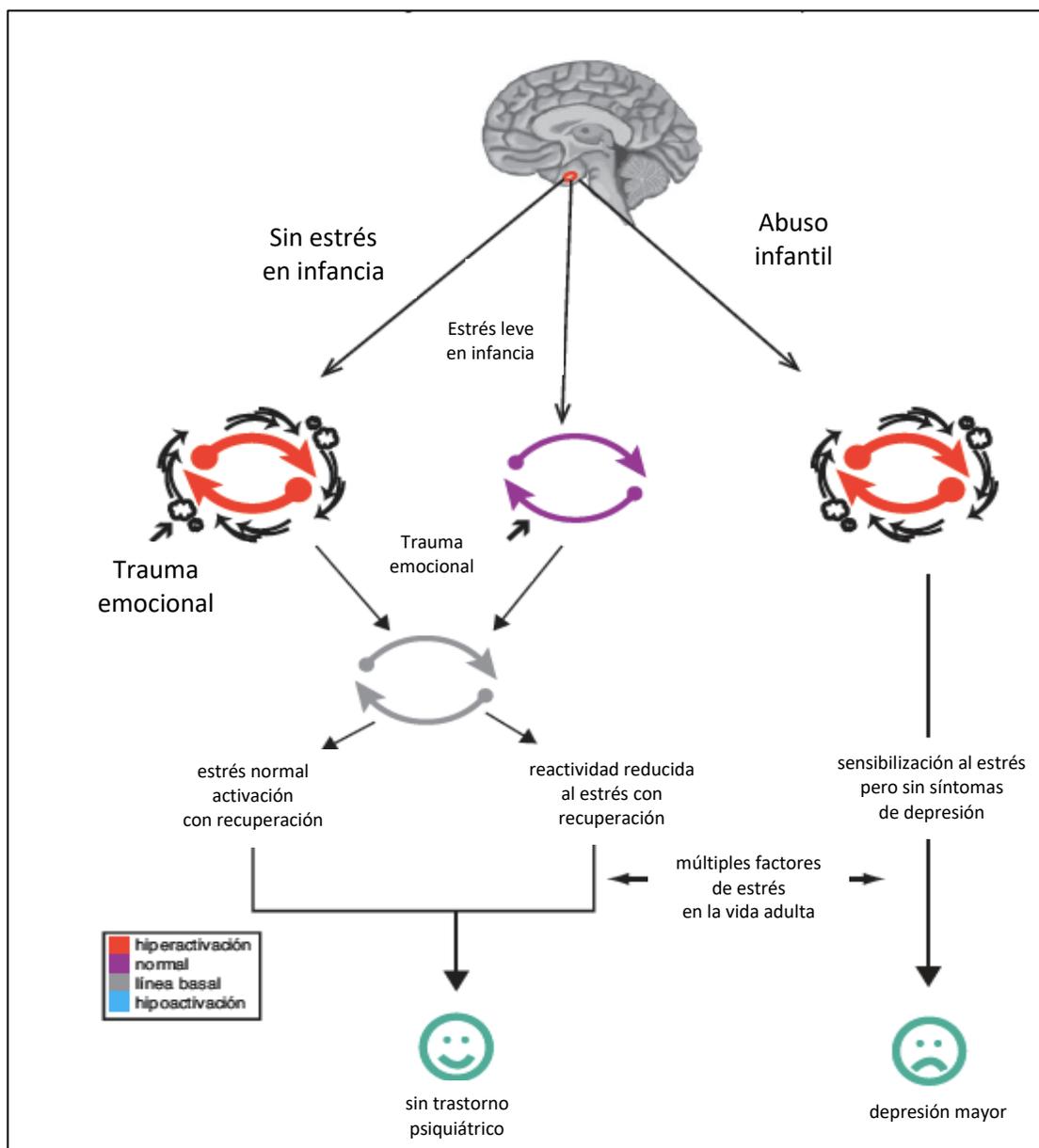


Figura 3. **Progresión desde sensibilización al estrés hasta depresión.** Puede ocurrir que el grado de estrés que uno experimenta durante la infancia afecte sobre el desarrollo de los circuitos y, por tanto, sobre cómo un determinado individuo responde al estrés en la vida adulta. La falta de estrés durante la infancia puede dar lugar a un circuito que presente activación “normal” durante el estrés y que no conlleve un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno psiquiátrico. El estrés leve durante la infancia puede en realidad causar que los circuitos exhiban una reactividad reducida al estrés en la vida adulta y así aportar resistencia a los factores de estrés como adulto. Sin embargo, un estrés sobrepasado y/o crónico derivado de abuso infantil puede dar lugar a circuitos sensibilizados al estrés que podrían resultar activados incluso en ausencia de un factor de estrés. Los individuos con sensibilización al estrés podrían no presentar síntomas fenotípicos, pero podrían tener un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad mental si son expuestos a futuros factores de estrés. (Stephen M. Stahl, 2013).

1.1.2.3. Neuroinflamación y estrés oxidativo

Existe un circuito de retroalimentación positiva entre la depresión y la neuroinflamación (Fig. 4), en el que la inflamación causa depresión y estrés psicológico, los cuales, a su vez, son pro-inflamatorios. Esta relación bidireccional también pone en mayor riesgo a los pacientes deprimidos de padecer enfermedades autoinmunes, a la vez de que se observan mayores índices de depresión en pacientes con enfermedades inflamatorias (2).

La neuroinflamación es una respuesta adaptativa ante la infección que promueve conductas como anhedonia y fatiga con el fin de que un organismo evite la exploración y la reproducción a favor de enfocarse en la recuperación. Sin embargo, condiciones inflamatorias crónicas como el estrés crónico pueden llevar a un comportamiento de enfermedad prolongado desadaptativo. Los pacientes con depresión presentan niveles aumentados de marcadores inflamatorios como IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , CRP y PGE2 (2). Asimismo, durante estados pro-inflamatorios crónicos, las células de la microglia se ven inducidas al subtipo M1 con una actividad fagocítica disminuida resultando en un aclaramiento inefectivo de la proteína beta-amiloide y contribuyendo al estrés oxidativo mediante la expresión incrementada de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (8).

Un gran número de estudios de exposición aguda y crónica al estrés en roedores han reportado un incremento en las citosinas periféricas pro-inflamatorias, además de que la administración sistémica de estas citosinas induce comportamientos tipo depresión en modelos animales, mientras que el tratamiento con fármacos antidepressivos normaliza dichos niveles y conductas (9).

El estrés oxidativo es un componente clave en la depresión. La producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante disfunción mitocondrial pueden subsecuentemente impedir el transporte axonal y la función sináptica en el sistema nervioso central, particularmente en las neuronas hipocámpales. El aumento del estrés oxidativo también es un resultado de la

hiperactividad del eje HHA, observado como una adaptación fisiológica en los pacientes deprimidos ante un aumento de los estresores psicosociales (8).

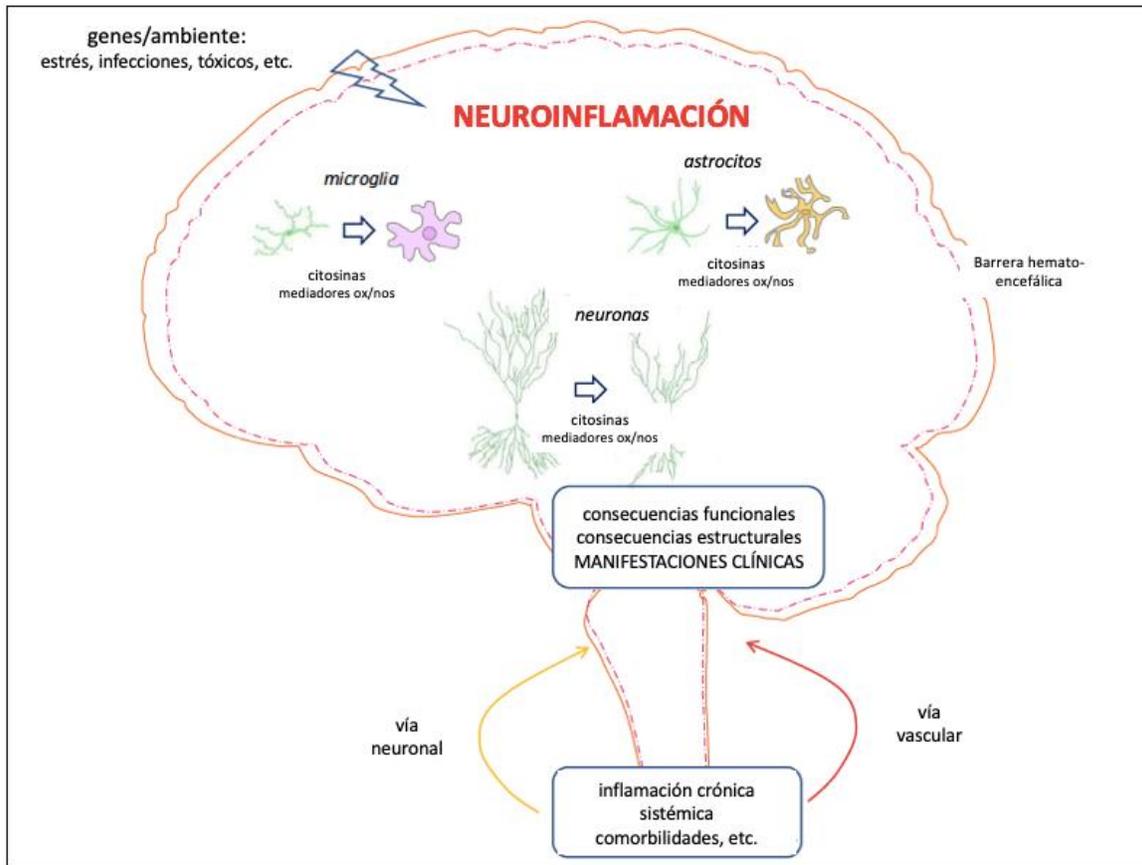


Figura 4. **Factores internos y externos que afectan la neuroinflamación.** Tanto factores externos (genes/ambiente, estrés), como internos (comorbilidades inflamatorias crónicas) pueden influir en la fisiología cerebral a través de órganos sensoriales, o directamente mediante la vía vascular o neural. La neuroinflamación ocurre después de cambios funcionales y estructurales en la microglia (principalmente), astrocitos y neuronas, con mediadores oxidativos y pro-inflamatorios intra e inter-celulares (citosinas, factores de transcripción, enzimas inducibles, etc.), llevando a cambios funcionales (neurotransmisores, receptores y circuitos), estructurales (cambios en volumen en ciertas áreas cerebrales), y finalmente, manifestaciones clínicas de depresión. (Traducido y modificado de Colin R. Martin, et al., 2021).

El mecanismo de acción de algunos antidepresivos incluye la inhibición de algunas citosinas como IL-1 β e IL-6. Aunado a esto, los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT han demostrado mayor impacto sobre la reducción de IL-6 que otros antidepresivos como los medicamentos tricíclicos o los duales (9).

1.1.3. Tratamiento farmacológico actual – Contratiempos

En uno de los estudios clínicos más grandes e importantes, Sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D), se utilizó un diseño controlado aleatorizado para evaluar los principios teóricos y las creencias clínicas que guiaban el manejo de la depresión resistente a tratamiento en término de síntomas, función, satisfacción, carga de efectos secundarios, y utilización de cuidados clínicos, así como estimación de costos. Se compararon varias opciones farmacológicas para aquellos sujetos que no alcanzaron una respuesta satisfactoria a citalopram, un antidepresivo de la clase de inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT. Posterior a recibir citalopram (nivel 1), los participantes sin un beneficio sintomático suficiente fueron aleatorizados a varios tratamientos en el nivel 2, que incluyen tres opciones de cambio (sertralina, bupropión o venlafaxina), y dos opciones potenciadoras del citalopram (bupropion o buspirona). Aquellos en el nivel 2 sin una mejoría sustancial fueron nuevamente aleatorizados a 2 opciones potenciadoras (hormona tiroidea o litio). Los participantes sin una mejoría suficiente en el nivel 3 fueron elegidos para una nueva aleatorización en el nivel 4 con dos opciones de cambio (tranilcipromina o la combinación de venlafaxina y mirtazapina) (2).

A pesar de estos múltiples tratamientos farmacológicos, se observa que solamente alrededor del 30% de los pacientes sometidos a una primera línea de tratamiento (citalopram) mostraron una remisión de sus síntomas utilizando la escala de depresión de Hamilton (NIMH). Cerca del 33% de estos pacientes no alcanzaron la remisión de sus síntomas después de 4 niveles de tratamiento farmacológico, presentando lo que se clasifica como depresión resistente a tratamiento (2).

Asimismo, aunque a lo largo de los años se han realizado diversos refinamientos en estos agentes que han eliminado muchos de sus efectos secundarios más graves como los de los fármacos de primera generación (tricíclicos e inhibidores de la monoamino oxidasa), los fármacos convencionales utilizados en la actualidad aún presentan diversos contratiempos. Generalmente, tardan de 4 a 6

semanas en ejercer su efecto terapéutico además de causar efectos adversos sexuales significativos como disminución del deseo sexual, anorgasmia, y dificultades para la erección y eyaculación, motivo por el cual muchos de los pacientes jóvenes deciden abandonar el tratamiento (10). En años recientes también se ha reportado un síndrome de disfunción sexual post-ISRS, una condición en la que los pacientes continúan teniendo efectos secundarios sexuales a pesar de la suspensión de los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT, impactando de forma negativa la calidad de vida de estos individuos (11). A pesar de que muchos de estos efectos secundarios pueden ser idiosincráticos, gran parte de ellos pueden ser explicados por el mecanismo de acción propio de los fármacos, la mayoría de los cuales actúan predominantemente sobre el sistema monoaminérgico (12).

Al medir la aceptabilidad de los antidepresivos, determinada por la proporción de pacientes que suspenden el tratamiento por cualquier razón, ésta varía dependiendo del agente utilizado (Fig. 5); sin embargo, se mantiene menor al placebo en fármacos como vortioxetina, venlafaxina, desvenlafaxina, duloxetina, fluvoxamina, vilazodona, trazodona, reboxetina, levomilnacipran y clomipramina (Fig. 6) (13). Se estima que alrededor del 28% de los pacientes suspenden los agentes antidepresivos en el primer mes de tratamiento, aumentando esta cifra al 44% de ellos para el tercer mes (12).

De aquí la importancia de identificar nuevos blancos terapéuticos para desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos (2).

□ Efficacy (response rate) ■ Comparison □ Acceptability (dropout rate)

Agom	0-72* (0-55-0-92)	0-80* (0-54-1-15)	0-89* (0-66-1-19)	0-57* (0-42-0-77)	0-62† (0-47-0-82)	0-97* (0-74-1-27)	0-85† (0-68-1-05)	0-69† (0-51-0-97)	0-79* (0-58-1-09)	0-81* (0-61-1-05)	0-70* (0-44-1-14)	0-81* (0-65-1-00)	0-53* (0-36-0-80)	0-86* (0-66-1-13)	0-69* (0-48-0-98)	0-74† (0-58-0-92)	1-24† (0-71-2-19)
0-96* (0-76-1-24)	Amit	1-10† (0-78-1-58)	1-23* (0-94-1-64)	0-79† (0-60-1-05)	0-87† (0-66-1-15)	1-35* (1-05-1-74)	1-18† (0-99-1-42)	0-97† (0-74-1-24)	1-10† (0-84-1-45)	1-12* (0-89-1-42)	0-98‡ (0-62-1-55)	1-12† (0-95-1-34)	0-74† (0-51-1-10)	1-20* (0-97-1-47)	0-96‡ (0-70-1-31)	1-02† (0-83-1-26)	1-72† (1-00-3-05)
0-87† (0-59-1-30)	0-91‡ (0-62-1-31)	Bupr	1-11‡ (0-76-1-67)	0-71† (0-49-1-07)	0-78† (0-53-1-18)	1-23* (0-84-1-80)	1-07‡ (0-76-1-50)	0-87‡ (0-59-1-30)	1-00‡ (0-66-1-49)	1-01† (0-70-1-47)	0-89‡ (0-51-1-54)	1-02‡ (0-73-1-43)	0-67† (0-42-1-08)	1-08‡ (0-75-1-56)	0-87‡ (0-57-1-30)	0-92‡ (0-66-1-30)	1-55† (0-85-2-94)
1-13* (0-88-1-47)	1-18* (0-93-1-49)	1-30† (0-88-1-93)	Cita	0-64† (0-47-0-87)	0-70* (0-51-0-95)	1-09* (0-85-1-42)	0-96* (0-76-1-21)	0-78* (0-57-1-06)	0-89* (0-64-1-23)	0-91† (0-68-1-21)	0-79‡ (0-49-1-32)	0-91* (0-71-1-17)	0-60† (0-41-0-87)	0-97‡ (0-74-1-25)	0-77* (0-53-1-13)	0-83† (0-64-1-07)	1-40† (0-78-2-48)
1-20* (0-91-1-59)	1-24† (0-98-1-58)	1-37† (0-93-2-04)	1-06* (0-82-1-38)	Clom	1-10† (0-80-1-51)	1-71* (1-27-2-29)	1-49† (1-16-1-90)	1-22† (0-88-1-67)	1-40† (1-00-1-92)	1-41* (1-05-1-91)	1-24‡ (0-76-2-00)	1-42† (1-12-1-79)	0-94‡ (0-62-1-41)	1-51† (1-15-1-96)	1-21† (0-83-1-73)	1-29† (0-99-1-67)	2-20† (1-22-3-90)
1-06* (0-82-1-37)	1-10† (0-84-1-42)	1-21† (0-81-1-81)	0-93* (0-71-1-22)	0-88† (0-66-1-18)	Dulo	1-56* (1-10-2-01)	1-32* (1-06-1-73)	1-12* (0-80-1-53)	1-28† (0-91-1-75)	1-30* (0-96-1-72)	1-13‡ (0-69-1-83)	1-30* (1-02-1-63)	0-86‡ (0-57-1-29)	1-38† (1-04-1-80)	1-10† (0-76-1-59)	1-18‡ (0-92-1-49)	1-99† (1-13-3-52)
0-90* (0-71-1-14)	0-93* (0-74-1-17)	1-03† (0-70-1-51)	0-79* (0-65-0-97)	0-75* (0-58-0-97)	0-85* (0-67-1-08)	Escl	0-87* (0-70-1-09)	0-71* (0-53-0-96)	0-81* (0-60-1-11)	0-83* (0-63-1-08)	0-72† (0-45-1-18)	0-83* (0-67-1-03)	0-55* (0-37-0-81)	0-88* (0-69-1-12)	0-70* (0-49-1-00)	0-75* (0-60-0-94)	1-27‡ (0-73-2-25)
1-20* (0-99-1-48)	1-25† (1-06-1-48)	1-38† (0-97-1-97)	1-06* (0-87-1-29)	1-00† (0-81-1-24)	1-14* (0-91-1-44)	1-34* (1-11-1-61)	Fluo	0-82* (0-64-1-04)	0-94* (0-72-1-20)	0-95* (0-77-1-16)	0-83† (0-54-1-30)	0-95* (0-83-1-09)	0-63† (0-44-0-90)	1-01† (0-84-1-21)	0-81* (0-60-1-09)	0-87† (0-74-1-01)	1-46† (0-85-2-53)
1-20* (0-91-1-61)	1-25† (0-99-1-59)	1-38† (0-93-2-07)	1-06* (0-82-1-39)	1-01† (0-76-1-32)	1-14† (0-85-1-54)	1-34* (1-03-1-75)	1-00* (0-80-1-25)	Fluv	1-14† (0-84-1-56)	1-16* (0-89-1-52)	1-01‡ (0-62-1-71)	1-16* (0-90-1-49)	0-77† (0-51-1-17)	1-23* (0-94-1-63)	0-99‡ (0-69-1-42)	1-06* (0-80-1-38)	1-78‡ (1-00-3-24)
1-07* (0-80-1-44)	1-11† (0-86-1-43)	1-23† (0-81-1-85)	0-94† (0-71-1-26)	0-89† (0-67-1-19)	1-01† (0-74-1-38)	1-19* (0-90-1-58)	0-89* (0-70-1-13)	0-89† (0-67-1-17)	Miin	1-02† (0-75-1-37)	0-88‡ (0-54-1-44)	1-02‡ (0-80-1-31)	0-67† (0-45-1-03)	1-08* (0-82-1-44)	0-86* (0-60-1-25)	0-93* (0-71-1-22)	1-56† (0-89-2-84)
0-93* (0-72-1-21)	0-97* (0-77-1-21)	1-07† (0-73-1-57)	0-82* (0-65-1-05)	0-78* (0-60-1-01)	0-88* (0-67-1-16)	1-04* (0-82-1-32)	0-78* (0-64-0-94)	0-78* (0-60-0-99)	0-87* (0-66-1-15)	Mirt	0-87† (0-55-1-41)	1-00* (0-82-1-23)	0-66* (0-45-0-99)	1-06* (0-84-1-35)	0-85* (0-62-1-18)	0-91* (0-73-1-13)	1-53† (0-89-2-72)
1-15† (0-76-1-76)	1-19† (0-80-1-78)	1-32† (0-80-2-20)	1-01† (0-67-1-54)	0-96† (0-63-1-45)	1-09† (0-71-1-68)	1-28* (0-86-1-94)	0-96† (0-66-1-40)	0-95† (0-63-1-46)	1-07† (0-70-1-67)	1-23* (0-82-1-86)	Nefa	1-15‡ (0-74-1-78)	0-75‡ (0-43-1-32)	1-23† (0-77-1-90)	0-98‡ (0-57-1-64)	1-04‡ (0-66-1-65)	1-76† (0-90-3-56)
1-01* (0-82-1-24)	1-05† (0-89-1-23)	1-16† (0-81-1-64)	0-89* (0-72-1-09)	0-84† (0-68-1-03)	0-95† (0-76-1-19)	1-12* (0-93-1-35)	0-84* (0-73-0-95)	0-84* (0-67-1-04)	0-94† (0-75-1-18)	1-08* (0-89-1-30)	0-88‡ (0-60-1-27)	Paro	0-66† (0-46-0-94)	1-06* (0-88-1-28)	0-85† (0-63-1-15)	0-91* (0-77-1-07)	1-53† (0-90-2-66)
1-44* (1-02-2-04)	1-50† (1-07-2-07)	1-65† (1-05-2-60)	1-27† (0-92-1-75)	1-20† (0-84-1-70)	1-36† (0-95-1-95)	1-60* (1-14-2-23)	1-20† (0-88-1-62)	1-20† (0-83-1-71)	1-35† (0-92-1-95)	1-54* (1-09-2-17)	1-25† (0-77-2-01)	1-43† (1-05-1-94)	Rebo	1-61† (1-09-2-34)	1-29† (0-81-2-01)	1-38† (0-94-1-99)	2-32† (1-24-4-41)
1-07* (0-85-1-37)	1-11* (0-92-1-35)	1-23† (0-85-1-79)	0-95† (0-76-1-18)	0-90† (0-71-1-13)	1-02† (0-79-1-32)	1-20* (0-97-1-48)	0-89‡ (0-76-1-05)	0-89† (0-70-1-13)	1-00† (0-77-1-30)	1-15* (0-93-1-43)	0-93‡ (0-63-1-37)	1-07* (0-90-1-26)	0-75† (0-54-1-04)	Sert	0-80* (0-58-1-11)	0-86* (0-70-1-05)	1-45† (0-84-2-54)
1-36* (0-99-1-87)	1-41† (1-06-1-86)	1-56† (1-04-2-31)	1-20* (0-88-1-63)	1-13† (0-83-1-54)	1-28† (0-92-1-79)	1-51* (1-12-2-04)	1-13† (0-87-1-46)	1-13† (0-82-1-55)	1-27* (0-91-1-76)	1-45* (1-09-1-94)	1-18‡ (0-75-1-84)	1-35* (1-04-1-75)	0-94‡ (0-64-1-39)	1-26† (0-95-1-67)	Traz	1-07‡ (0-77-1-47)	1-80† (0-98-3-38)
1-01* (0-82-1-26)	1-05† (0-87-1-27)	1-16† (0-82-1-65)	0-90† (0-72-1-10)	0-85† (0-67-1-06)	0-96† (0-77-1-21)	1-13* (0-93-1-37)	0-84† (0-73-0-97)	0-84* (0-66-1-07)	0-95* (0-73-1-23)	1-09* (0-89-1-33)	0-88‡ (0-59-1-30)	1-01† (0-86-1-17)	0-70† (0-51-0-97)	0-94* (0-78-1-13)	0-75† (0-57-0-98)	Venl	1-69† (1-01-2-86)
0-73‡ (0-42-1-26)	0-76‡ (0-44-1-29)	0-83‡ (0-45-1-54)	0-64† (0-37-1-11)	0-61† (0-35-1-05)	0-69† (0-40-1-20)	0-81‡ (0-47-1-39)	0-60† (0-36-1-02)	0-60† (0-34-1-05)	0-68† (0-39-1-20)	0-78‡ (0-45-1-34)	0-63† (0-33-1-19)	0-72† (0-43-1-22)	0-51† (0-28-0-92)	0-68† (0-39-1-16)	0-54† (0-30-0-95)	0-72† (0-43-1-19)	Vort

Figura 5. Comparación frente a frente de eficacia y tolerabilidad entre 21 antidepresivos. (Andrea Cipriani, 2018).

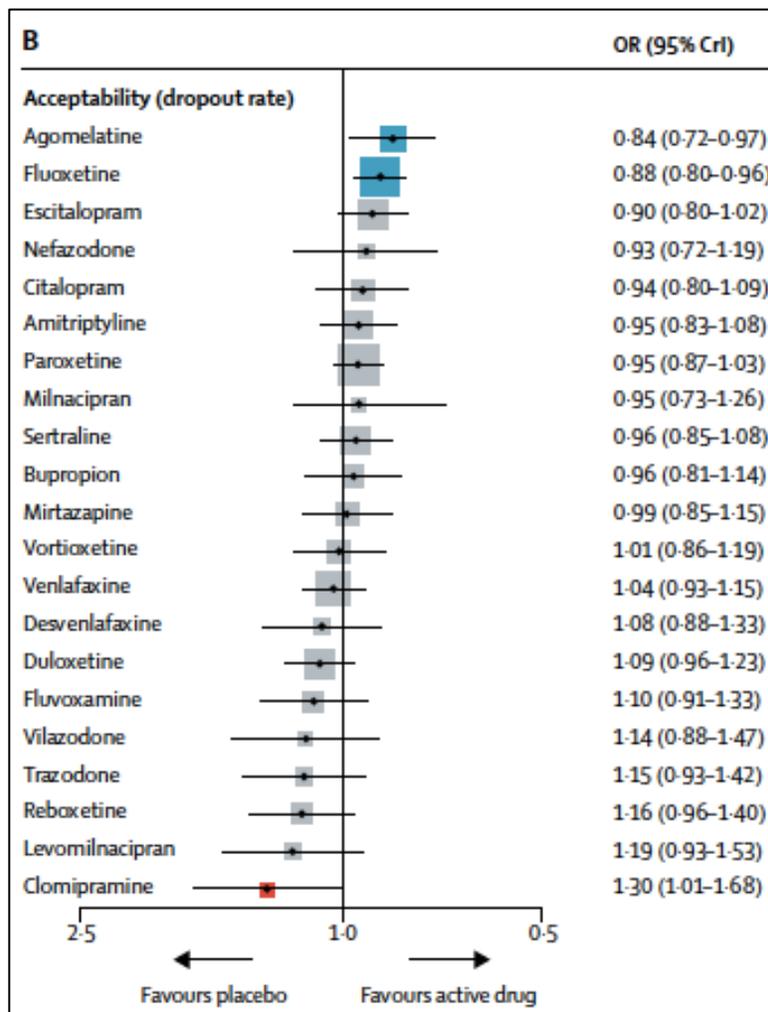


Figura 6. Diagrama de bosque de las redes de meta-análisis de todos los estudios para aceptabilidad. Los antidepresivos fueron comparados contra placebo. (Andrea Cipriani, 2018).

1.2. Fitofármacos

Las propiedades medicinales de las plantas han sido estudiadas desde tiempos antiguos debido a sus efectos terapéuticos en diversos padecimientos. A pesar de que la medicina alopática domina el mercado actual, la fitomedicina (Fig. 7) se encuentra ganando popularidad nuevamente debido a su efectividad y costo. Los fitofármacos utilizan plantas o partes de ellas con propiedades medicinales conocidas en el tratamiento de varias enfermedades, así como para la mejoría de la salud en general. Uno de los principales beneficios de los fitofármacos es su perfil bajo de efectos secundarios al utilizarlos a las dosis correctas, además de su contribución en minimizar los efectos secundarios provocados por medicamentos

convencionales (14). Los fitofármacos continúan siendo una alternativa estratégica en el estudio farmacológico con un enfoque en la medicina de primer nivel.

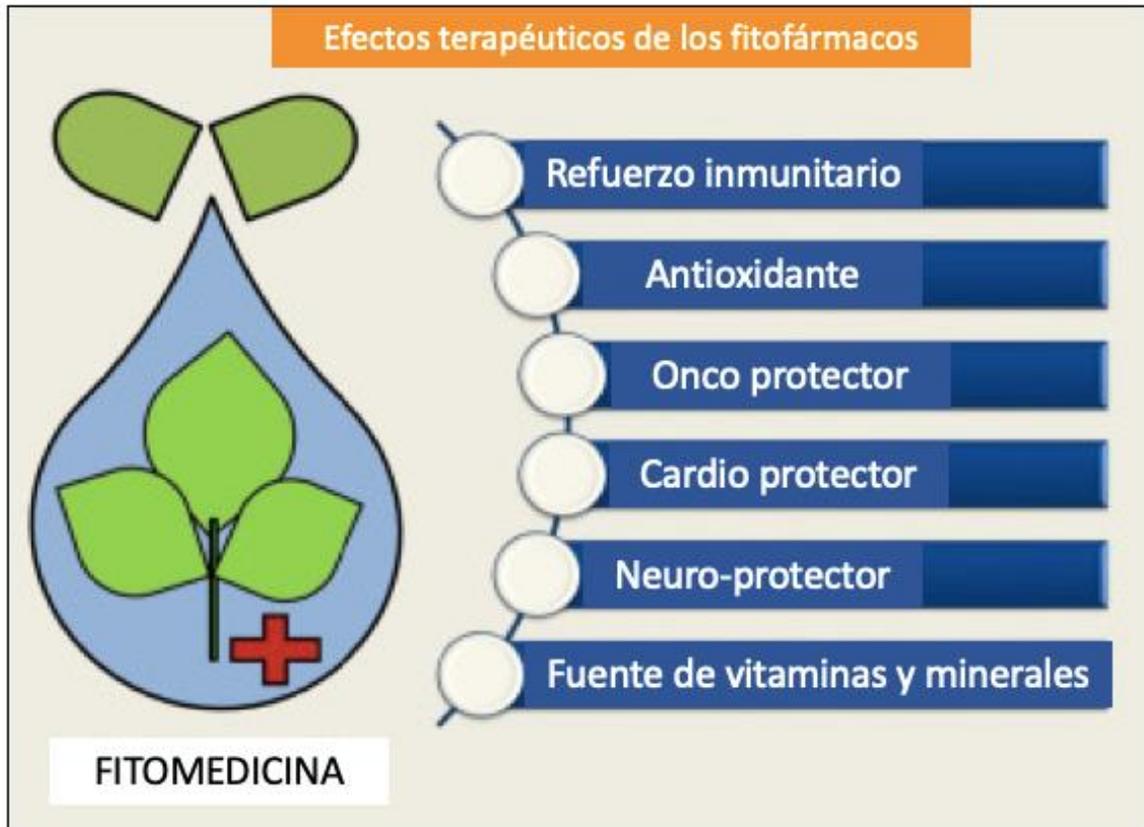


Figura 7. *Efectos terapéuticos de los fitofármacos.* Algunos de los efectos terapéuticos conocidos de los fitofármacos incluyen potenciador inmunitario, antioxidante, cáncer-protector, cardioprotector, neuroprotector, y fuente de vitaminas y minerales. (Traducido y modificado de Tanima Bhattacharya, et al., 2021).

Diversos estudios han reportado que los anti-oxidantes naturales encontrados en los fitofármacos pueden prevenir la sobreproducción de radicales libres y, por lo tanto, controlar el inicio y prevenir la exacerbación de distintos tipos de padecimientos causados por estrés oxidativo y estresores derivados del REDOX, al suprimir la degradación mediada por estos productos. La producción de estos compuestos bioquímicos es el resultado del metabolismo normal de las plantas. Sus propiedades terapéuticas usualmente se deben a combinaciones de metabolitos secundarios encontrados en un número más pequeño de hierbas o específicamente en ciertos géneros o especies. Entre estos fitoquímicos considerados valiosos como

medicamentos derivados de hierbas se encuentran los alcaloides, los fenoles, los terpenoides, los glicósidos, las quinonas y naptokinonas, los poliacetilenos, los flavonoides, las alcaloides y polienos, los aminoácidos no protéicos, y los péptidos y las lectinas, entre otros (15).

1.2.1. *Punica granatum*

Punica granatum, comúnmente conocida como granada, es una de las plantas medicinales utilizada para un sinnúmero de padecimientos y enfermedades. Es una especie perteneciente a la familia Lythraceae, cultivada inicialmente en la región mediterránea y de Asia central pero que posteriormente se adaptó a regiones con climas templados y tropicales tanto en Europa como en América (16). Se han encontrado numerosas acciones farmacológicas como antidiabética, antitumoral, antiinflamatoria, antibacterial, antifúngica, y antimalaria entre otras (17). Mientras que su fruto, corteza y raíces son principalmente utilizadas para tratar enfermedades infecciosas y por parásitos, sus hojas están indicadas en el tratamiento de faringitis, aftas e infecciones de vías urinarias (16).

Hasta el momento se han aislado diversos componentes bioactivos como alcaloides, antocianinas, taninos, flavonoides, fenoles, proantocianinas, esteroides, terpenos, terpenoides, xantonoides, ácidos grasos, ácidos orgánicos, lignanos, sacáridos y vitamina C (17).

Debido a su gran cantidad de componentes fenólicos, esta especie presenta una actividad antioxidante y de eliminación de radicales libres importantes, con potencial para el tratamiento de enfermedades crónicas e inflamatorias (16).

Sus mecanismos de acción principalmente involucran a las vías de señalización del factor nuclear derivado de eritroide 2 similar al 2 (Nrf2), factor nuclear kappa B (NF- κ B), y proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (17). En estudios *in vivo*, se ha demostrado que actúa principalmente al inhibir la generación de nitritos, especies reactivas de oxígeno y TNF- α , sustancias oxidantes que son producidas por el organismo durante los procesos inflamatorios. Asimismo,

el extracto de sus hojas ha demostrado actividad anti-isquémica en daño cerebral inducido en ratas. Dentro de sus propiedades en el sistema nervioso central, el extracto metanólico de las hojas de *P. granatum* ha exhibido actividad antiepiléptica aumentando los niveles cerebrales de GABA (16).

Los elagitaninos extraídos de las hojas de la planta, nombrados granatina A y granatina B, suprimen la expresión de la enzima mPGES-1, responsable de la producción de PGE2. Aunado a esto, los elagitaninos también regulan la producción de óxido nítrico, disminuyen la expresión de genes responsables por la producción de proteínas inflamatorias, e inhiben la liberación de citosinas pro inflamatorias. (Fig. 8) (16).

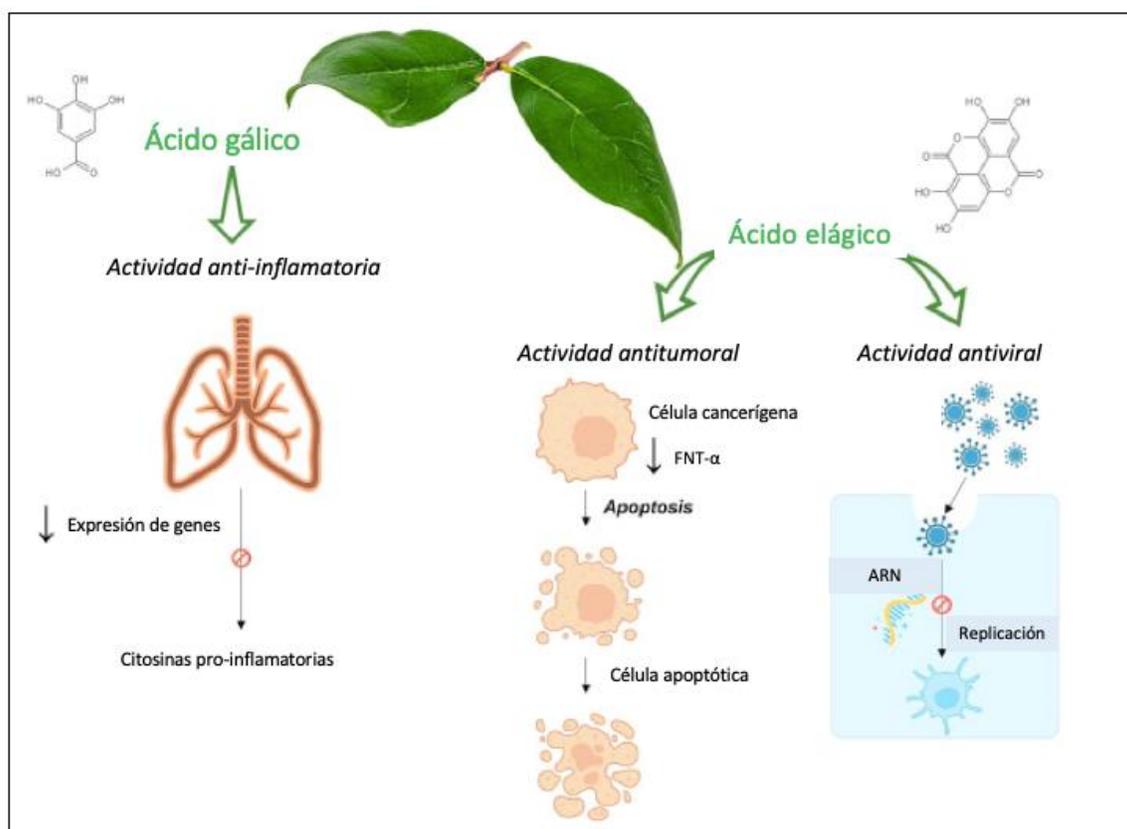


Figura 8. Principales actividades de los compuestos químicos extraídos de las hojas de *P. granatum*. Propiedades anti-inflamatorias, antitumorales y antivirales. (Traducido y modificado de español de Janaina Carla Barbosa Machado, et al., 2023).

1.2.1.1. *Punica granatum* y depresión

En años recientes se ha reconocido una relación importante entre la dieta y enfermedades neuropsiquiátricas como la depresión. Los cambios conductuales observados en modelos animales de depresión tras la administración de *P. granatum*, sugieren una actividad antidepresiva significativa (18).

A pesar de que los mecanismos exactos apenas se están dilucidando, se ha encontrado que la actividad antidepresiva registrada en las pruebas de suspensión de cola y nado forzado es similar a la de fármacos antidepresivos como la fluoxetina y la imipramina, y que se puede observar especialmente con dosis moderadas a altas (18,19).

En investigaciones previas realizadas en este mismo laboratorio, se encontró que el mecanismo de acción de los efectos antidepresivos de *P. granatum* involucran la participación del sistema serotoninérgico a través del receptor 5-HT_{1A}, así como la activación de los receptores de estrógeno beta (20).

Otros de los efectos de *P. granatum* sobre el cerebro que pudieran explicar este efecto antidepresivo nuevamente están relacionados con los efectos neuroprotectores derivados de su actividad antioxidante y anti-inflamatoria, con sus propiedades quelantes, y con su habilidad de activar varias vías de señalización e influir en el daño mitocondrial, regulando así la autofagia, apoptosis y la neurotransmisión (21).

Los elagitaninos presentes en la granada afectan los niveles de diversos neurotransmisores. Aunque se ha observado que este efecto no es universal y que depende del método experimental y del estrés inducido en el sistema nervioso central, las conductas tipo depresión observadas en ratones mejoran con la administración de ácido elágico; resultado que parece depender de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico (21).

A pesar de estos hallazgos, la mayoría de los estudios coinciden en que se requiere de mayor investigación respecto a estos potenciales mecanismos farmacológicos.

1.3. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gasotransmisor, es decir, una molécula gaseosa sintetizada endógenamente cuyo funcionamiento no depende de un receptor en particular, que controla diversas funciones vitales como el tono vascular, la neurotransmisión, la transcripción genética, la traducción de ARNm, la modificación post-traducciona de proteínas, así como diversos procesos inflamatorios e inmunológicos (Fig. 9) (22,23). Recientemente, también se ha reportado que el óxido nítrico participa como neuromodulador en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (eje HHA) (24).

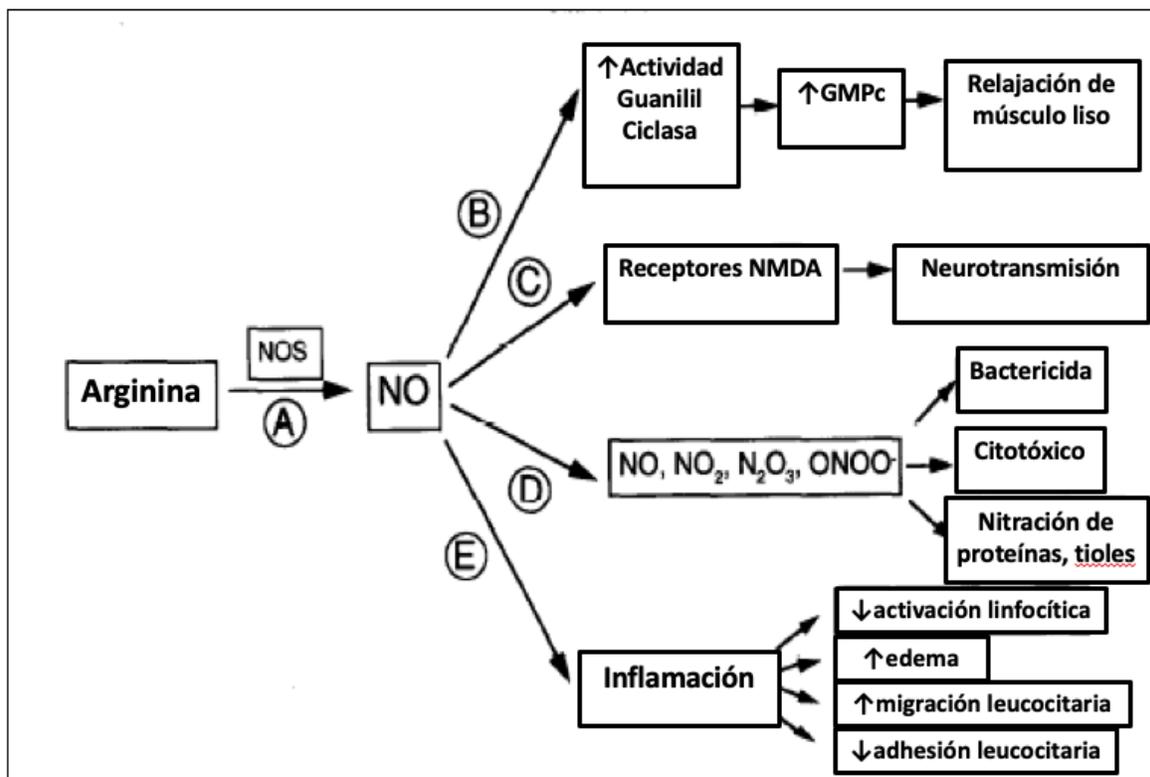


Figura 9. **Apreciación global de la formación y algunas funciones del óxido nítrico (NO).** (A) El óxido nítrico se forma a partir de la partición de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). (B) El NO puede estimular a la guanilil ciclasa llevando a una síntesis incrementada de GMPc, el cual a su vez relaja el músculo liso, como el músculo liso vascular,

produciendo un decremento en la presión arterial. (C) El NO puede actuar como un neurotransmisor estimulando los receptores NMDA. (D) El NO y/o sus óxidos [como el NO₂ (dióxido de nitrógeno), N₂O₂ (trióxido de dinitrógeno), y ONOO⁻ (peroxinitrito)], pueden producir efectos citotóxicos y bactericidas. Asimismo, el NO y/o sus óxidos pueden nitrosar proteínas o tioles, alterando las funciones de las proteínas. (E) El NO puede modular la inflamación, produciendo efectos tanto pro como anti-inflamatorios, como disminución en la activación linfocitaria, o incremento en la migración de leucocitos. (Traducido y modificado de Richard A. Robbins, 1997).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por 3 isoformas (Fig. 10) (22) de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): NOS “n” neuronal (o NOS I), NOS “i” inducible (o NOS II), y NOS “e” endotelial (o NOS III). Tanto la nNOS como la eNOS son enzimas de baja potencia cuya producción pulsátil y de corta duración de óxido nítrico depende mayormente de calcio. La primera se encuentra expresada en neuronas y otras células del sistema nervioso, mientras que la sintasa de NO endotelial se expresa en células endoteliales y en algunos otros pocos tipos celulares. Por el contrario, la sintasa de NO inducible, es una enzima de alta potencia con una producción continua e independiente de calcio y cuya expresión puede ser inducida por citosinas y otros agentes en casi cualquier tipo celular (25). Asimismo, existen varios inhibidores de la óxido nítrico sintasa que se utilizan actualmente de manera experimental como la NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (26).

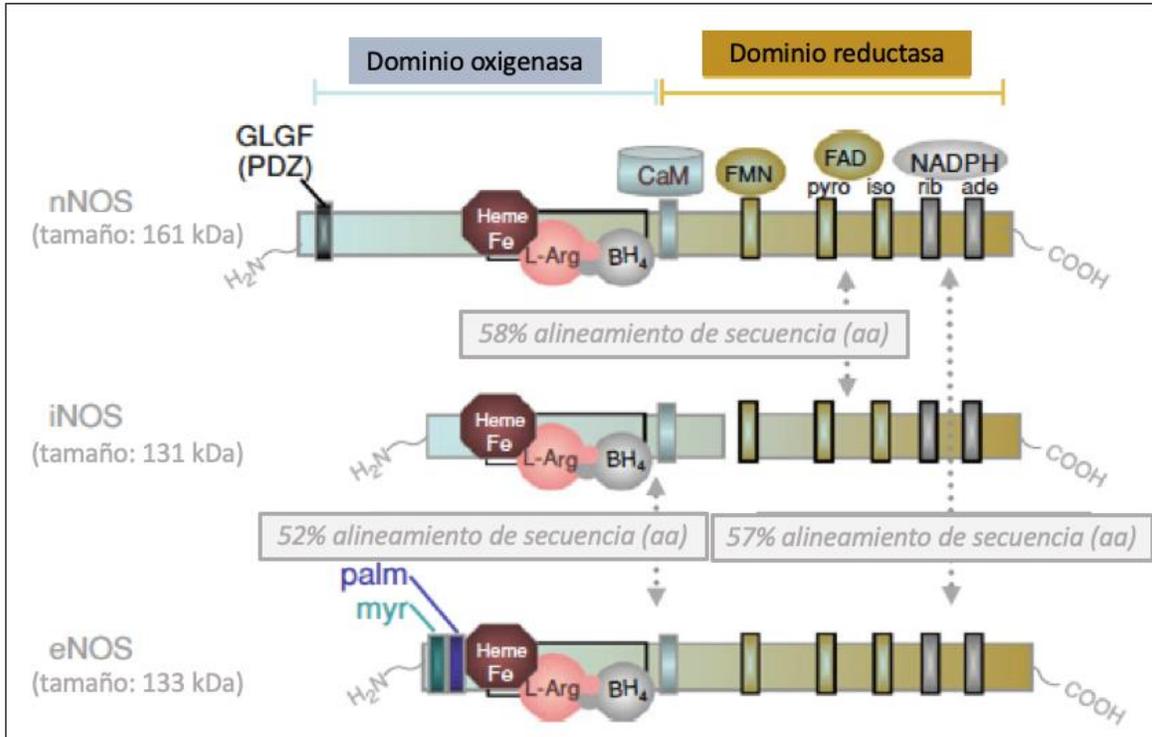


Figura 10. Diagrama esquemático de la relación espacial entre las 3 isoformas de la sintasa de óxido nítrico (NOS). (Traducido y modificado de Lisa Gitleman, 2014).

1.3.1. Óxido nítrico y neuroinflamación

El estrés psicofisiológico se ha asociado a una activación microglial extensa precipitada por la liberación aumentada de corticoesterona, noradrenalina y adrenalina. La liberación consecutiva de citosinas proinflamatorias debido a la activación microglial, lleva a la activación directa de iNOS glial o astrocítica y a un incremento en la síntesis de óxido nítrico desde la L-arginina. Una vez inducida, iNOS facilita la producción masiva de NO por periodos prolongados de tiempo (hasta que exista una depleción del sustrato) (7).

La vía del óxido nítrico en el hipocampo se encuentra involucrada en la respuesta biológica al estrés con consecuencias negativas tanto a las células como a la retroalimentación negativa del eje HHA. Los genes de esta vía, *NOS1AP* y *NOS1*, desempeñan un papel importante en esta respuesta al estrés y se han

encontrado diversos polimorfismos asociados con el desarrollo de ansiedad y depresión (27).

De un modo similar, la relación entre la liberación de nNOS y componentes del eje HHA ha sido demostrada por varios investigadores. La sintasa de óxido nítrico neuronal se encuentra presente en el hipocampo, hipotálamo, hipófisis, y glándulas adrenales, sugiriendo una colonización en el eje HHA. Algunos estudios muestran la regulación transcripcional de nNOS por glucocorticoides en el hipocampo, implicando a nNOS en la patogénesis del estrés y sus comorbilidades. Otra hipótesis sugiere que la activación del eje HHA por estímulos estresores lleva a una liberación aumentada de corticoesterona, y que esta corticoesterona potencia directamente la activación de nNOS vía receptores post-sinápticos para mineralocorticoides (7).

Sin embargo, es importante recalcar que las investigaciones muestran resultados contradictorios o ambiguos (Tabla 1) (26) en cuanto a la relación entre el óxido nítrico y la aparición de trastornos neuropsiquiátricos como la ansiedad. La administración oral aguda (4 días) de L-arginina y L-lisina, precursores del óxido nítrico, redujo la ansiedad en ratas macho sometidas a estrés por inmovilidad, mientras que los niveles de corticoesterona en plasma posterior a la prueba de laberinto elevado en cruz también se encontraron significativamente disminuidos. Por otro lado, ratones tratados con L-arginina no mostraron ninguna alteración conductual en la prueba de laberinto elevado en cruz, pero la administración de este aminoácido con sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5, causó efectos ansiogénicos significativos, probablemente a través de la activación de la vía de NO-GMPc (26).

Tabla 1. Resumen de los principales estudios que abordan la relación entre los distintos gasotransmisores y la ansiedad. (Traducido y modificado de Artur Palasz, 2021).

Sustancia	Dosis	Ruta	Especie	Efecto
Precursor de NO				
L-Arg	200 mg/kg diario	v.o. por 4 días	Rata	Ansiolítico
L-Arg	a.l. por 10 días	Dieta rica en Arg/Lys	Puerco	Ansiolítico
L-Arg	2.6 g/día	v.o. por 1 semana	Humano	Ansiolítico
L-Arg	1, 5 y 10 mcg/rata	Inyección intra amigdalina	Rata	Ansiolítico
L-Arg	3 g/día	v.o. por 10 días	Humano	Ansiolítico
L-Arg	0.4, 0.8 mcg/ratón	Inyección intra hipocampal	Ratón	Anxiogénico
L-Arg + Sildenafil	200 + 0.5-10 mg/kg	Aguda, i.p.	Rata	Ansiogénico
Donadores de NO				
Molsidomina	1,2,4 mg/kg	Aguda, i.ip.	Rata	Ansiolítico
SNP	1, 3 mg/kg	Aguda, i.p.	Rata	Ansiolítico a 1 mg/kg
SIN-1	0.1, 0.3, 1 mg/ratón	Aguda, i.c.v.	Ratón	Ansiolítico a 0.3, 1 mg/ratón
SNP	0.1, 0.3 y 1 mg/kg	i.p. por 5 días	Rata	Ansiolítico
NOC-9	18.7, 37.5 o 75 nmol	Inyección intra núcleo del lecho de la estría terminal	Ratón	Ansiogénico
SNP	9.3, 18.7 o 37.5 nmol	Inyección intra CPF	Ratón	Ansiogénico
SNP	1, 2 y 3 mg/kg	Aguda, i.p.	Ratón	Ansiogénico a 3 mg/kg
Inhibidores de NOS				
Aminoguanidina	50, 100, 150 mg/kg	i.p. por 5 semanas	Rata	Ansiolítico
L-NAME	10 mg/kg	i.p. aguda o por 15 días	Rata	Ansiolítico
L-NAME/7-NI	50-200 y 5-10 nmol	Inyección intra amigdalina	Rata	Ansiolítico
L-NAME	200 nmol	Inyección intra sustancia gris periacueductal	Rata	Ansiolítico
L-NAME/7-NI	10 mg/kg	Aguda, i.p.	Rata	Ansiolítico
NPLA	0.04 nmol	Inyección intra CPF medial	Rata	Ansiolítico
L-NOARG	20 y 40 mg/kg	Aguda, i.p.	Ratón	Ansiolítico
7-NI	20-120 mg/kg	Aguda, i.p.	Ratón	Ansiolítico
L-NAME	10, 25 y 50 mg/kg	Aguda, s.c.	Ratón	Ansiogénico
L-NOARG	10 mg/kg	Aguda, s.c.	Ratón	Ansiogénico
L-NOARG	10 mg/kg	Aguda, s.c.	Ratón	Ansiogénico
L-NOARG	30-120 mg/kg	Aguda, i.p.	Rata	Ansiogénico
L-NOARG	0.5, 1, 2 o 4 mcg/mcl	Intra hipocampal e intra amigdalina	Rata	Ansiogénico
L-NAME	20 y 40 mg/kg	Aguda, i.p.	Rata	Ansiogénico
L-NAME	40 ng/animal	Inyección intra hipocampal	Rata	Ansiogénico

De forma similar, otros estudios han demostrado que la inhibición de la óxido nítrico sintasa, con una subsecuente disminución en la concentración de GMPc, puede llegar a producir efectos similares a los antidepresivos, al menos bajo ciertas condiciones, reportados por una disminución en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (1). Asimismo los inhibidores específicos de NOS como *N*^G-nitro-L-arginina (L-NOArg) bloquean la liberación de CRH y ACTH en cultivos celulares in vitro de hipotálamo e hipófisis anterior de ratas, sugiriendo que la secreción de CRH y ACTH pueden estar mediadas por la inducción de NOS (24).

1.3.2. Óxido nítrico y depresión

A pesar de su vida media sumamente corta, el NO modula varios sistemas de neurotransmisores (noradrenalina, 5-HT, dopamina y glutamato), poseyendo un rol dual en la neurogénesis de la depresión. De la misma forma, posee una actividad moduladora sobre la actividad de varios antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (28). Adicionalmente, la activación de receptores NMDA estimula la producción cerebral de NO y la vía de señalización NO-GMPc se ha propuesto como un blanco interesante para los trastornos del estado de ánimo (29).

Las isoformas neuronal y endotelial de la sintasa de NO, expresadas en el cerebro, son inducidas bajo ciertas circunstancias estresantes, y la isoforma neuronal se ha encontrado en muchas áreas cerebrales relacionadas con el estrés y la depresión (hipocampo, hipotálamo, núcleo del rafé dorsal y *locus coeruleus*) (28). Los inhibidores de las NOS poseen efectos similares a los antidepresivos en roedores, mediando igualmente las propiedades antidepresivas de agentes efectivos (29). El inhibidor no selectivo, L-NAME, y el inhibidor selectivo de la sintasa de NO neuronal, 7-nitroindazol (7-NI), reducen el periodo de inmovilidad en la prueba de nado forzado y aumentan los niveles extracelulares de serotonina y dopamina en el hipocampo ventral de ratas (28).

La inhibición de la sintasa de óxido nítrico inducible por aminoguanidina suprime las conductas tipo depresión en un modelo estrés crónico inesperado de intensidad

moderada percibido por una disminución en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (30). Adicionalmente, se ha observado que la aminoguanidina protege al cerebro del daño por inflamación y oxidación, mejorando las conductas tipo depresión y ansiedad en un modelo de inducción crónica con lipopolisacárido (31).

Asimismo, la atenuación y/o disminución de los niveles de óxido nítrico ejercen efectos neuroprotectores mientras que niveles aumentados tanto de óxido nítrico como de sus metabolitos en plasma se han observado en personas con depresión y pacientes suicidas (28). La gravedad del retraso psicomotor observado en un grupo de éstos pacientes se correlacionó positivamente con los niveles séricos de óxido nítrico (32).

No obstante, la participación del óxido nítrico en la patogénesis de la depresión continúa siendo controversial debido a que, por otro lado, también se han encontrado niveles significativamente disminuidos de nNOS en pacientes con depresión y a que se ha observado que el minacipran, un inhibidor de la recaptura de serotonina y noradrenalina, puede aumentar los niveles de NO en estos pacientes (28).

1.4. *Punica granatum* y su relación con el óxido nítrico

Esta fruta con un alto contenido fenólico ha mostrado potencial inhibitorio en la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 LPS-inducidos. Algunos de sus componentes antioxidantes y anti-inflamatorios activos como la pulicalagina, punicalina, estrictina A, y granatina B, que pertenecen a las taninas hidrolizables, mostraron inhibición en la producción de óxido nítrico y en la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Fig.11) en estas células (33).

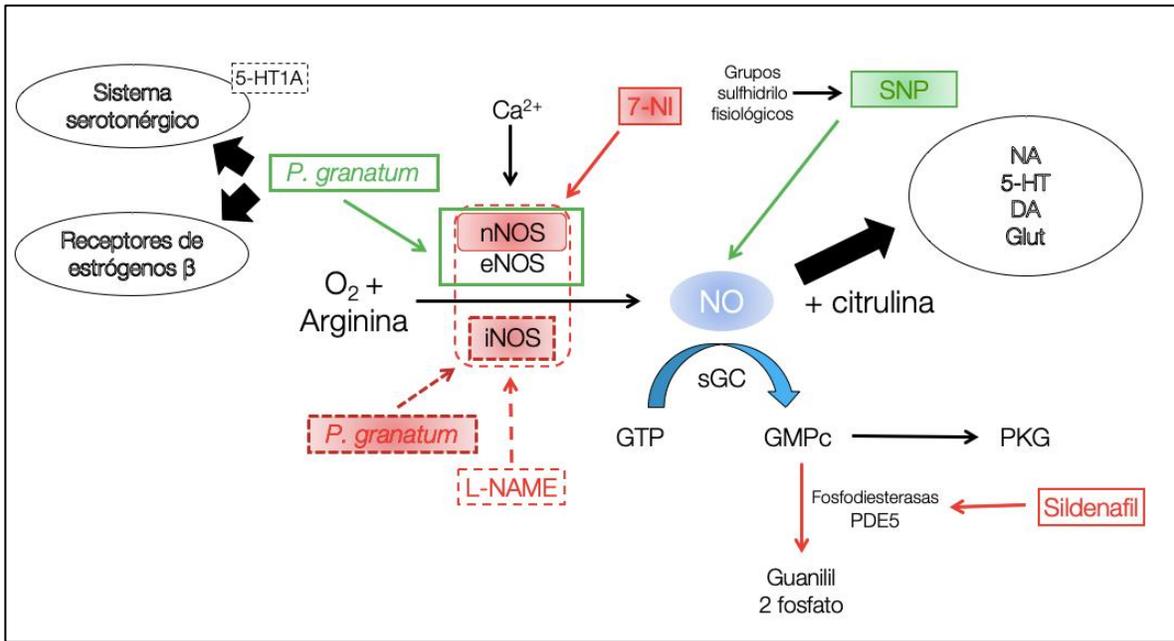


Figura 11. Vía L-arginina – óxido nítrico – GMPc. Relación entre Punica granatum y la vía del óxido nítrico.

En enfermedades cardiovasculares, los polifenoles de origen vegetal son una fuente de antioxidantes utilizados favorablemente para eliminar los efectos dañinos de la isquemia y la reperfusión. El ácido elálgico, la pulicalagina y el ácido gálico son fuertes antioxidantes fenólicos encontrados en la granada con efectos cardioprotectores que involucran en parte al óxido nítrico. No obstante, se demostró en un estudio que estas propiedades anti-arritmicas y protectoras de la granada, no se bloquean por completo al introducir un inhibidor de óxido nítrico como L-NAME, por lo que otros mecanismos también pudieran estar involucrados (34).

Asimismo, estudios inmunohistoquímicos en células del miocardio han demostrado que *P. granatum* provoca un aumento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Fig.11), con regulación a la alza de mecanismos antioxidantes e inhibición de la apoptosis mediada por óxido nítrico, específicamente tras infarto agudo al miocardio (35).

Estas propiedades antioxidantes de *P. granatum* también han sido estudiadas en cerebros de ratas en donde se ha encontrado un aumento en la

mayor parte de los parámetros antioxidantes con una reducción en el peróxido de hidrógeno, el óxido nítrico y el malondialdehído, proponiéndose como un extracto prometedor en la prevención de enfermedades neurodegenerativas causadas por estrés oxidativo (36,37).

2. Justificación:

La OMS ha clasificado a la depresión como la primera causa de morbilidad a nivel mundial. A pesar de la gran cantidad de tratamientos farmacológicos disponibles para tratar este padecimiento, hasta 33% de los pacientes con depresión no alcanzan la remisión de sus síntomas. Esto implica una acumulación significativa de años de vida productiva potencial perdidos ya que la mayoría de las personas que padecen depresión experimentan los primeros síntomas entre los 17 y los 34 años de edad, con una edad media de 26 años. La depresión afecta distintas esferas de la vida de los individuos, incluyendo sus actividades académicas y laborales, y sus relaciones de pareja, familiares e interpersonales en general.

Mientras que el sistema monoaminérgico ha sido el más estudiado e implicado en la etiopatogenia de la depresión, otros sistemas químicos como la vía de señalización del óxido nítrico también contribuyen al estado de ánimo y conducta. Es por ello que se requiere estudiar más a fondo estos sistemas como posibles nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la depresión.

3. Pregunta de investigación:

¿Cuál es la participación del óxido nítrico en el efecto antidepresivo de *Punica granatum* en las conductas tipo depresión en ratones Swiss Webster machos adultos?

4. Hipótesis:

- La administración de *Punica granatum* tendrá un efecto tipo antidepresivo en ratones adultos de la cepa Swiss Webster.
- El aumento de la síntesis de óxido nítrico a través de la administración del donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (SNP), tendrá un efecto tipo prodepresivo en ratones de la cepa Swiss Webster.
- El bloqueo de la síntesis de óxido nítrico por medio de la administración del inhibidor no selectivo de las sintasas de óxido nítrico, NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), y del inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal, 7-nitroindazol (7-NI), favorecerá el efecto antidepresivo de *P. granatum*.

5. Objetivo general:

Determinar la participación del óxido nítrico en el efecto antidepresivo de *Punica granatum* en las conductas tipo depresión en ratones Swiss Webster adultos.

5.1. Objetivos particulares:

5.1.1. Etapa 1

Establecer en dos modelos animales de depresión en ratones machos adultos de la cepa Swiss Webster (S.W.):

- a. La dosis respuesta de *P. granatum*.
- b. La dosis respuesta del donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (SNP).
- c. La dosis respuesta del inhibidor de las sintasas de óxido nítrico, NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

- d. La dosis respuesta del inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal, 7-nitroindazol (7-NI).

5.1.2. Etapa 2

Estudiar en ratones machos adultos de la cepa S.W. utilizando dos modelos animales de depresión:

- a. El efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y SNP.
- b. El efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y L-NAME.
- c. El efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y 7-NI.

6. Materiales y métodos:

6.1. Sujetos experimentales:

Para la realización de este proyecto de investigación, se utilizaron un total de 190 ratones de la cepa Swiss Webster machos adultos (25-40 g). Los animales se mantuvieron a una temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12/12 hrs., y una humedad relativa del 50%. Los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Los procedimientos y protocolos experimentales de este proyecto de investigación fueron realizados considerando los lineamientos establecidos por el Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL Cinvestav; Protocolo No. 0272-18:0273-18) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199).

6.2. Fármacos:

Todos los fármacos, a excepción de *Punica granatum*, fueron adquiridos a través de la empresa Merck México, filial de Merck KgaA, Darmstadt, Alemania y su marca

Sigma-Aldrich (Estado de México, México). *Punica granatum* fue recibido como una donación por parte del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

- *Punica granatum* disuelta en solución salina al 0.9% y administrada i.p. 30 minutos antes de las pruebas.
- Nitroprusiato de sodio disuelto en solución salina al 0.9% y administrado i.p. 30 minutos antes de las pruebas.
- NG-nitro-L-arginina metil éster disuelto en solución salina al 0.9% y administrado i.p. 30 minutos antes de las pruebas.
- 7-nitroindazol disuelto en unas gotas de Tween 80 y posteriormente en solución salina al 0.9% y administrado i.p. 30 minutos antes de las pruebas.

El tiempo de latencia entre la administración y la realización de las pruebas conductuales se determinó con base en estudios previos (19,26,38).

6.3. Modelos animales:

6.3.1. Prueba de suspensión de cola

La prueba de suspensión de cola es un método experimental utilizado para medir la conducta tipo desesperanza en roedores. Es utilizada para medir la eficacia de componentes antidepressivos. Los animales son suspendidos por el extremo distal de la cola durante un periodo de 6 minutos y aproximadamente a 10 centímetros del suelo. Durante este tiempo, el animal trata de escapar y alcanzar el suelo. Cuando el animal es sometido a un estrés agudo del que no puede escapar, eventualmente se quedará inmóvil (Fig. 12). Es este tiempo acumulado de inmovilidad el que se mide (39). El efecto de fármacos con propiedades antidepressivas se observa mediante una disminución significativa del tiempo de inmovilidad.

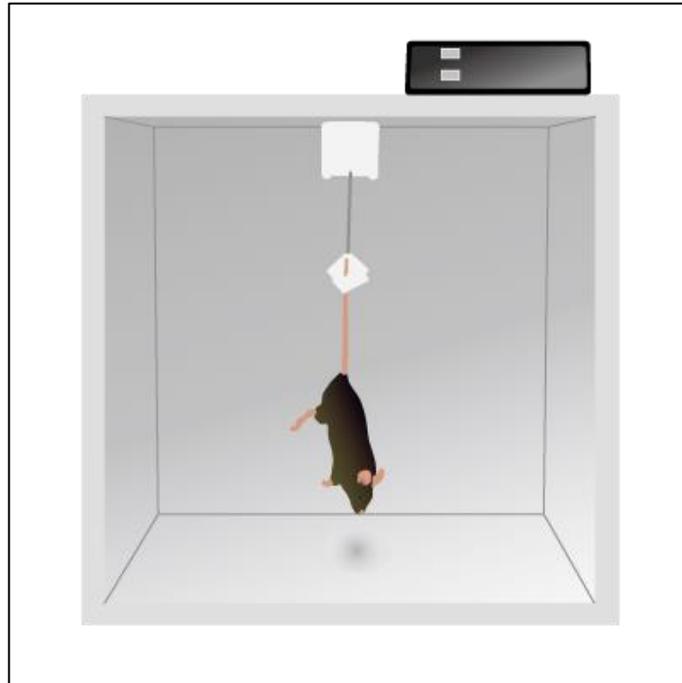


Figura 12. *Prueba de suspensión de cola.* (Michael F. O'Neil, 2003).

6.3.2. *Prueba de nado forzado*

La prueba de nado forzado (en ocasiones llamada prueba de nado de Porsolt) fue en un inicio desarrollada para ratas y posteriormente modificada por Porsolt y colegas para ser utilizada con ratones. Esta prueba conductual en roedores es utilizada para la evaluación de fármacos antidepresivos, para probar la eficacia de nuevos compuestos antidepresivos, y para manipulaciones experimentales enfocadas en reproducir o prevenir estados similares a la depresión. Los ratones son colocados en un cilindro transparente inescapable el cual es llenado con agua y su conducta de movilidad relacionada al escape es medida (Fig. 13) (40).

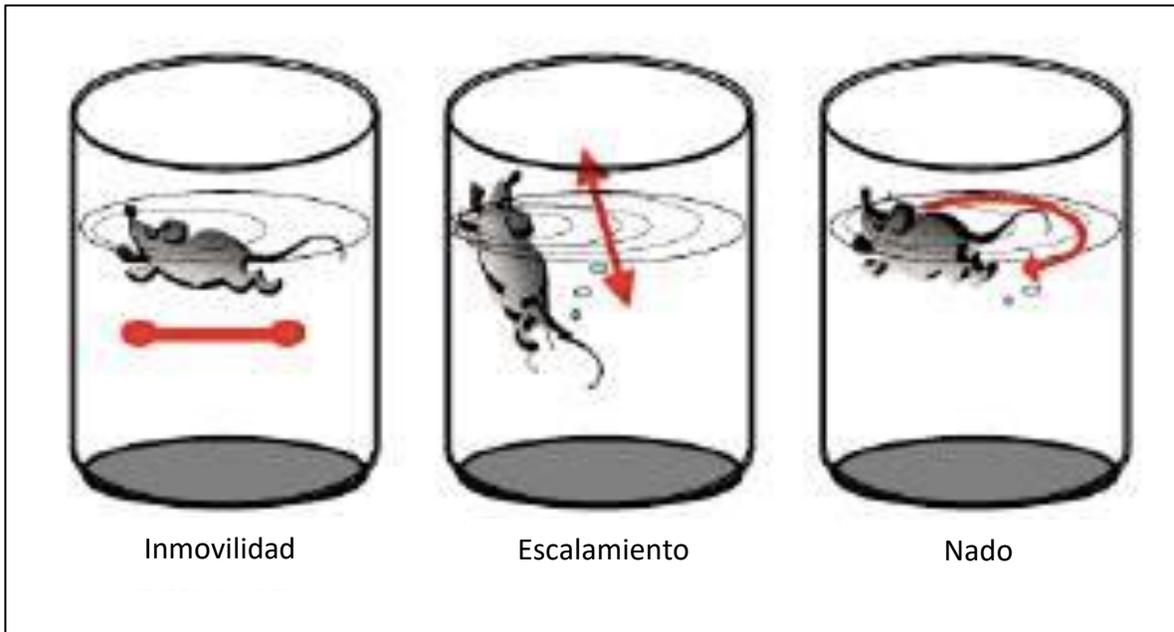


Figura 13. Conductas observadas durante la prueba de nado forzado. (Adem Can, 2011).

Se ha descrito como la reproducción de una situación en la que se induce una “desesperanza conductual”; esto es, el animal pierde la esperanza de escapar del ambiente estresor. La versión en ratones de la prueba de nado forzado es una prueba conductual relativamente corta y de bajo costo que no requiere entrenamiento previo de los ratones y que puede ser llevada a cabo con equipamiento mínimo (40). Los fármacos antidepresivos disminuyen la conducta de inmovilidad al mismo tiempo que aumentan las conductas de nado y escalamiento (41).

Para realizar el análisis de esta prueba se registra la conducta predominante (inmovilidad, nado o escalamiento) de los ratones en un tiempo total de 4 minutos dividido en 47 segmentos de 5 segundos. La conducta de inmovilidad se considera cuando el animal realiza movimientos mínimos para mantenerse a flote con la cabeza fuera del agua; cuando el animal realiza movimientos que le permiten desplazarse alrededor del cilindro o cuando se sumerge y bucea, se considera como conducta de nado; la conducta de escalamiento se presenta cuando el animal

realiza movimientos vigorosos con las 4 extremidades generalmente contra las paredes del cilindro. Mientras que la conducta activa de nado se asocia con actividad serotoninérgica, la conducta de escalamiento se asocia con actividad catecolaminérgica (Fig. 13).

6.3.3. Actividad locomotora

También llamada prueba de campo abierto, es empleada para observar la actividad motora general y conductas de exploración, así como en ocasiones, medidas de ansiedad. Consiste en un área cuadrada (Fig. 14) (7) de 60x60x35 cm., dividida en 16 cuadrados de 15x15 cm. Los sujetos son colocados individualmente en el centro del área 30 minutos después de la administración de fármacos.

Usualmente se registran el número de entradas, el tiempo en el centro, en la periferia y en las esquinas del área, el número de cruzamientos, el número de veces que los animales pasan en patas traseras y con las patas delanteras sobre las paredes (7).

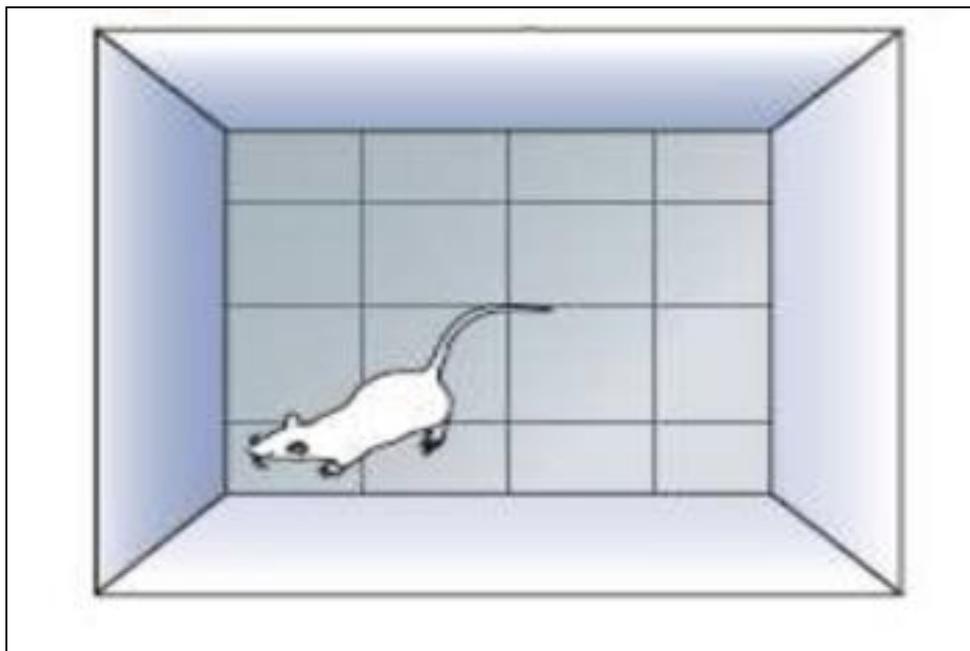


Figura 14. Arena utilizada para la prueba de campo abierto. (Kumar V, 2003).

7. Diseño experimental:

7.1. Experimento 1:

El objetivo de este experimento fue establecer la dosis respuesta de *P. granatum* en dos modelos animales de depresión (prueba de suspensión de cola y prueba nado forzado) en ratones adultos de la cepa Swiss Webster.

Para lograr este objetivo se utilizaron 5 grupos independientes (1 control, 1 *P. granatum* 0.25 mg/kg, 1 *P. granatum* 0.5 mg/kg, 1 *P. granatum* 1.0 mg/kg y 1 *P. granatum* 2-0 mg/kg; n=10 [10 machos]). Todos los grupos fueron probados a los 90 días de vida. Tanto el fármaco activo (*P. granatum*) como el control (solución salina al 0.9%) fueron administrados 30 minutos antes de las pruebas conductuales. Los ratones de cada uno de estos dos grupos fueron evaluados en las pruebas de actividad locomotora, suspensión de cola y nado forzado en un periodo de 2 días. (Fig. 15).

7.2. Experimento 2:

El objetivo de este experimento fue determinar la participación del óxido nítrico en las conductas tipo depresión en ratones adultos de la cepa S.W. mediante la administración de un donador de óxido nítrico (nitroprusiato de sodio), el inhibidor de las sintasas de óxido nítrico (L-NAME), y el inhibidor selectivo de la NOS neuronal (7-nitroindazol).

Para este objetivo se utilizaron 11 grupos independientes (1 nitroprusiato de sodio 1.0 mg/kg, 1 nitroprusiato de sodio 2.0 mg/kg y 1 nitroprusiato de sodio 4.0 mg/kg, por una parte; 1 L-NAME 2.5 mg/kg, 1 L-NAME 5.0 mg/kg, 1 L-NAME 10 mg/kg, 1 L-NAME 20 mg/kg y 1 L-NAME 40 mg/kg, por otra parte; y 1 de 7-nitroindazol 20 mg/kg, 1 de 7-nitroindazol 40 mg/kg y 1 de 7-nitroindazol 80 mg/kg; n=10 [10 machos]). El grupo control descrito en el experimento 1 fue comparado con los grupos de nitroprusiato de sodio y con los grupos de L-NAME y 7-

nitroindazol, respectivamente, a los 90 días de vida. Los fármacos activos (nitroprusiato de sodio, L-NAME y 7-nitroindazol) fueron administrados 30 minutos antes de las pruebas conductuales. Los ratones de cada uno de estos grupos fueron evaluados en las pruebas de actividad locomotora, suspensión de cola y nado forzado en un periodo de 2 días (Fig. 15).

7.3. Experimento 3:

El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto combinado de dosis de *P. granatum* al ser administradas en conjunto con dosis de nitroprusiato de sodio, L-NAME y 7-nitroindazol en ratones adultos de la cepa S.W. en dos modelos animales de depresión (prueba de suspensión de cola y prueba de nado forzado).

Para ello, se utilizaron 3 grupos independientes (1 *P. granatum* 1.0 mg/kg + nitroprusiato de sodio 1.0 mg/kg; 1 *P. granatum* 1.0 mg/kg + L-NAME 2.5 mg/kg; y 1 *P. granatum* 1.0 mg/kg + 7-nitroindazol 40 mg/kg; n=10 [10 machos]). Todos los grupos fueron probados a los 90 días de vida y los fármacos fueron administrados simultáneamente 30 minutos antes de las pruebas. (Fig. 16). Las 3 pruebas conductuales fueron realizadas en un periodo de 2 días.

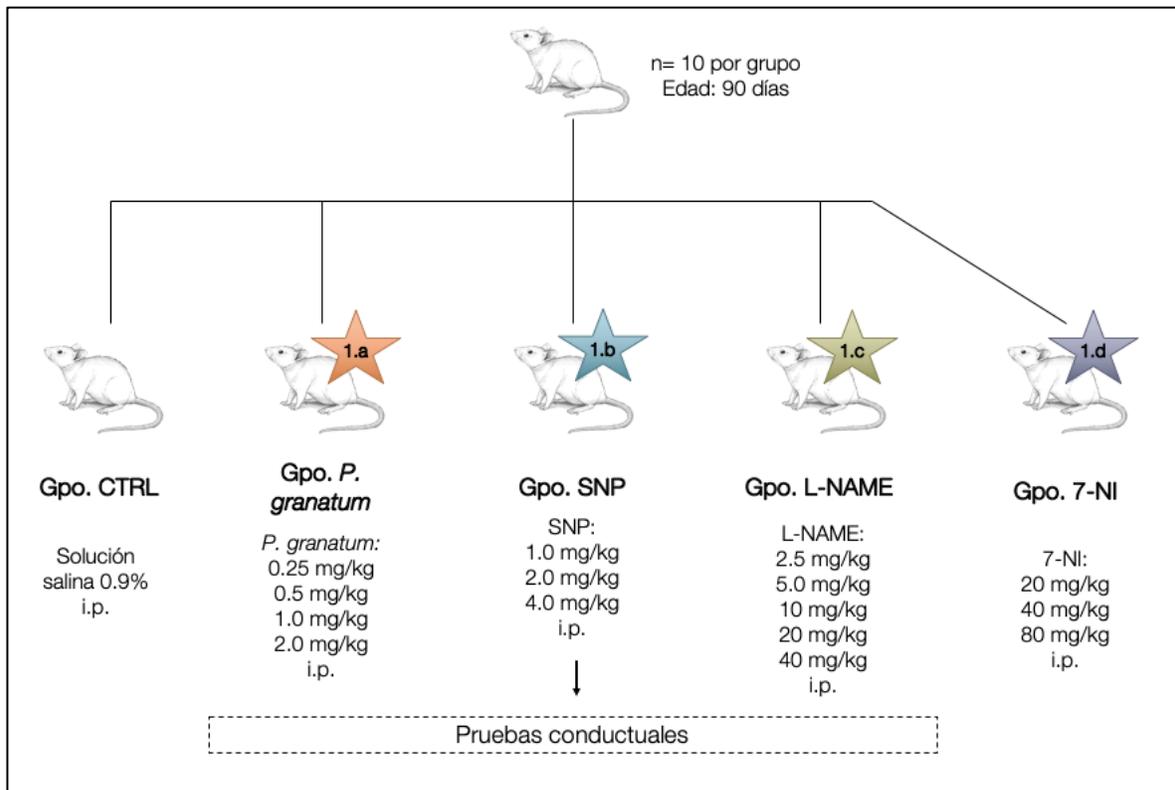


Figura 15. **Diseño experimental etapa 1.** En la figura se muestran los grupos experimentales y las dosis empleadas para establecer las dosis respuesta de *P. granatum* (1.a), SNP (1.b), L-NAME (1.c) y 7-NI (1.d) en dos modelos animales de depresión en ratones adultos de la cepa Swiss Webster. CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio; L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster; 7-NI, 7-nitroindazol; i.p., intraperitoneal.

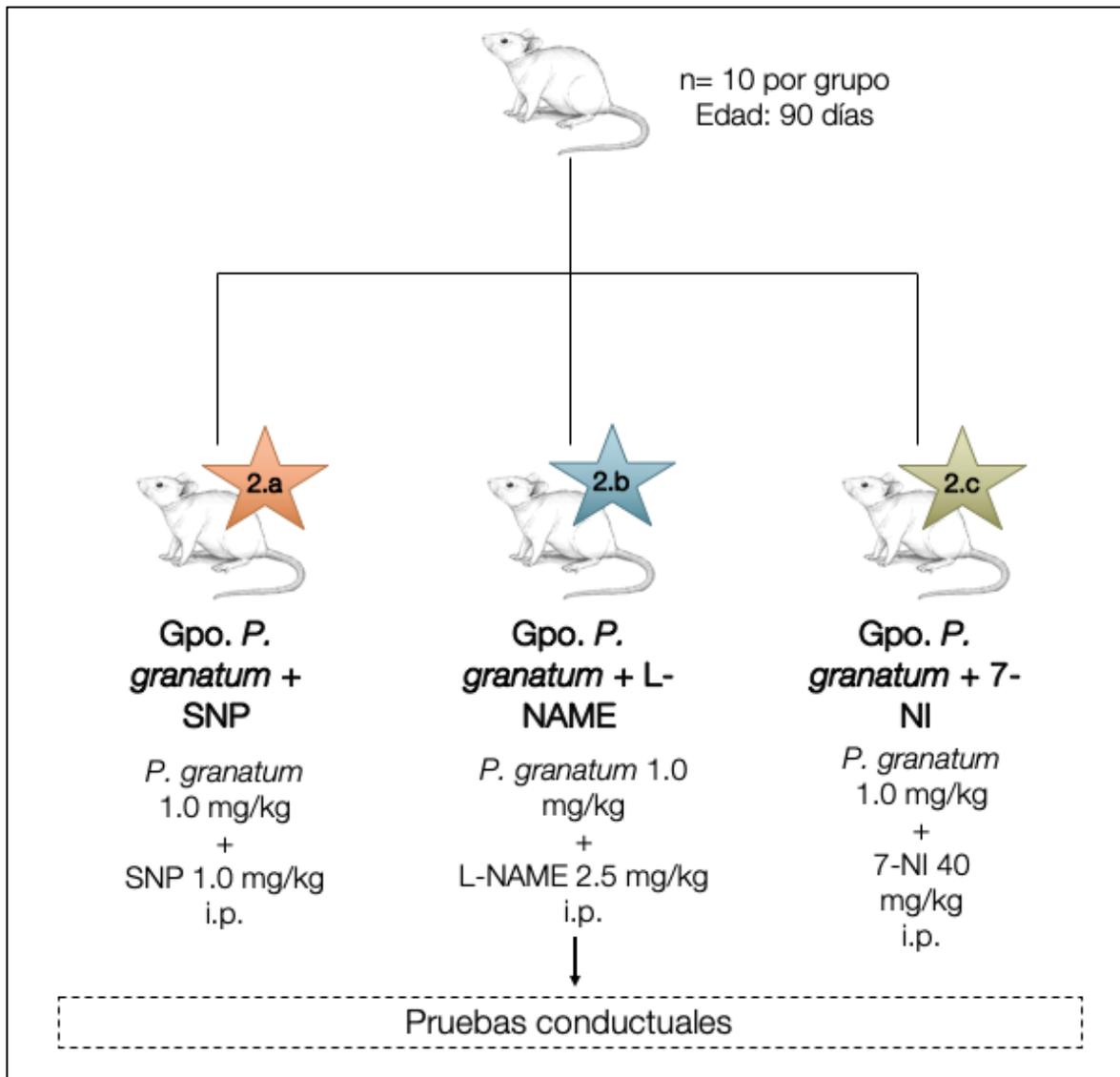


Figura 16. **Diseño experimental etapa 2.** En la figura se muestran los grupos experimentales y las dosis empleadas para estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y SNP (2.a), *P. granatum* y L-NAME (2.b) y *P. granatum* y 7-NI (2.c) en ratones adultos de la cepa Swiss Webster en dos modelos animales de depresión. SNP, nitroprusiato de sodio; L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster; 7-NI, 7-nitroindazol; i.p., intraperitoneal.

8. Análisis estadístico:

Se utilizó el software GraphPad Prism versión 9.0.1. En el análisis descriptivo se obtuvo la media aritmética y el error estándar para todas las variables numéricas. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para examinar las diferencias

en las medias de tres o más grupos. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

9. Resultados:

9.1. Establecer la dosis respuesta de *P. granatum*

En la prueba de suspensión de cola (Fig. 17), se observa una disminución significativa en el tiempo de inmovilidad con la dosis de *P. granatum* de 1.0 mg/kg ($p < 0.05$), sin que esto se presente con las demás dosis (0.25 o 0.5 mg/kg).

Asimismo, en la figura 18 se observan las diferencias entre distintas dosis de *P. granatum* (0.25, 0.5 y 1.0 mg/kg) en la prueba de nado forzado realizada en ratones Swiss Webster machos adultos. En principio, en la figura 18 A se observa una disminución significativa en la conducta de inmovilidad tanto en la dosis de 0.5 mg/kg como en la dosis de 1.0 mg/kg, al compararlo con respecto al grupo control ($p < 0.01$). En la figura 18 B se puede observar que la disminución de la conducta de inmovilidad se debe a un aumento en la conducta de nado en la dosis de 1.0 mg/kg de *P. granatum* ($p < 0.05$), sin que se observen diferencias significativas en las demás dosis (0.25 o 0.5 mg/kg). Respecto a la conducta de escalamiento representada en la figura 18 C, no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control.

Por último, en la figura 19 podemos observar que los animales a los que se les aplicó la dosis de 2.0 mg/kg, presentaron menor actividad exploratoria ($p < 0.0001$) que las dosis evaluadas (0.25, 0.5 y 1.0 mg/kg) al compararse contra el grupo control.

9.1.1. Prueba de suspensión de cola

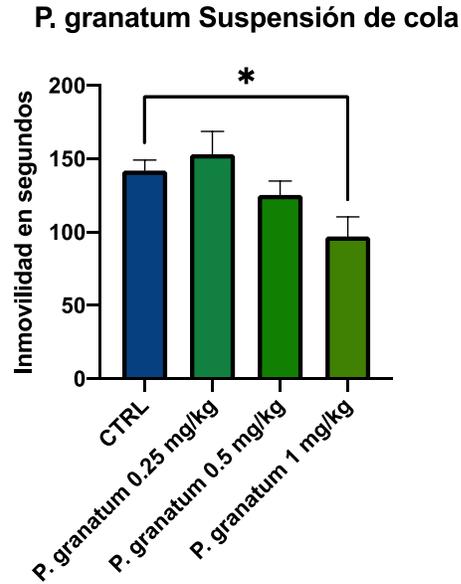


Figura 17. Efecto de distintas dosis de *Punica granatum* (0.25, 0.5 y 1 mg/kg) en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control.

9.1.2. Prueba de nado forzado

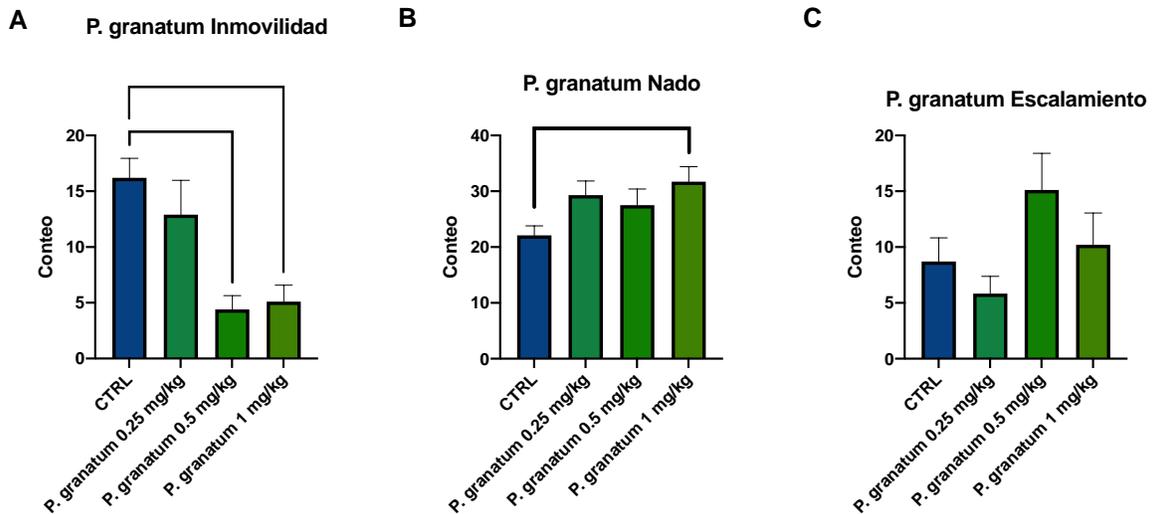


Figura 18. Efecto de distintas dosis de *Punica granatum* (0.25, 0.5 y 1.0 mg/kg) en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. A: Conducta de inmovilidad. B: Conducta de nado. C: Conducta de escalamiento. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control.

9.1.3. Actividad locomotora

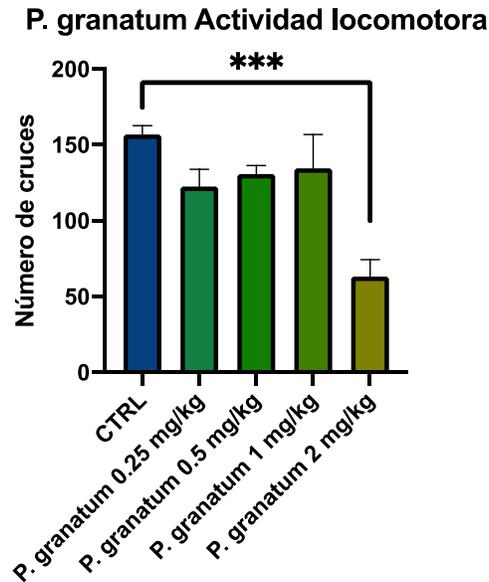


Figura 19. Efecto de distintas dosis de *Punica granatum* (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg) en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, *** $p < 0.0001$; $n = 10$; CTRL, control.

9.2. Determinar la dosis respuesta del donador de óxido nítrico nitroprusiato de sodio (SNP)

En la prueba de suspensión de cola (Fig. 20) se observa un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad con la dosis de 1.0 mg/kg, pero no a la dosis de 2.0 mg/kg de nitroprusiato de sodio entre los grupos experimentales y el grupo control.

Igualmente, en la figura 21 podemos observar las diferencias en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos. Existe un aumento significativo en la conducta de inmovilidad [Fig. 21 A] ($p < 0.01$) en el grupo que recibió la dosis de 1.0 mg/kg, pero no a la dosis de 2.0 mg/kg de nitroprusiato de sodio, a expensas de una disminución en la conducta de nado [Fig. 21 B] ($p < 0.05$) pero sobretodo en la conducta de escalamiento [Fig. 21 C] ($p < 0.001$).

En última instancia, al evaluar la actividad locomotora de los animales (Fig. 22), se observa una disminución significativa ($p < 0.001$) en la motricidad del grupo al que se le administró 4.0 mg/kg, pero no a las dosis de 1.0 o 20 mg/kg de nitroprusiato de sodio.

9.2.1. Prueba de suspensión de cola

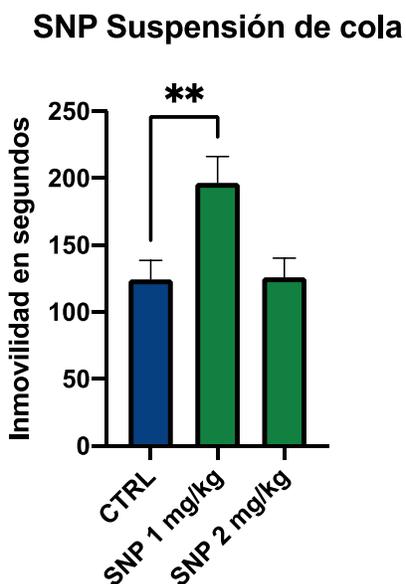


Figura 20. Efecto de distintas dosis de nitroprusiato de sodio (1.0 y 2.0 mg/kg) en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, ** $p < 0.01$; $n = 10$; CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio.

9.2.2. Prueba de nado forzado

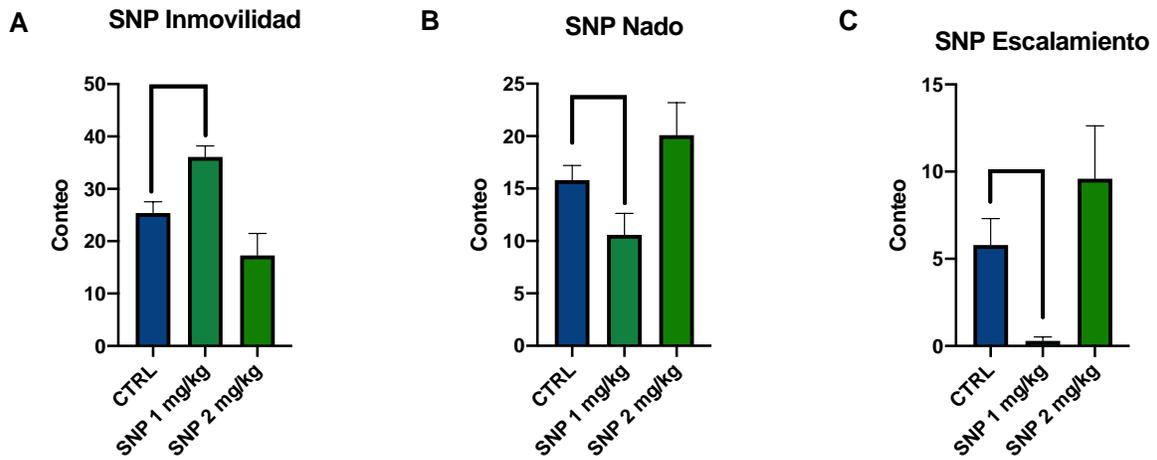


Figura 21. Efecto de distintas dosis de nitroprusiato de sodio (1.0 y 2.0 mg/kg) en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. A: Conducta de inmovilidad. B: Conducta de nado. C: Conducta de escalamiento. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$; $n=10$; CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio.

9.2.3. Actividad locomotora

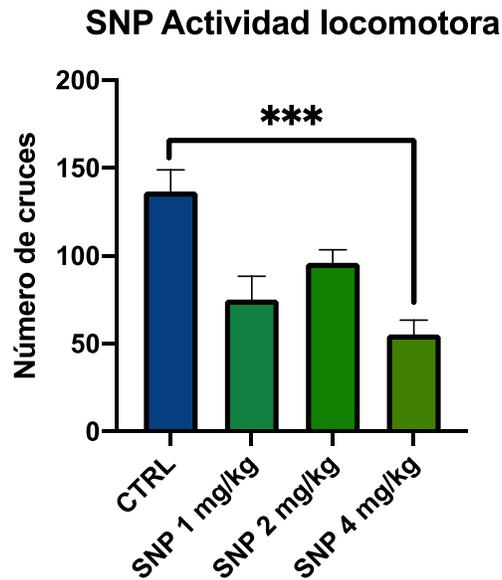


Figura 22. Efecto de distintas dosis de nitroprusiato de sodio (1.0, 2.0 y 4.0 mg/kg) en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, *** $p < 0.0001$; $n=10$; CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio.

9.3. Establecer la dosis respuesta del inhibidor de las sintasas de óxido nítrico, NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

En la prueba de suspensión de cola (Fig. 23), no se observan diferencias significativas en el tiempo de inmovilidad con distintas dosis de L-NAME con respecto al grupo control.

No obstante, en la figura 23 podemos observar las diferencias entre distintas dosis de L-NAME en la prueba de nado forzado realizada en ratones Swiss Webster machos adultos. En principio, en la figura 24 A se observa una diferencia significativa en la conducta de inmovilidad tanto en las dosis de 5 y 10 mg/kg ($p < 0.01$) como con las dosis de 20 y 40 mg/kg ($p < 0.001$), con una disminución de esta conducta respecto al control; así como una diferencia en la dosis de 2.5 mg/kg ($*p < 0.05$) con un aumento de esta conducta respecto al grupo control. En la figura 24 B se puede observar que la disminución de la conducta de inmovilidad en las dosis de 5, 10, 20 y 40 mg/kg se debe a un aumento en la conducta de nado con respecto al control ($p < 0.05$), sin que se observen diferencias significativas a 2.5 mg/kg. Respecto a la conducta de escalamiento representada en la figura 24 C, no existen diferencias significativas.

Por último, en la figura 25 podemos observar que no hubo diferencias significativas en la actividad locomotora de los grupos experimentales al ser comparados con el grupo control.

9.3.1. Prueba de suspensión de cola

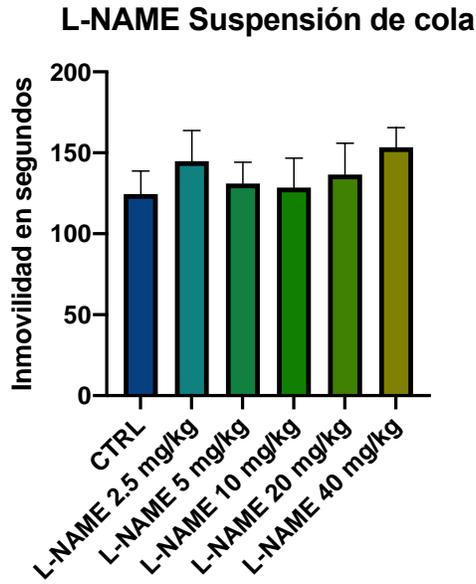


Figura 23. Efecto de distintas dosis de L-NAME (2.5, 5.0, 10, 20 y 40 mg/kg) en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; n=10; CTRL, control; 7-NI, L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster.

9.3.2. Prueba de nado forzado

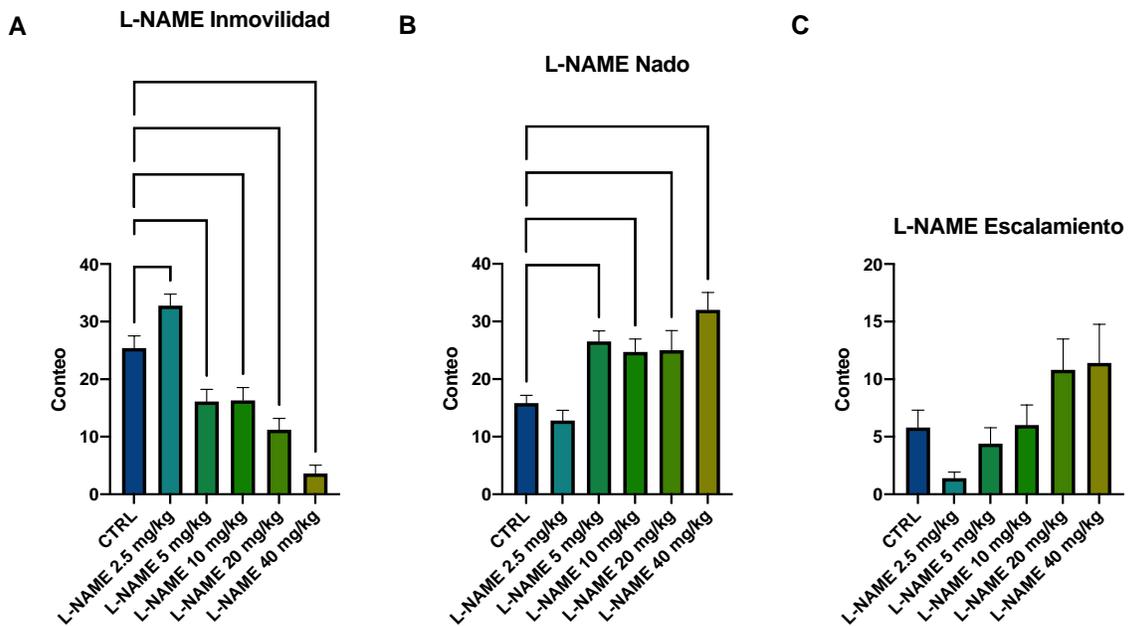


Figura 24. Efecto de distintas dosis de L-NAME (2.5, 5.0, 10 20 mg/kg) en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. A: Conducta de inmovilidad. B: Conducta de nado. C: Conducta de escalamiento.

Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, **** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control; L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster.

9.3.3. Actividad locomotora

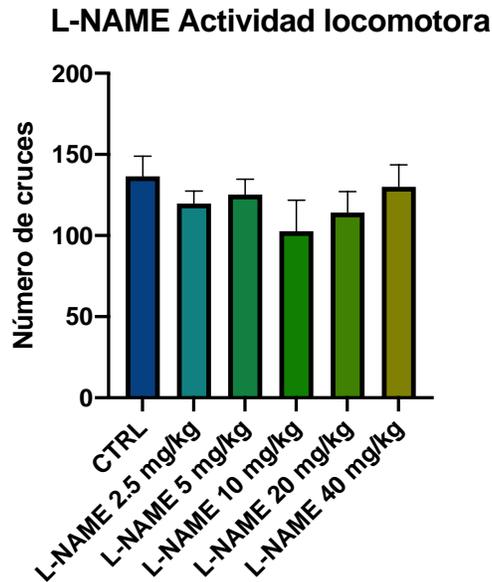


Figura 25. Efecto de distintas dosis de L-NAME (2.5, 5.0, 10, 20 y 40 mg/kg) en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; $n = 10$; CTRL, control; 7-NI, L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster.

9.4. Determinar la dosis respuesta del inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal 7-nitroindazol (7-NI)

En la prueba de suspensión de cola (Fig. 26) no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales en cuanto al tiempo de inmovilidad, aunque si se puede observar una tendencia al incremento de este tiempo en el grupo al que se le administró 40 mg/kg de 7-nitroindazol.

Por el contrario, en la figura 27 se observan las diferencias entre distintas dosis de 7-nitroindazol (20, 40 y 80 mg/kg) en la prueba de nado forzado realizada en ratones Swiss Webster machos adultos. En principio, en la figura 27 A se observa un aumento significativo con respecto al grupo control en la conducta de inmovilidad con la dosis de 40 mg/kg ($p < 0.01$). En la figura 27 B se puede observar que el

aumento de la conducta de inmovilidad se debe a una tendencia a la disminución en la conducta de nado, sin que se observe una diferencia significativa con esta dosis. Sin embargo, es posible observar un aumento significativo en la conducta de nado tanto en la dosis de 20 mg/kg como en la de 80 mg/kg ($p < 0.05$). Respecto a la conducta de escalamiento representada en la figura 27 C, existe una disminución significativa en la conducta de escalamiento con la dosis de 40 mg/kg de 7-nitroindazol ($p < 0.01$).

En la figura 28 no se observan diferencias significativas en la actividad locomotora de los distintos grupos experimentales con respecto al control.

9.4.1. Prueba de suspensión de cola

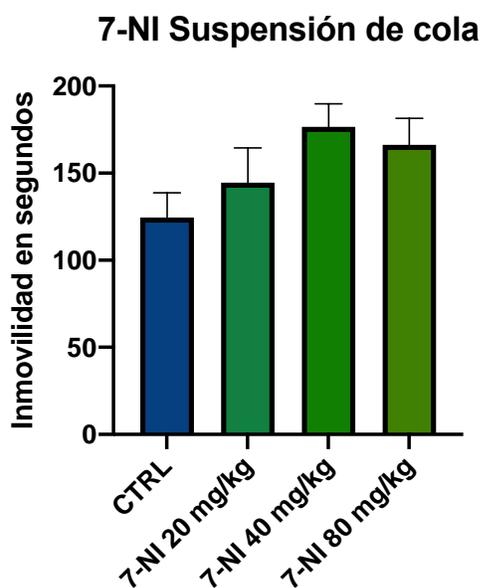


Figura 26. Efecto de distintas dosis de 7-nitroindazol (20, 40 y 80 mg/kg) en la prueba de suspensión de cola en ratones *Swiss Webster* machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; $n=10$; CTRL, control; 7-NI, 7-nitroindazol.

9.4.2. Prueba de nado forzado

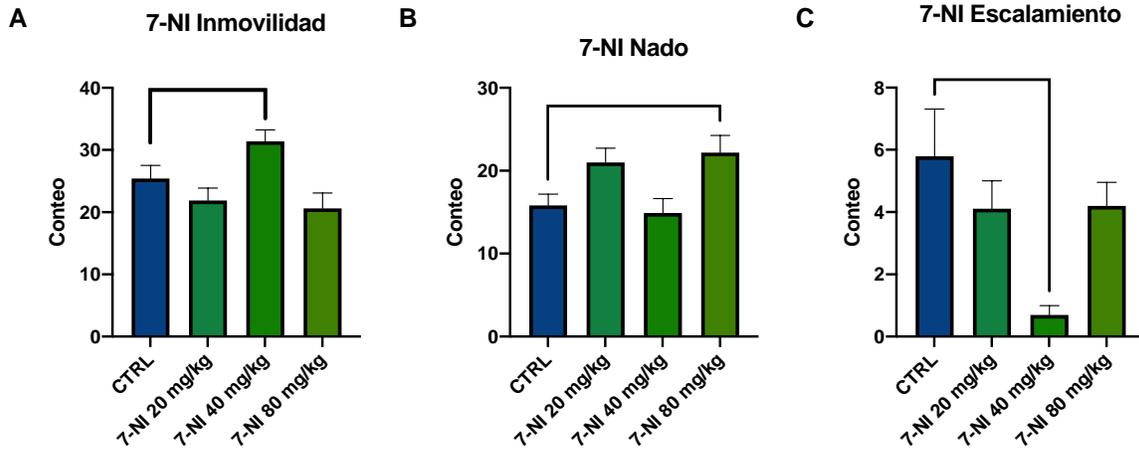


Figura 27. Efecto de distintas dosis de 7-nitroindazol (20, 40 y 80 mg/kg) en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. A: Conducta de inmovilidad. B: Conducta de nado. C: Conducta de escalamiento. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Dunnett's, ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control; 7-NI, 7-nitroindazol.

9.4.3. Actividad locomotora

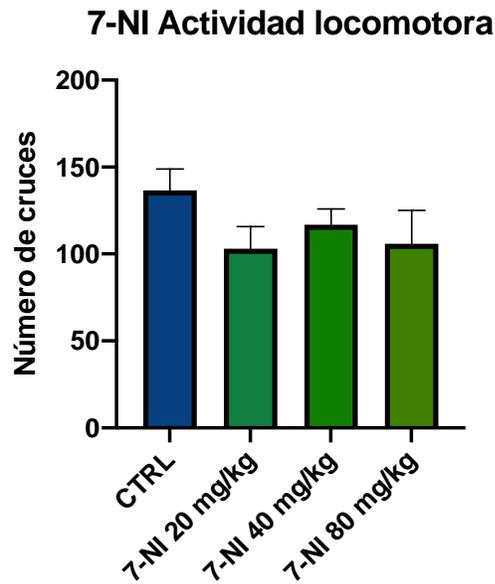


Figura 28. Efecto de distintas dosis de 7-nitroindazol (20, 40 y 80 mg/kg) en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos en estado basal. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; $n = 10$; CTRL, control; 7-NI, 7-nitroindazol.

9.5. Estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y nitroprusiato de sodio (SNP)

En la prueba de suspensión de cola con dosis combinadas de *P. granatum* y SNP (Fig. 29) no se observan diferencias significativas en el tiempo de inmovilidad del grupo combinado con respecto a los grupos experimentales con dosis únicas o con respecto al grupo control.

En la figura 30 se observan las diferencias entre dosis única de *P. granatum* (1.0 mg/kg) en combinación con 1.0 mg/kg de SNP en la prueba de nado forzado realizada en ratones Swiss Webster machos adultos. En la figura 30 A podemos observar una diferencia significativa en la conducta de inmovilidad al comparar el grupo que únicamente recibió 1.0 mg/kg de SNP versus el grupo que recibió una combinación de *P. granatum* 1.0 mg/kg + SNP 1.0 mg/kg ($p < 0.001$); notando una disminución en la conducta de inmovilidad en el grupo que recibió la combinación de fármacos. Asimismo, en esta figura se puede notar que el grupo de *P. granatum* 1.0 mg/kg + SNP 1.0 mg/kg presenta un aumento significativo en la conducta de inmovilidad ($p < 0.001$) con respecto al grupo que solamente recibió 1.0 mg/kg de *P. granatum*.

En la figura 30 B es posible identificar una diferencia entre la dosis combinada de *P. granatum* 1.0 mg/kg + SNP 1.0 mg/kg y el grupo de *P. granatum* 1.0 mg/kg, con una disminución significativa en la conducta de nado ($p < 0.01$) en el grupo con la combinación de fármacos.

Respecto a la conducta de escalamiento representada en la figura 30 C, no existen diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales y el grupo control.

Finalmente, en la figura 31 podemos observar diferencias significativas en la actividad locomotora del grupo que recibió una dosis combinada de *P. granatum* 1.0 mg/kg + SNP 1.0 mg/kg, y el grupo control ($p < 0.01$) y el grupo con dosis única de 1.0 mg/kg de *P. granatum* ($p < 0.01$).

9.5.1. Prueba de suspensión de cola

P. granatum + SNP Suspensión de cola

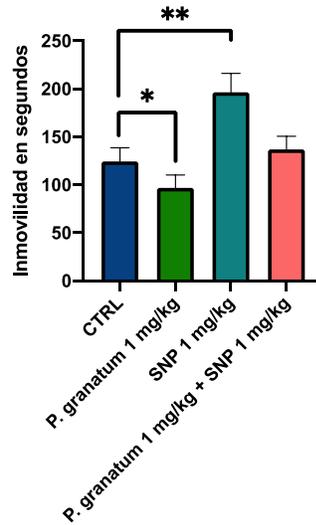


Figura 29. Efecto de dosis únicas de nitroprusiato de sodio (1.0 mg/kg) y Punica granatum (1.0 mg/kg), y una combinación de P. granatum 1.0 mg/kg con 1.0 mg/kg de nitroprusiato de sodio en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos. Los datos representan la media ± SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio.

9.5.2. Prueba de nado forzado

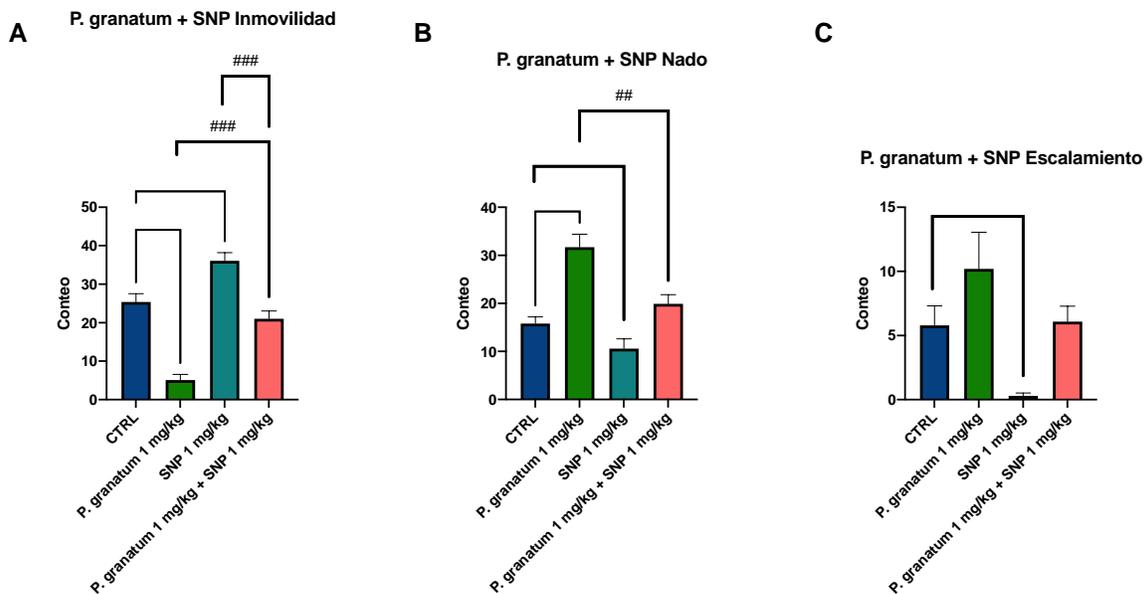


Figura 30. Efecto de dosis única de nitroprusiato de sodio (1.0 mg/kg) y Punica granatum (1.0 mg/kg), y una combinación de P. granatum 1.0 mg/kg con 1.0 mg/kg de nitroprusiato de sodio en la prueba de nado forzado en ratones Swiss

Webster machos adultos. A: Conducta de inmovilidad. B: Conducta de nado. C: Conducta de escalamiento. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$; $n = 10$; CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio.

9.5.3. Actividad locomotora

P. granatum + SNP Actividad locomotora

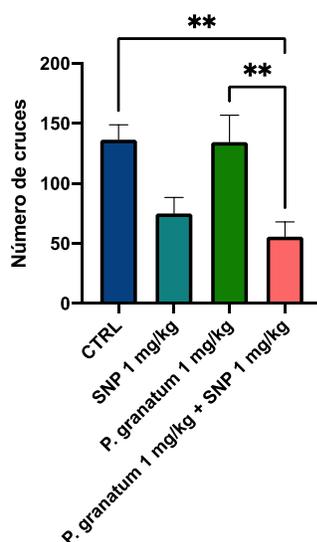


Figura 31. Efecto de dosis única de nitroprusiato de sodio (1.0 mg/kg) y *Punica granatum* (1.0 mg/kg), y una combinación de *P. granatum* 1.0 mg/kg con 1.0 mg/kg de nitroprusiato de sodio en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's, ** $p < 0.01$; $n = 10$; CTRL, control; SNP, nitroprusiato de sodio.

9.6. Estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. grantum* y L-NAME

No se pudieron observar diferencias significativas en la prueba de suspensión de cola (Fig. 32) entre los grupos experimentales que recibieron dosis únicas de L-NAME (2.5 mg/kg) y *P. granatum* (1.0 mg/kg), el grupo con dosis combinada de estos fármacos y el grupo control.

Sin embargo, en la prueba de nado forzado ilustrada en la figura 33, podemos identificar una disminución en la conducta de inmovilidad (Fig. 33 A) en el grupo con dosis combinada respecto al grupo control ($p < 0.05$) y al grupo con dosis única de L-NAME ($p < 0.001$); pero un aumento en esta conducta al comparar este mismo grupo

combinado con el grupo con una dosis única de *P. granatum* ($p < 0.001$). Al menos la disminución en la conducta de inmovilidad puede ser explicada por un aumento en la conducta de nado (Fig. 33 B) al realizar la comparación del grupo combinado con el grupo control ($p < 0.001$) y el grupo con dosis única de L-NAME ($p < 0.001$). El aumento de la conducta de inmovilidad que se aprecia al comparar el grupo combinado con el grupo de *P. granatum* parece deberse a una disminución significativa en la conducta de escalamiento del grupo con dosis combinadas ($p < 0.001$).

Finalmente, no se observan diferencias significativas en la actividad locomotora de ninguno de los grupos (Fig. 34).

9.6.1. Prueba de suspensión de cola

P. granatum + L-NAME Suspensión de cola

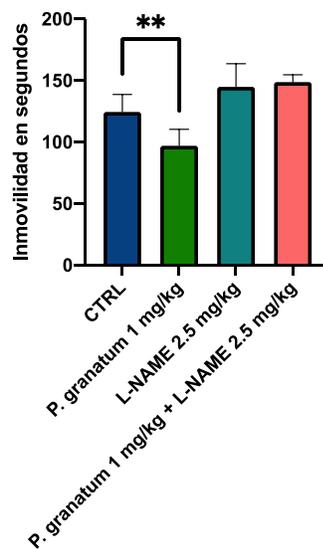


Figura 32. Efecto de dosis única de L-NAME (2.5 mg/kg), *Punica granatum* (1.0 mg/kg), y una combinación de *Punica granatum* 1.0 mg/kg con 2.5 mg/kg de L-NAME en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's ** $p < 0.01$; $n = 10$; CTRL, control; L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster.

9.6.2. Prueba de nado forzado

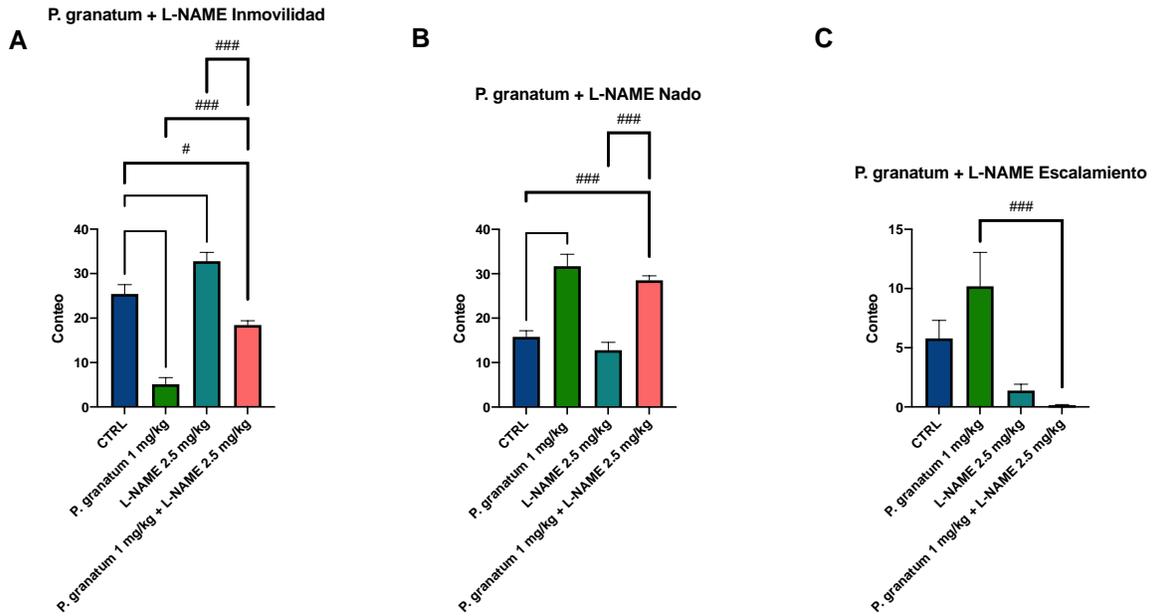


Figura 33. Efecto de dosis únicas de L-NAME (2.5 mg/kg) y *Punica granatum* (1.0 mg/kg), y una combinación de *P. granatum* 1.0 mg/kg con 2.5 mg/kg de L-NAME en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos adultos. A: Conducta de inmovilidad. B: Conducta de nado. C: Conducta de escalamiento. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's **** $p < 0.001$ *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control; L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster.

9.6.3. Actividad locomotora

P. granatum + L-NAME Actividad locomotora

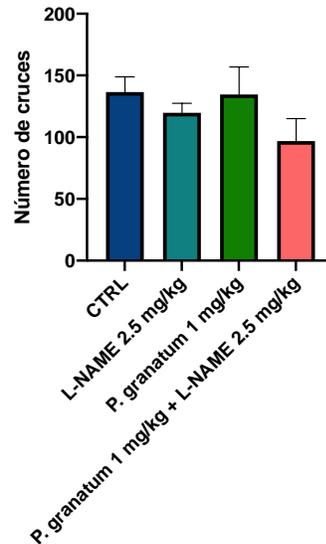


Figura 34. Efecto de dosis únicas de L-NAME (2.5 mg/kg) y *Punica granatum* (1.0 mg/kg), y una combinación de *P. granatum* 1.0 mg/kg con 2.5 mg/kg de L-NAME en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; $n = 10$; CTRL, control; L-NAME, NG-nitro-L-arginina metil éster.

9.7. Estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y 7-nitroindazol (7-NI)

En la figura 35, en la prueba de suspensión de cola, se aprecia un aumento significativo ($p < 0.01$) en el tiempo de inmovilidad en segundos en el grupo que recibió una dosis combinada de *P. granatum* 1.0 mg/kg + 7-NI 40 mg/kg al compararlo con el grupo que únicamente recibió 1.0 mg/kg de *P. granatum*, sin que se observen diferencias significativas con el grupo control o con el otro grupo experimental.

De la misma manera, existe un aumento significativo ($p < 0.001$) en la conducta de inmovilidad (Fig. 36 A) en la prueba de nado forzado (Fig. 36) en el grupo de *P. granatum* 1.0 mg/kg + 7-NI 40 mg/kg comparándolo con el grupo de *P. granatum* 1.0 mg/kg. Esto con una disminución significativa ($p > 0.01$) tanto en la conducta de nado (Fig. 36 B) como en la conducta de escalamiento (Fig. 36 C), al comparar el grupo que recibió una dosis combinada de *P. granatum* 1.0 mg/kg + 7-NI 40 mg/kg y el grupo que recibió solamente una dosis de *P. granatum* 1.0 mg/kg. No se observaron diferencias significativas al realizar la comparación del grupo con combinación de fármacos con el grupo control o con el grupo que recibió dosis única de 40 mg/kg de 7-nitroindazol.

Por último, en la figura 37 podemos observar una diferencia significativa en la actividad locomotora entre el grupo que recibió una dosis combinada de *P. granatum* 1.0 mg/kg + 7-NI 40 mg/kg, y los grupos control ($p < 0.01$), 7-NI 40 mg/kg ($p < 0.05$) y *P. granatum* 1.0 mg/kg ($p < 0.01$).

9.7.1. Prueba de suspensión de cola

P. granatum + 7-NI Suspensión de cola

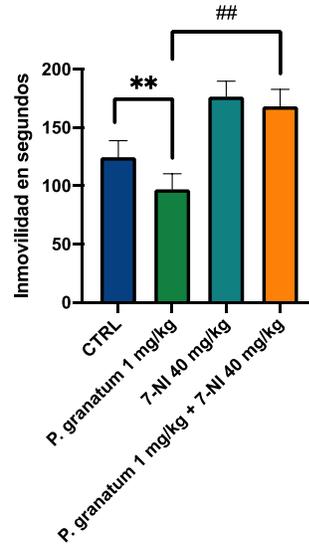
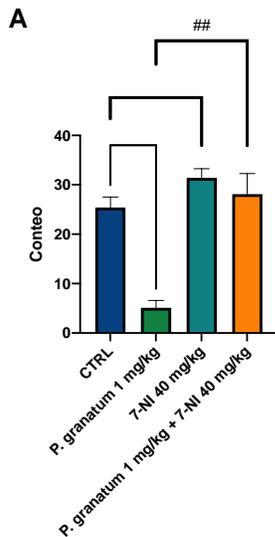


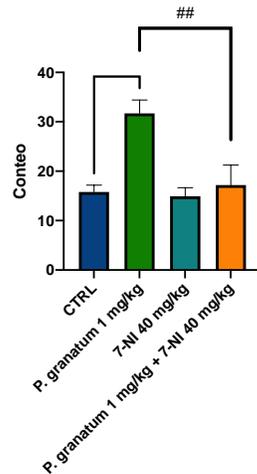
Figura 35. Efecto de dosis única de 7- nitroindazol (40 mg/kg), Punica granatum (1.0 mg/kg), y una combinación de Punica granatum 1.0 mg/kg con 40 mg/kg de 7-nitroindazol en la prueba de suspensión de cola en ratones Swiss Webster machos adultos. Los datos representan la media ± SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's, ** $p < 0.01$; $n = 10$; CTRL, control; 7-NI, 7-nitroindazol.

9.7.2. Prueba de nado forzado

P. granatum + 7-NI Inmovilidad



P. granatum + 7-NI Nado



P. granatum + 7-NI Escalamiento

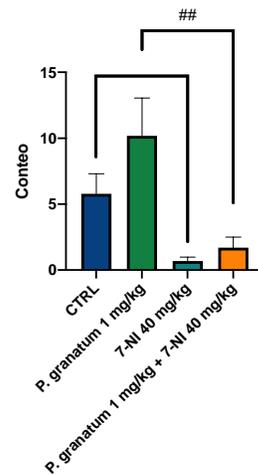


Figura 36. Efecto de dosis únicas de 7-nitroindazol (40 mg/kg) y Punica granatum (1.0 mg/kg), y una combinación de P. granatum 1.0 mg/kg con 40 mg/kg de 7-nitroindazol en la prueba de nado forzado en ratones Swiss Webster machos

adultos. A: Conducta de inmovilidad. **B:** Conducta de nado. **C:** Conducta de escalamiento. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's **** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$; $n = 10$; CTRL, control; 7-NI, 7-nitroindazol.

9.7.3. Actividad locomotora

P. granatum + 7-NI Actividad locomotora

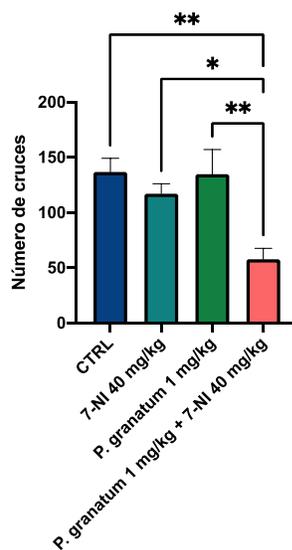


Figura 37. Efecto de dosis únicas de 7-nitroindazol (40 mg/kg) y *Punica granatum* (1.0 mg/kg), y una combinación de *P. granatum* 1.0 mg/kg con 40 mg/kg de 7-nitroindazol en la actividad locomotora de ratones Swiss Webster machos adultos. Los datos representan la media \pm SEM; ANOVA de una vía; post hoc Tukey's ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$; $n = 10$; CTRL, control; 7-NI, 7-nitroindazol.

10. Resumen general de resultados:

Tabla 2. *Resumen general de resultados.*

Tratamiento	Suspensión de cola	Inmovilidad	Nado	Escalamiento	Actividad locomotora	Interpretación
<i>P. granatum</i> 0.25 mg/kg	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	
<i>P. granatum</i> 0.5 mg/kg	S/C	↓	S/C	S/C	S/C	Efecto antidepresivo
<i>P. granatum</i> 1.0 mg/kg	↓	↓ ↓	↑	S/C	S/C	Efecto antidepresivo
<i>P. granatum</i> 2.0 mg/kg	S/C	S/C	S/C	S/C	↓ ↓ ↓	
SNP 1.0 mg/kg	↑ ↑	↑ ↑	↓	↓ ↓ ↓	S/C	Efecto prodepresivo
SNP 2.0 mg/kg	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	
SNP 4.0 mg/kg	S/C	S/C	S/C	S/C	↓ ↓ ↓	
L-NAME 2.5 mg/kg	S/C	↑	S/C	S/C	S/C	Efecto prodepresivo
L-NAME 5.0 mg/kg	S/C	↓ ↓	↑	S/C	S/C	Efecto antidepresivo
L-NAME 10 mg/kg	S/C	↓ ↓	↑	S/C	S/C	Efecto antidepresivo
L-NAME 20 mg/kg	S/C	↓ ↓ ↓ ↓	↑	S/C	S/C	Efecto antidepresivo
L-NAME 40 mg/kg	S/C	↓ ↓ ↓ ↓	↑ ↑ ↑ ↑	S/C	S/C	Efecto antidepresivo
7-NI 20 mg/kg	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	
7-NI 40 mg/kg	S/C	↑	S/C	↓ ↓	S/C	Efecto prodepresivo
7-NI 80 mg/kg	S/C	S/C	↑	S/C	S/C	

- *P. granatum* muestra un efecto tipo antidepresivo.
- El óxido nítrico ejerce efectos tipo prodepresivos.
- La inhibición de las sintasas de óxido nítrico tiene efectos duales dependientes de la dosis.
- El nitroprusiato de sodio (SNP) bloquea parcialmente los efectos tipo antidepresivos de *P. granatum*.
- La inhibición no selectiva de las sintasas de óxido nítrico bloquea parcialmente los efectos tipo antidepresivos de *P. granatum*.
- La inhibición selectiva de la sintasa de óxido nítrico neuronal bloquea de forma total los efectos tipo antidepresivos de *P. granatum*.

11. Discusión:

11.a. Establecer la dosis respuesta de *P. granatum* en dos modelos animales de depresión en ratones adultos de la cepa Swiss Webster.

Tanto la prueba de suspensión de cola como la prueba de nado forzado comparten la observación clave que los animales confrontados ante un estrés inescapable desisten de intentar escapar de la situación en la que se encuentran. La validez de estas pruebas conductuales se basa en el hecho de que una amplia variedad de medicamentos antidepresivos mantienen las conductas activas y disminuyen el tiempo de inmovilidad (39).. De tal modo, estos modelos animales de inducción de estrés y conductas de afrontamiento son utilizados para probar el potencial efecto antidepresivo de otros compuestos como es, en este caso, el de *Punica granatum*. El efecto tipo antidepresivo de esta planta se conocía gracias a diversos estudios, en los que se habían probado distintas dosis (25 y 50 mg/kg) de la pulpa y de la cáscara de este fruto en dos modelos animales de depresión en ratones ICR machos (19), así como en un modelo de inducción de menopausia en ratas hembras de la cepa Wistar (21). A diferencia de estas investigaciones, en el presente trabajo

se utilizó un extracto acuoso de *P. granatum*, el cual generalmente se obtiene a través de un procedimiento basado en la extracción de la planta completa triturada. Asimismo, se probaron varias dosis (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg, i.p.) en ratones machos adultos de la cepa Swiss Webster con el objetivo de determinar la dosis efectiva específicamente en estos sujetos experimentales. Esta distinción es importante ya que a pesar de las similitudes entre ratas y ratones, existen diferencias fisiológicas y conductuales significativas entre estos roedores. El menor tamaño de los ratones ofrece ciertas ventajas como permitir que se utilicen dosis menores al mismo tiempo que presentan un metabolismo más rápido; no obstante, presentan mayores niveles de estrés al ser manipulados y presentan comportamientos más agresivos en situaciones sociales con otros ratones.

Se encontró que la dosis de 1.0 mg/kg, i.p. disminuyó de manera significativa el tiempo de inmovilidad tanto en la prueba de suspensión de cola como en la prueba de nado forzado. Estos resultados coinciden con trabajos previos (20) en donde se observó que la administración intraperitoneal de 1.0 mg/kg de *P. granatum* disminuyó la conducta de inmovilidad a expensas de un aumento en la conducta de nado en la prueba de nado forzado en ratas hembras ovariectomizadas. En este caso, también se pudo observar que la disminución de la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado se debió a un aumento en la conducta de nado sin que hubiera modificaciones en la conducta de escalamiento. De acuerdo a lo reportado en otros trabajos (41), podemos inferir que *P. granatum* interactúa con el sistema serotoninérgico para ejercer su efecto tipo antidepresivo con poca o nula participación en el sistema catecolaminérgico; esto también ya había sido reportado en investigaciones previas en donde al administrar una neurotoxina selectiva que causa degeneración de las neuronas presinápticas serotoninérgicas, el efecto tipo antidepresivo de *P. granatum* se vio bloqueado (20).

El sistema serotoninérgico ha sido uno de los más implicados en la etiopatogenia de la depresión, además de ser uno de los blancos terapéuticos más reconocidos en el tratamiento farmacológico de este padecimiento. Se estima que los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) son prescritos hasta 6 veces por

segundo en Estados Unidos, siendo su característica farmacológica principal, la inhibición selectiva y potente de la recaptación de serotonina al inhibir al transportador de serotonina o SERT. La importancia de esto se centra en que a pesar de que la serotonina no es el único neurotransmisor implicado en la depresión, la hipótesis monoaminérgica afirma que puede haber un déficit de serotonina en las áreas presinápticas somatodendríticas así como en la misma sinapsis del axón terminal que contribuyan de manera significativa a este padecimiento, con una participación adicional de otros sistemas bioquímicos (4)..

La dosis de 2.0 mg/kg de *Punica granatum* produjo una disminución significativa en la actividad locomotora con respecto al grupo control lo que sugiere que cualquier diferencia significativa observada con en las pruebas conductuales con esta dosis pudiera deberse a un falso positivo más que a un efecto del fármaco sobre las conductas depresivas (41)..

11.b. Determinar la dosis respuesta del donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (SNP), en dos modelos animales de depresión en ratones adultos de la cepa S.W.

Se conoce que los donadores de óxido nítrico ejercen efectos bifásicos dependiendo de su estructura química, dosis, esquema de tratamiento y rapidez de liberación gaseosa (26). Estas propiedades sugieren que el óxido nítrico pudiera llegar a comportarse como un compuesto con características adaptogénicas, es decir, un regulador metabólico que incrementa la capacidad de un organismo para adaptarse a factores ambientales y evitar el daño provocado por dichos factores (42). En modelos animales de depresión, se ha encontrado que mientras que el pre-tratamiento con nitroprusiato de sodio, un profármaco que reacciona con grupos sulfhidrilo fisiológicos para liberar óxido nítrico (43), en un rango de 0.5-1.0 mg/kg i.p. no afecta la acción antidepresiva de la ketamina, tampoco muestra efecto alguno en la prueba de nado forzado en ratones cuando es administrado de forma individual (44). Es importante recalcar que, a pesar de que nuestro estudio se enfoca en

depresión, la mayoría de las investigaciones de este compuesto se han realizado en modelos animales de ansiedad, pudiendo también observar aquí sus efectos duales: ansiolítico a una dosis de 1.0 mg/kg administrada intraperitonealmente en ratas (45) y ansiogénico a una dosis aguda intraperitoneal de 3.0 mg/kg en ratones (38).

En nuestro trabajo encontramos que la administración aguda intraperitoneal 30 minutos antes de las pruebas conductuales de 1.0 mg/kg de SNP aumentó de manera significativa el tiempo de inmovilidad tanto en la prueba de suspensión de cola como en la prueba de nado forzado, esta última a expensas de una disminución en la conducta de nado pero más significativamente en la de escalamiento. Con base en lo observado en ambas pruebas, podemos concluir que el incremento del óxido nítrico muestra un efecto tipo prodepresivo que se contrapone con algunos datos publicados (46) en donde la administración de esta misma dosis de SNP 30 minutos previo a las pruebas no produjo cambios significativos en las conductas de los animales o que, por el contrario, produce un efecto antidepresivo que no puede ser atribuido a cambios en la actividad locomotora (45).

Mientras que estos efectos contradictorios o duales pudieran explicarse por el esquema terapéutico y la dosis administrada, el efecto tipo prodepresivo ocasionado por la liberación incrementada de óxido nítrico tras la administración de nitroprusiato de sodio, coincide con estudios en animales que han indicado que este gasotransmisor produce estados depresivos al modular los niveles de GMPc (47). En ellos se ha observado que el pre-tratamiento con el precursor de óxido nítrico L-arginina abole los efectos antidepresivos alcanzados por diversos compuestos como melatonina, agmatina y cloruro de zinc (48–50), mientras que el pre-tratamiento con sildenafil, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa 5 que aumenta los niveles de GMPc, previene los efectos antidepresivos de los inhibidores de los canales de K⁺ en la prueba de nado forzado. Es decir, mientras que las acciones del óxido nítrico son mediadas por la producción local de óxido nítrico, también lo son en gran parte por la generación subsecuente su segundo mensajero GMPc (47). Por último, la dosis de 4.0 mg/kg de nitroprusiato de sodio ocasionó una

alteración significativa en la actividad locomotora de los roedores, con una disminución en el número de cruces observados por lo que esta dosis no fue contemplada en el análisis de las pruebas conductuales para evitar posibles resultados falsos positivos.

11.c. Establecer la dosis respuesta del inhibidor de las sintasas de óxido nítrico, NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), en dos modelos animales de depresión en ratones adultos de la cepa S.W.

Al contrario que los resultados obtenidos con el óxido nítrico, sus donadores y su precursor, la literatura ha demostrado de manera casi consistente que la inhibición en la producción de óxido nítrico produce efectos ansiolíticos y antidepresivos (26). El bloqueo de las sintasas de óxido nítrico disminuye la depleción de los depósitos de serotonina en la corteza prefrontal de ratones similar a lo observado con la imipramina (51), mientras que la fluoxetina regula a la baja la NOS neuronal en el hipocampo (52). Asimismo se ha encontrado que los inhibidores selectivos y no selectivos de las sintasas de óxido nítrico como L-NAME y 7-nitroindazol, actúan al atenuar las respuestas de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a los choques eléctricos en modelos animales de ansiedad (26). Al recordar que el eje HHA se encuentra fuertemente colonizado por la sintasa de óxido nítrico neuronal y que esta es potenciada directamente por la corticoesterona en respuesta al estrés, la inhibición de esta sintasa pudiera estar bloqueando la participación del óxido nítrico en la patogénesis del estrés y sus comorbilidades (7).

No obstante, algunos estudios realizados con inhibidores tanto selectivos como no selectivos de óxido nítrico, demuestran un efecto dual de estos compuestos. En el caso del inhibidor no selectivo de las sintasas de óxido nítrico, L-NAME, los resultados obtenidos en un estudio en donde se evaluaron 3 modelos murinos de exploración empleados para evaluar fármacos utilizados en conductas ligadas a ansiedad, se demostró que este compuesto tiene un efecto tipo ansiogénico de manera no consistente; sugiriendo que la inhibición de la producción de NO puede, de acuerdo a la dosis empleada y bajo ciertas circunstancias como el nivel de estrés

al que son sometidos los sujetos experimentales, aumentar las conductas tipo ansiedad (53). Sin embargo, un estudio por Sevgi y colegas, demostró que, por el contrario, L-NAME previene comportamientos tipo ansiedad y depresión en ratas expuestas a estrés por sujeción en una dosis de 10 mg/kg. Nuevamente esto coincidiría con algunas propiedades adaptogénicas del óxido nítrico, específicamente cómo niveles leves de estrés inducen una inmunidad o resistencia a exposiciones subsecuentes de estrés más grave pero que esta únicamente se alcanza después de exposiciones repetidas. Este fenómeno de adaptación al estrés también se caracteriza por una respuesta hormética, en la cual una dosis menor puede tener un efecto estimulante y una dosis mayor un efecto inhibitorio (42).

Nuestros resultados demuestran este efecto hormético. Mientras una dosis menor (2.5 mg/kg) tiene un efecto tipo prodepresivo similar al que observamos con el nitroprusiato de sodio en la prueba de nado forzado, aumentando la conducta de inmovilidad a expensas de una disminución no significativa en ambas conductas activas, dosis mayores (de 5 mg/kg en adelante), producen un efecto tipo antidepressivo, disminuyendo la conducta de inmovilidad y aumentando, principalmente, la conducta de nado. Estas diferencias pudieran deberse a que a menor dosis de L-NAME, menor es la inhibición de las sintasas de óxido nítrico, permitiendo que todavía exista una producción lo suficientemente significativa de óxido nítrico como para inducir conductas similares a las observadas con la administración de los donadores de este gasotransmisor. Por otro lado, entre mayor sea la dosis, mayor será la inhibición en la producción de óxido nítrico. Esto coincide con algunas investigaciones que sugieren que las sintasas de óxido nítrico desempeñan distintas funciones en las conductas tipo ansiedad, estando estas conductas relacionadas con la sintasa de óxido nítrico inducible en ratones estresados y, por otro lado, siendo provocadas por la sintasa de óxido nítrico neuronal en ratones no estresados (54). De tal manera que, sería la inhibición completa y no parcial de todas las isoformas de la sintasa de óxido nítrico necesaria para lograr un efecto tipo antidepressivo en cualquier condición.

Sin embargo, justamente debido a esta participación de la sintasa de óxido nítrico neuronal en las conductas tipo ansiedad en ratones estresados y a que, nuestros modelos animales de depresión provocan un estrés significativo en los roedores estudiados, quisimos realizar una inhibición selectiva de esta isoforma utilizando al inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal, 7-nitroindazol (7-NI).

11.d. Determinar la dosis respuesta del inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal, 7-nitroindazol (7-NI), en dos modelos animales de depresión en ratones adultos de la cepa S.W.

Al analizar los resultados obtenidos en nuestro trabajo con la administración del inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal, 7-nitroindazol, observamos igualmente un efecto dual dependiente de la dosis, que únicamente fue significativo en la prueba de nado forzado. Mientras la dosis de 40 mg/kg mostró un efecto tipo prodepresivo al aumentar la conducta de inmovilidad y disminuir de forma importante la conducta de escalamiento, interactuando de esta manera con el sistema catecolaminérgico; las dosis tanto de 20 como de 80 mg/kg demostraron el efecto contrario al aumentar significativamente la conducta de nado, relacionada con el sistema serotoninérgico, y tendiendo a disminuir la conducta de inmovilidad sin que esto último fuera estadísticamente significativo. A pesar de que esto podría parecer contradictorio a los publicado en investigaciones previas y a lo reportado en este mismo trabajo con la administración de nitroprusiato de sodio, otros estudios han encontrado que los efectos del 7-NI sólo fueron observados en ratones estresados y no así en ratones no estresados, mientras que los niveles elevados de nitritos en estos roedores fueron atenuados por la administración de aminoguanidina pero no de 7-NI (54).

Estos resultados podrían una vez más explicarse tanto por la participación de las otras sintasas en la producción de óxido nítrico como las características adaptogénicas del óxido nítrico. Como se mencionó anteriormente, parece ser que además del óxido nítrico de manera directa, son también los niveles excesivos de

GMPc los que pueden llegar a producir estados tipo prodepresivos; la activación de la guanilato ciclasa soluble, responsable de convertir guanosina trifosfato en GMPc, no es una acción exclusivamente realizada por la sintasa de óxido neuronal, sino que también participan la NOS endotelial presente de manera importante en las paredes de los vasos sanguíneos y la NOS inducible que tiene una acción continúa y potente y puede ser inducida por una variedad de citosinas (25,28). Estas dos sintasas de óxido nítrico también se encuentran presentes en el sistema nervioso central, tanto en el endotelio de los vasos sanguíneos cerebrales como en la glia como parte del sistema inmunitario del cerebro, y no se ven afectadas por la administración de 7-NI, permitiendo así la producción de óxido nítrico cerebral en respuesta al estrés al que fueron sometidos los animales.

Asimismo, se sabe que, bajo ciertas circunstancias, las sintasas de óxido nítrico pueden catalizar una oxidación “no acoplada” de NADPH formando superóxido (55). Parece ser que dentro de las tres isoformas, la sintasa de óxido nítrico neuronal es particularmente propensa a catalizar esta reacción en la presencia de ciertos inhibidores de NOS (55). La importancia de esto recae en el hecho de que si las sintasas son capaces de producir una variedad de especies reactivas de nitrógeno al ser inhibidas por ciertos compuestos o en la ausencia de L-arginina y BH₄, esto explicaría las diferencias a veces observadas con los distintos inhibidores utilizados y las isoformas inhibidas (55).

Otra dificultad encontrada con la utilización de inhibidores de las sintasas de óxido nítrico es su selectividad. Mientras que se promueve al 7-nitroindazol como un inhibidor selectivo de la sintasa de óxido nítrico neuronal, la realidad es que su selectividad es comparable a aquella alcanzada con un inhibidor no selectivo como L-NAME. Datos publicados indican que 7-NI inhibe la NOS cerebelar de ratas con una potencia similar a L-NAME y L-NMMA (56), y que su selectividad es menor a 10 veces por lo que en realidad debería de ser considerado como un agente no selectivo (55). Por otro lado, a pesar de que no conocemos con exactitud si la afinidad de estos compuestos por los sitios de unión de las sintasas de óxido nítrico es mayor que la de otras sustancias como *P. granatum*, es importante tenerla en

consideración como una de las posibles explicaciones del bloqueo del efecto de *P. granatum* tras la administración de estos inhibidores observada más adelante.

11.e. Estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y SNP en ratones adultos de la cepa S.W. en dos modelos animales de depresión.

Mientras que con los resultados anteriores podemos inferir la participación del sistema nitrérgico en la generación e inhibición de conductas tipo depresión como ya ha sido reportado en otras investigaciones (1,28), nuestro interés principal se centraba en la intervención de *P. granatum* dentro de este sistema.

Al realizar la combinación de una dosis efectiva de nitroprusiato de sodio (1.0 mg/kg), la cual demostró un efecto tipo prodepresivo, con una dosis efectiva (1.0 mg/kg) de *P. granatum*, se bloquea parcialmente el efecto tipo prodepresivo alcanzado por el primer compuesto. Sin embargo, los grupos con la administración combinada no alcanzan los mismos efectos antidepresivos que el grupo al que solamente se le administró *P. granatum*. Esto nos lleva a pensar que los efectos antidepresivos de *P. granatum* sobre el sistema nitrérgico están relacionados únicamente con su interacción con las sintasas de óxido nítrico y por ende, al agregar un profármaco que aumenta los niveles de óxido nítrico a través de otros mecanismos, *P. granatum* no es lo suficientemente potente como para continuar ejerciendo acciones antidepresivas. Parece ser que de esta forma, el óxido nítrico simula un estado de estrés basal que al agregarse a los niveles de estrés generados por las pruebas conductuales, supera la capacidad de *P. granatum* para combatir los efectos negativos; una vez más recordando algunas de las propiedades adaptogénicas ya mencionadas con el óxido nítrico y que parecen aplicar también a este fitofármaco (42).

Aunque parece que actualmente no hay estudios con dosis combinadas de estos fármacos, las propiedades individuales de *P. granatum* nos permiten concluir que el efecto tipo antidepresivo sobre el sistema serotoninérgico (20), posiblemente está siendo bloqueado de manera anticipada por efectos del nitroprusiato de sodio.

Como ya se mencionó anteriormente, la vía del óxido nítrico se encuentra involucrada en la respuesta biológica al estrés con consecuencias negativas tanto a las células como a la retroalimentación negativa del eje HHA (27), lo que a su vez, puede reducir los niveles de serotonina y puede aumentar de manera aguda, y después agotar, tanto a la noradrenalina como a la dopamina (4); como se puede sugerir a partir de los datos obtenidos en la prueba de nado forzado, con una supresión del efecto de *P. granatum* tanto en la conducta de nado como en la de escalamiento.

Otra posible explicación nos lleva al efecto potencial que *P. granatum* tiene sobre la producción de óxido nítrico, con una disminución de la misma a través de una participación en la expresión de sus sintetas, principalmente la neuronal y la inducible (33). Al ser el nitroprusiato de sodio un profármaco que no participa con las sintetas de óxido nítrico, su administración aumenta la liberación de este gasotransmisor sin importar que su producción se encuentre afectada por la inhibición en su síntesis normal. Esta liberación de óxido nítrico a través de un donador, también llevará al aumento de GMPc como segundo mensajero, el cual se ha visto fuertemente relacionado con estados tipo ansiedad y depresión (26).

Finalmente, el pequeño efecto tipo antidepresivo que permanece con la coadministración de ambos fármacos, al no observarse el mismo resultado que se obtiene con la administración única de nitroprusiato de sodio pudiera deberse a otros mecanismos antidepresivos de *P. granatum* que no están relacionados con la vía de NO-GMPc ni con el sistema serotoninérgico directamente. Uno de estos posibles mecanismos independientes al sistema serotoninérgico y que parecen involucrar al sistema noradrenérgico ha sido descrito con anterioridad y se relaciona con las altas concentraciones de polifenoles en el extracto acuoso de *P. granatum* (20).

11.f. Estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y L-NAME en ratones adultos de la cepa S.W. en dos modelos animales de depresión.

Al querer investigar si *P. granatum* es lo suficientemente efectiva como para facilitar o promover que los inhibidores del óxido nítrico en sus dosis prodepresivas tengan efectos tipo antidepresivos como los observados con otras dosis de estos mismos compuestos, en la combinación utilizamos únicamente la dosis de 2.5 mg/kg de L-NAME y la de 40 mg/kg de 7-NI.

Administrando de manera concomitante 1.0 mg/kg de *P. granatum* con 2.5 mg/kg de L-NAME pudimos observar que existe una inhibición parcial del efecto tipo antidepresivo del fitofármaco. Aunque esto solamente pudo observarse en una de las pruebas (prueba de nado forzado), muy probablemente se debe a los niveles de estrés alcanzados en ambas; mientras que en las dos pruebas los animales son enfrentados a una situación inescapable, en la prueba de suspensión de cola este estrés se considera moderado (57). Con la dosis combinada, en la prueba de nado forzado, la conducta de inmovilidad regresó a los parámetros registrados en el grupo control, perdiendo casi por completo el efecto tipo antidepresivo alcanzado por *P. granatum*. Asimismo, las conductas activas disminuyeron de forma significativa nuevamente demostrando esta inhibición de las acciones de *P. granatum* con la administración de L-NAME. Mientras que este fenómeno podría explicarse por una mayor afinidad de L-NAME por los sitios de unión de las sintasas de óxido nítrico como ya se había mencionado anteriormente, también podría deberse a las propiedades adaptogénicas de *P. granatum*. Diversas investigaciones (42,58) mencionan que la resistencia no específica de un organismo al estrés mediante el incremento en su habilidad para adaptarse y sobrevivir son funciones adaptogénicas comunes y aplicables para todos los fitofármacos. Sin embargo, farmacocinéticamente pueden interferir con otros compuestos (58) y la inhibición competitiva de L-NAME podría estar desplazando las acciones de *P. granatum* sobre las distintas sintasas de óxido nítrico.

Asimismo, una característica particular de los adaptógenos es que actúan como moderadores principalmente en situaciones de estrés leve a moderado (42), lo que podría explicar como *P. granatum* actúa como antidepresivo en las pruebas de

conductuales utilizadas pero pierde su efecto cuando a una prueba que genera una mayor cantidad de estrés por si misma, como la prueba de nado forzado, se le agrega otro componente prodepresivo (L-NAME o SNP).

11.g. Estudiar el efecto de dosis combinadas de *P. granatum* y 7-NI en ratones adultos de la cepa S.W. en dos modelos animales de depresión.

Finalmente, con respecto a la coadministración de *P. granatum* y 7-NI podemos notar que 40 mg/kg de 7-nitroindazol, una dosis con efectos prodepresivos, inhibe totalmente el efecto tipo antidepresivo alcanzado con la aplicación de 1.0 mg/kg de *P. granatum*, esto tanto en la prueba de suspensión de cola como en la de nado forzado. Esto podría explicarse una vez más por la afinidad de los compuestos utilizados, sin embargo, probablemente sería necesario utilizar dosis mayores de *P. granatum* para determinar si esto es suficiente para desplazar al 7-NI de sus sitios de unión.

En la prueba de nado forzado se observa que tanto la conducta de nado como la conducta de escalamiento se modifican, disminuyendo hasta los niveles alcanzados con la aplicación única de 7-NI. A diferencia del experimento anterior en donde se utilizó un inhibidor no selectivo, la inhibición selectiva de la sintasa de óxido nítrico neuronal también tiene un efecto sobre el sistema catecolaminérgico y el efecto de *P. granatum* se ve abolido de manera total; lo que podría demostrar que *P. granatum* interactúa de manera casi exclusiva con esta isoforma y que, al existir una mayor afinidad por el bloqueo de esta, en lugar de por el bloqueo de las 3 sintasas a la par, no es posible observar los efectos de este fitofármaco.

Aunque ya se mencionó la posible participación de otros mecanismos en el efecto tipo antidepresivo de *P. granatum*, parece ser que aquellos relacionados con el óxido nítrico tienen que ver con una disminución en la existencia o producción del mismo o de su segundo mensajero, el GMPc. No obstante, al realizar la combinación de este fármaco con los inhibidores de la sintasa de NO, observamos

que las dosis con efectos prodepresivos no son contrarrestadas por la adición de *P. granatum*. Esto nos lleva a pensar que el bloqueo parcial de las isoformas pudiera interferir de alguna manera con el efecto de *P. granatum* sobre las mismas, aumentando la producción de NO por mecanismos alternativos y compensatorios que no son inhibidos por este compuesto. Nuevamente demostrando como las propiedades adaptogénicas de *P. granatum* pudieran estar interactuando farmacocinéticamente con L-NAME y 7-NI.

11. Conclusiones:

En modelos de depresión el extracto acuoso de *Punica granatum* mostró efectos antidepresivos mediados principalmente por el sistema serotoninérgico.

El óxido nítrico se comporta como un compuesto con propiedades adaptogénicas, ya que el donador de NO y los inhibidores de sus sintasas mostraron efectos prodepresivos. Considerando que un adaptógeno muestra un efecto hormético (dependiente de la dosis).

Únicamente en condiciones de estrés grave el óxido nítrico logró inhibir las acciones de *P. granatum*.

Contrario a lo esperado, el bloqueo de la síntesis de óxido nítrico no facilitó las acciones antidepresivas *P. granatum*, por lo que se propone que los inhibidores de las sintasas de óxido nítrico a ciertas dosis podrían estar desplazando a *P. granatum* de sus sitios de unión. Lo que se tendría que confirmar en un trabajo posterior.

12. Perspectivas:

Debido a que las hormonas sexuales femeninas, principalmente los estrógenos, participan de manera significativa en el estado de ánimo, sería importante determinar el efecto de la administración aguda de *P. granatum* en modelos animales de depresión utilizando ratones hembras no ovariectomizadas y ovariectomizadas.

Por otro lado, sabemos que la activación del eje HHA ante el estrés provoca una activación de las sintasas de óxido nítrico neuronal que colonizan en este eje mediada directamente por el cortisol, con un aumento posterior del óxido nítrico. Sin embargo, también es importante determinar qué papel juega el óxido nítrico sobre que vemos con los corticoides.

También sería importante determinar la relación directa de *P. granatum* sobre el sistema nitrérgico utilizando estudios moleculares que demuestren su efecto sobre la producción de óxido nítrico y la expresión e inhibición de sus sintasas; además de elucidar las posibles interacciones farmacocinéticas provocadas por sus propiedades adaptogénicas.

Las características adaptogénicas podrían ser demostradas utilizando distintos niveles de estrés al utilizar varias pruebas conductuales, con varios esquemas de administración (agudo, subagudo y crónico), con sujetos experimentales de distintas edades (adolescentes y adultos) y sexo (machos y hembras), y al realizar combinaciones de diferentes dosis.

Para determinar si *P. granatum* está siendo desplazada por los inhibidores de las sintasas de óxido nítrico, sería importante analizar el mecanismo de acción de *P. granatum* sobre los sitios de unión en las sintasas de óxido nítrico.

Como se mencionó con anterioridad, el aumento del GMPc, el segundo mensajero del óxido nítrico, también ha demostrado efectos prodepresivos; sería importante determinar si las acciones antidepresivas de *Punica granatum* se atribuyen en parte a una inhibición no solamente de las sintasas de óxido nítrico sino también a una acción sobre este compuesto.

Esto podría realizarse utilizando inhibidores de la vía del GMPc como la fosfodiesterasa 5 así como fármacos que inhiben a esta fosfodiesterasa como el sildenafil.

13. Referencias:

1. Jesse CR, Wilhelm EA, Bortolatto CF, Rocha JBT, Nogueira CW. Involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of bis selenide in the mouse tail suspension test. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010;635(1–3):135–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.019>
2. Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr* [Internet]. 2017;27(2017):101–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
3. Sadock B, Sadock V, Ruiz P. Kaplan & Sadock's Study Guide and Self-Examination Review in Psychiatry. Ninth Edit. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 142–155 p.
4. Stahl SM. *Psicofarmacología Esencial de Stahl: Bases neurocientíficas y aplicaciones prácticas*. Cuarta edi. Cambridge University Press; 2013. 237–369 p.
5. Harro J, Oreland L. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: A case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Rev*. 2001;38(1–2):79–128.
6. Abdallah CG, Sanacora G, Duman RS, Krystal JH. The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation? *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;#pagerange#.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.010>

7. Kumar A, Chanana P. Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target [Internet]. 1st ed. Vol. 103, Vitamins and Hormones. Elsevier Inc.; 2017. 147–167 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2016.09.004>
8. Ly M, Yu GZ, Mian A, Cramer A, Meysami S, Merrill DA, et al. Neuroinflammation: A Modifiable Pathway Linking Obesity, Alzheimer's disease, and Depression. *Am J Geriatr Psychiatry* [Internet]. 2023;31(10):853–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2023.06.001>
9. Martin CR, Hunter L-A, Patel VB, Preedy VR, Rajendram R. The Neuroscience of Depression. *The Neuroscience of Depression*. 2021.
10. Skolnick P. Antidepressants for the new millennium. Vol. 375, *European Journal of Pharmacology*. 1999. p. 31–40.
11. Bala A, Nguyen HMT, Hellstrom WJG. Post-SSRI Sexual Dysfunction: A Literature Review. *Sex Med Rev* [Internet]. 2018;6(1):29–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2017.07.002>
12. Khawam EA, Laurencic G, Malone DA. Side effects of antidepressants: An overview. *Cleve Clin J Med*. 2006;73(4):351–61.
13. Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* [Internet]. 2018;391(10128):1357–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32802-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32802-7)
14. Bhattacharya T, Dey PS, Akter R, Kabir T, Rahman H, Rauf A. Effect of natural leaf extracts as phytomedicine in curing geriatrics. *Exp Gerontol* [Internet]. 2021;150(April):111352. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111352>
15. Nigam M. Phytomedicine: Scope and current highlights [Internet]. *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders: The Development of Nutraceuticals and Traditional Medicine*. Elsevier Inc.; 2020. 39–54 p.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-820284-5.00013-7>

16. Machado JCB, Ferreira MRA, Soares LAL. Punica granatum leaves as a source of active compounds: A review of biological activities, bioactive compounds, food, and technological application. *Food Biosci.* 2023;51(October 2022).
17. Maphetu N, Oshlomame Unuofin J, Prenate Masuku N, Olisah C, Lucky Lebelo S. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of Punica granatum L. (pomegranate) plant extracts: A review. Vol. 3, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2022. p. 15–24.
18. Riaz A, Khan RA. Effect of Punica granatum on behavior in rats. *African J Pharm Pharmacol.* 2014;8(44):1118–26.
19. Rahman SA, Kadar BA, Taufik M, Baharuldin H, Aris M, Moklas M. Antidepressant-like effect of methanolic extract of Punica granatum (pomegranate) in mice model of depression. 2015;(June). Available from: www.jnpbr.com
20. Valdés-Sustaita B, Estrada-Camarena E, González-Trujano ME, López-Rubalcava C. Estrogen receptors- β and serotonin mediate the antidepressant-like effect of an aqueous extract of pomegranate in ovariectomized rats. *Neurochem Int.* 2021;142(November 2020).
21. Aleksandrova S, Alexova R, Dragomanova S, Kalfin R, Nicoletti F, Fagone P, et al. Preventive and Therapeutic Effects of Punica granatum L. Polyphenols in Neurological Conditions. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3).
22. Gittleman L. *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology.* Springer. 2014.
23. Mahoney EJ, Albina JE. Nitric oxide. *Metab Ther Asp Amin Acids Clin Nutr* Second Ed. 2003;29(6):211–40.
24. Tsuchiya T, Kishimoto J, Koyama J, Ozawa T. Modulatory effect of L-NAME, a specific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, on stress-induced changes in plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone levels in rats: Physiological significance of stress-induced NOS activation in hypotha. *Brain Res.* 1997;776(1–2):68–74.

25. Moustafa A. Changes in nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen sulfide and male reproductive hormones in response to chronic restraint stress in rats. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2021;162(July 2020):353–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.315>
26. Pałasz A, Menezes IC, Worthington JJ. The role of brain gaseous neurotransmitters in ° anxiety. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2021;73(2):357–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00242-2>
27. Bruenig D, Morris CP, Mehta D, Harvey W, Lawford B, Young RMD, et al. Nitric oxide pathway genes (NOS1AP and NOS1) are involved in PTSD severity, depression, anxiety, stress and resilience. *Gene* [Internet]. 2017;625(April):42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.048>
28. Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2011;24(3):125–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.02.002>
29. Lorigooini Z, Salimi N, Soltani A, Amini-Khoei H. Implication of NMDA-NO pathway in the antidepressant-like effect of ellagic acid in male mice. *Neuropeptides* [Internet]. 2019;76(April):101928. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.04.003>
30. Wang Q, Timberlake MA, Prall K, Dwivedi Y. The recent progress in animal models of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2017;77:99–109. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.008>
31. Beheshti F, Hashemzahi M, Hosseini M, Marefati N, Memarpour S. Inducible nitric oxide synthase plays a role in depression- and anxiety-like behaviors chronically induced by lipopolysaccharide in rats: Evidence from inflammation and oxidative stress. *Behav Brain Res* [Internet]. 2020;392(May):112720. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112720>
32. Akpınar A, Yaman GB, Demirdas A, Onal S. Possible role of adrenomedullin and nitric oxide in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2013;46:120–5. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.07.003>

33. Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chem* [Internet]. 2010;118(2):315–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.123>
34. Kazemirad H, Kazerani HR. The anti-arrhythmic effects of pomegranate (*Punica granatum*) are mainly mediated by nitric oxide. *J Berry Res*. 2020;10(4):573–84.
35. Gupta M, Sharma P, Mazumder AG, Patial V, Singh D. Dwindling of cardio damaging effect of isoproterenol by *Punica granatum* L. peel extract involve activation of nitric oxide-mediated Nrf2/ARE signaling pathway and apoptosis inhibition. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2015;50:105–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2015.09.002>
36. Ahmed E. Abdel Moneim. Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. *J Med Plants Res*. 2012;6(2):195–9.
37. Rajan S, Mahalakshmi S, Deepa V, Sathya K, Shajitha S, Thirunalasundari T. Antioxidant potentials of *Punica granatum* fruit rind extracts. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(3):82–8.
38. Umathe SN, Bhutada PS, Jain NS, Mundhada YR, Borkar SS, Dhumal B. Role of nitric oxide in obsessive-compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2009;21(2):140–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.07.001>
39. O'Neil MF, Moore NA. Animal models of depression: Are there any? *Hum Psychopharmacol*. 2003;18(4):239–54.
40. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *J Vis Exp*. 2011;(58):4–8.
41. Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res*. 1995;73(1–2):43–6.
42. Panossian A. Understanding adaptogenic activity: specificity of the

- pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1401(1):49–64.
43. Hottinger DG, Beebe DS, Kozhimannil T, Prielipp RC, Belani KG. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2014;30(4):462–71.
 44. Vogt MA, Vogel AS, Pfeiffer N, Gass P, Inta D. Role of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in the antidepressant effect of ketamine in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2015;25(10):1848–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.06.012>
 45. Orfanidou MA, Lafioniatis A, Trevlopoulou A, Touzlatzi N, Pitsikas N. Acute and repeated exposure with the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) differentially modulate responses in a rat model of anxiety. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2017;69:56–60.
 46. Papageorgoulis A, Fallon P, Mpalantes N, Papageorgouli D, Pitsikas N. Repeated but not acute exposure with a low dose range of the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) induces anxiolytic-like behaviour in a dose-independent manner in two different rat models of anxiety. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2020;99(March):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.03.005>
 47. Kaster MP, Ferreira PK, Santos ARS, Rodrigues ALS. Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: Possible involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway. *Behav Brain Res.* 2005;165(2):204–9.
 48. Mantovani M, Pértile R, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett.* 2003;343(1):1–4.
 49. Rosa AO, Lin J, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res.* 2003;144(1–2):87–93.
 50. Zomkowski ADE, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS.

- Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*. 2002;13(4):387–91.
51. Karolewicz B, Paul IA, Antkiewicz-Michaluk L. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. *Pol J Pharmacol*. 2001;53(6):587–96.
 52. Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci*. 2010;30(7):2433–41.
 53. Czech DA, Jacobson EB, LeSueur-Reed KT, Kazel MR. Putative anxiety-linked effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME in three murine exploratory behavior models. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;75(4):741–8.
 54. Gilhotra N, Dhingra D. Involvement of NO-cGMP pathway in anti-anxiety effect of aminoguanidine in stressed mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2009;33(8):1502–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.08.012>
 55. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(3):593–615.
 56. Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol*. 1993;110(1):225–8.
 57. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *J Vis Exp*. 2011;(58):2–7.
 58. Siwek M, Woron J, Wrzosek A, Gupał J, Chrobak AA. Harder, better, faster, stronger? Retrospective chart review of adverse events of interactions between adaptogens and antidepressant drugs. *Front Pharmacol*. 2023;14(September).
 59. Kaneko N, Wada M, Takano M, Taniguchi K, Honda S, Nakajima S, et al. Impaired neuroplasticity in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with treatment-resistant depression indexed by paired associative stimulation paradigm and a combined TMS-EEG measurements. *Brain Stimul* [Internet]. 2023;16(1):240. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brs.2023.01.371>

60. Wang YT, Zhang NN, Liu LJ, Jiang H, Hu D, Wang ZZ, et al. Glutamatergic receptor and neuroplasticity in depression: Implications for ketamine and rapastinel as the rapid-acting antidepressants. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2022;594:46–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.024>
61. Serrano J, Hegadoren K, Malykhin N. 335. Impact of Chronic Stress and Cortisol on Hippocampal Neuroplasticity: Implications for Depression. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2023;93(9):S229. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.02.575>
62. Dols A, Loef D, van Eijndhoven P, Tendolkar I, Rozenmuller A, Hoozemans J, et al. Upregulation of Neuroplasticity Marker Doublecortin in the Human Post-Mortem Brain After Electroconvulsive Therapy. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2022;91(9):S56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.02.159>

14. Anexo I

14.1. Neurogénesis y neuroplasticidad

Se conoce como neuroplasticidad a la capacidad del cerebro para crear y eliminar sinapsis, y alterar circuitos funcionales en los procesos de adaptación y aprendizaje. Para que esto sea posible, uno de los factores moleculares requeridos, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), promueve la supervivencia de neuronas existentes, así como el crecimiento y diferenciación de nuevas neuronas y sinapsis (2).

Alteraciones en la neuroplasticidad de regiones ejecutivas dorsales, incluyendo la corteza prefrontal dorsolateral, así como el hipocampo han sido reportadas en la depresión (59). Acumulación de excitotoxicidad glutamatérgica y disrupción en la neuroplasticidad resulta en un decremento en las ramas dendríticas y en la densidad espinal de neuronas piramidales, finalmente ocasionando atrofia neuronal en estas regiones. Otras anormalidades asociadas con la neuroplasticidad

también observadas en la depresión incluyen un ciclo glutamatérgico disfuncional y aumento en los niveles de glutamato en plasma y líquido cefalorraquídeo (60). Estudios preclínicos también han demostrado que el estrés crónico puede suprimir la neurogénesis en el giro dentado de adultos que contribuye en la reducción del volumen hipocampal en el trastorno depresivo (61).

La expresión de niveles de BDNF, necesarios para la potenciación hipocampal a largo plazo, se ve reducida en la depresión, lo cual promueve a su vez sinapsis debilitadas y atrofia neuronal, con mayores cambios funcionales y estructurales (60). Los medicamentos antidepresivos y procedimientos como la estimulación magnética transcraneal (TMS) y la terapia electroconvulsiva (TEC), aumentan la neurogénesis hipocampal al aumentar los niveles de BDNF y, por ende, la neuroplasticidad (2). En estudios de resonancia magnética se ha observado un aumento consistente en el volumen hipocampal, especialmente en la región del giro dentado, en pacientes que recibieron tratamiento con TEC (62).

14.2. Neuroconectividad

Hipotéticamente, cada uno de los síntomas de la depresión se encuentra relacionado con información procesada de manera deficiente en diversos circuitos neuronales que topográficamente se encuentran localizados en regiones cerebrales específicas.

Las principales proyecciones dopaminérgicas que se originan en el área tegmental ventral y *sustancia nigra* del tallo cerebral ascienden vía el hipotálamo hasta la corteza prefrontal, el prosencéfalo basal, el núcleo estriado y el núcleo *accumbens*, se relacionan con el movimiento, el placer y la recompensa, la cognición, y la psicosis. Proyecciones directas del sistema talámico-dopaminérgico, intervienen por su parte en el sueño y la activación (4).

Por otro lado, las proyecciones noradrenérgicas ascendentes que se originan en el *locus coeruleus* del tallo regulan el estado de ánimo, la activación y la cognición

principalmente, mientras que aquellas que descienden hacia la médula espinal se encargan de regular las vías del dolor (4).

Finalmente, las principales proyecciones serotoninérgicas que se originan en los núcleos del rafé del tallo cerebral y se extienden a diversas proyecciones como el núcleo estriado y el núcleo *accumbens* regulan el estado de ánimo, la ansiedad y el sueño. Las proyecciones que descienden a la médula espinal también están implicadas en las vías del dolor (4).

Estudios de neuroimagen han demostrado cambios en la conectividad funcional de estos circuitos involucrados en diversas funciones. Mientras el sistema límbico como la amígdala, el hipocampo, los núcleos de la base y el núcleo *accumbens* se encargan de mediar emociones crudas no procesadas, regiones corticales superiores como la corteza prefrontal y la corteza del cíngulo se encargan del procesamiento cognitivo de las emociones y de una inhibición “*top-down*”. Por lo tanto, la depresión puede estar causada por un fenómeno “*bottom-up*” en el cual la hiperactividad crónica de los centros límbicos y del tallo sobrepasan este mecanismo inhibitorio por una hipoactividad o hipoconectividad en la corteza (2).