

Plantas medicinales con efectos en modelos de ansiedad y depresión en ratones

Ángel Josabad **Alonso Castro**
Deisy **Gasca Martínez**
Clara Alba **Betancourt**

Se estima que hay más de 400 millones de personas en el mundo que padecen algún trastorno mental, tales como la ansiedad y la depresión, que ocasionan discapacidad física y mental, pérdida de productividad laboral y pueden ocasionar una muerte prematura (OMS, 2017).

Más de 250 millones de personas presentan un diagnóstico de depresión y de ansiedad. En muchos casos se pueden padecer ambas afecciones al mismo tiempo (OMS, 2017). En México se estima que aproximadamente el 20 % de la población adulta presenta al menos un trastorno mental en algún momento de su vida (Valencia, 2018). La ansiedad y la depresión tienen una prevalencia del 14.3 % y 7.2 %, respectivamente, entre la población mexicana (Medina *et al.*, 2003). Su frecuencia es mayor en las mujeres que en los hombres, y en mayor proporción la edad de inicio de estos trastornos es a los 21 años (Medina *et al.*, 2003). Como resultado, uno de cada diez pacientes mexicanos con ansiedad y depresión buscan apoyo o atención médica (Valencia, 2018).

Esto representa un grave problema de salud debido a que el estado de salud mental repercute en la vida cotidiana de cada persona y en su entorno. Además, muchos de

estos pacientes recurren a otro tipo de alternativas como son las plantas medicinales.

MODELOS ANIMALES PARA EVALUAR EFECTOS ANSIOLÍTICOS Y ANTIDEPRESIVOS DE FÁRMACOS

La ansiedad ha sido ampliamente estudiada en roedores; algunos modelos se basan en respuestas condicionadas (aprendidas y/o entrenadas); un ejemplo de este tipo de modelos son las pruebas de conflicto de Vogel (Vogel *et al.*, 1971). Otros modelos buscan medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos, y son considerados como modelos de respuestas no condicionadas (no requieren entrenamiento). Aquí, el objetivo principal es evaluar la ansiedad ante situaciones específicas en que el roedor es expuesto a situaciones que le son estresantes, como un espacio abierto, alto o a luz intensa (Bourin *et al.*, 2007). En nuestros estudios se han usado ratones macho de la cepa Balb/c con un peso aproximado entre 24 y 32 gramos y entre 5 y 8 semanas de edad. Cada grupo experimental contiene de 5 a 7 ratones. Los grupos de estudio consisten en: a) un grupo vehículo, en el cual los ratones reciben solamente solución salina, b) un control positivo que corresponde a fármacos de referencia como el clonazepam (ansiolítico) a una dosis de 1.5 mg/kg o la fluoxetina (antidepresivo) a una dosis de 20 mg/kg, y c) el grupo experimental, que consiste en evaluar los compuestos obtenidos de plantas medicinales a dosis entre 1 a 100 mg/kg. Todos los tratamientos son administrados en forma oral a los ratones.

A continuación se describen algunas de las pruebas que usamos en nuestro grupo de investigación para evaluar los patrones de actividad exploratoria espontánea en animales expuestos a ambientes desconocidos que, invariablemente, incluyen áreas de seguridad. Como ejemplo de este tipo de tareas conductuales utilizamos el campo abierto, la transición luz-oscuridad y el laberinto en cruz elevado, en las que evaluamos los efectos

neurofarmacológicos de extractos de plantas medicinales y compuestos de origen natural. Estas pruebas conductuales tienen una duración aproximada de entre 5 y 7 minutos, los animales no sufren ningún daño, y antes de iniciar cada experimento enviamos los protocolos a comités de ética para tener la aprobación correspondiente.

LABERINTO EN CRUZ ELEVADO

El laberinto en cruz elevado (LCE) es reconocido como uno de los modelos experimentales de ansiedad más utilizados para el bioensayo de fármacos ansiolíticos (Pellow, 1986). Sus inicios están en las investigaciones de Montgomery (1952) sobre conductas exploratorias en callejones abiertos y cerrados. Este modelo, basado en la libre exploración que muestran los roedores ante un ambiente novedoso, permite a través de su arquitectura elegir entre dos zonas distintas: un par de brazos abiertos (expuestos, con facilidad de caer al vacío), y un par de brazos cerrados (zona de resguardo), además de un área central, este aparato está elevado a 40 cm del suelo. El animal es colocado en el centro del aparato y se le permite explorar las zonas por cinco minutos. Se evalúa el número de entradas y el tiempo en cada uno de los brazos, expresados en porcentaje. Con estos valores se determina el comportamiento de ansiedad en ratones. Entre mayor sea el porcentaje de entradas y el tiempo en brazos abiertos, mayor será la posibilidad de que el extracto natural o el compuesto administrado estén produciendo un efecto ansiolítico, es decir, está disminuyendo el estrés en los animales. Por el contrario, si el animal decide permanecer en los brazos más protegidos (cerrados) indica que su nivel de ansiedad es mayor (Polanco *et al.*, 2011).

TRANSICIONES LUZ-OSCURIDAD

Este modelo se basa en la aversión natural de los roedores a espacios iluminados (Crawley y Goodwin, 1980). La experimentación se realiza en una caja de dos compartimentos blanco-negro, en un tiempo determinado, generalmente cinco minutos,

en los cuales el animal explora libremente el compartimento oscuro que le brinda protección y el compartimento iluminado en donde el animal está desprotegido. Un índice de actividad ansiolítica en los ratones se observa cuando hay un incremento en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado y cuando hay un mayor número de entradas en el compartimento iluminado (Bourin *et al.*, 2007).

CAMPO ABIERTO

La prueba de campo abierto fue creada por Hall (1934), y en este contexto es una prueba ampliamente utilizada para evaluar las conductas que se producen al colocar el animal en un espacio abierto nuevo, encerrado por una barrera transparente que no le permite escapar. El comportamiento de ansiedad es provocado por la agorafobia (el espacio es muy grande en relación con su hábitat natural), de forma tal que se desencadena ansiedad por el miedo al espacio abierto en que se ve obligado a permanecer. La mayoría de los roedores presenta una tendencia a pasar la mayor parte del tiempo en cercanía a las paredes, lo que denota un estado muy ansioso en ellos. Además, la inmovilidad inicial en un campo abierto es un índice de ansiedad, por lo que la latencia para moverse una distancia determinada (o moverse a través de un número determinado de cuadrados) también se puede utilizar para evaluar el miedo y la ansiedad. Los parámetros que se miden en esta prueba son la distancia recorrida, el tiempo en movimiento y, en particular, el número de cruces por la zona central (zona de ansiedad por ser la más expuesta o abierta) y el tiempo de duración en la misma (Gould *et al.*, 2009). Si el extracto natural o el compuesto presentan efectos ansiolíticos, los animales permanecerán más tiempo en la zona central.

PRUEBA DE SUSPENSIÓN DE LA COLA

Esta prueba se basa en el método de Steru *et al.* (1985) y simula un comportamiento de depresión, en el cual los animales son impuestos a un estado

de depresión aguda provocada por su inmovilidad mediante la suspensión de la cola durante seis minutos. Se coloca un pedazo de cinta adhesiva en el extremo de la cola del ratón y se suspende al ratón a 40 cm del suelo. Al inicio del estudio, el animal trata de escapar mediante la realización de movimientos enérgicos y luego, al cabo de unos minutos, se queda estático. En esta prueba se cuantifica el tiempo de inmovilidad de los roedores. Si el extracto o compuesto presenta efectos antidepresivos, los animales estarán más tiempo en movimiento.

COMPUESTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON EFECTOS ANSIOLÍTICOS Y ANTIDEPRESIVOS INVESTIGADOS EN NUESTRO GRUPO DE TRABAJO

La medicina tradicional mexicana cuenta con el registro aproximado de 50 plantas usadas para trastornos mentales (López-Ruvalcaba y Estrada-Camarena, 2016). De estas especies, el 60 % cuenta con estudios preclínicos y el 8 % cuenta con estudios clínicos (López-Ruvalcaba y Estrada-Camarena, 2016). Los estudios clínicos proveen información sobre la eficacia y seguridad de una planta medicinal, mientras que los estudios preclínicos proporcionan información preliminar para realizar un estudio clínico. Por lo cual, solo las plantas con estudios clínicos podrían ser usadas en seres humanos.

Entre las plantas de México usadas para el tratamiento empírico de la depresión y la ansiedad se encuentran la *Salvia tilifolia* (Adewusi *et al.*, 2011, Tene *et al.*, 2007), la *Senna septemtrionalis* (Gonzalez-Elizondo *et al.*, 2004), y la *Agastache mexicana ssp. mexicana* (López-Ruvalcaba y Estrada-Camarena, 2016), todas ellas nativas de México. De estas plantas identificamos y obtuvimos, mediante técnicas de cromatografía de gases y líquidos, resonancia magnética nuclear, etc., el diterpeno tilifodiolido (de la *Salvia tilifolia*), el poliol cíclico D-pinitol (de la *Senna septemtrionalis*) y el flavonoide gardenin A (de la *Agastache mexicana ssp. mexicana*) (Figura 1).

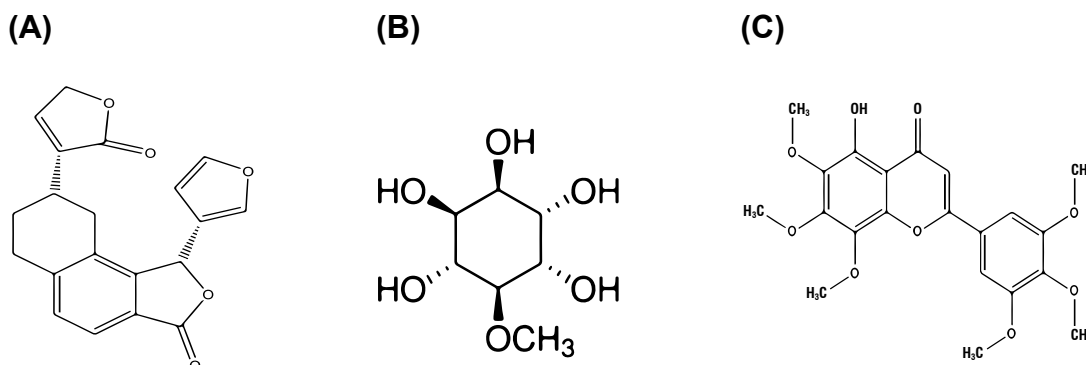


Figura 1. Estructuras químicas de tilifodiolido (A), D-pinitol (B) y gardenin A (C).

El tilifodiolido se ha aislado solamente de otras especies del género *Salvia*. Además de nuestros reportes, no hay otros estudios sobre los efectos farmacológicos de este compuesto. El D-pinitol se obtiene de muchas plantas, incluidas muchas leguminosas, y presenta también efectos antidiabéticos. La gardenin-A se ha obtenido de varias plantas medicinales y se ha reportado que presenta efectos antioxidantes y vasorrelajantes.

De los tres compuestos analizados, la gardenin-A (25 mg/kg) mostró los mejores efectos antidepresivos al disminuir en un 62 % el tiempo de inmovilidad de los roedores en la prueba de suspensión de la cola. El efecto antidepresivo inducido por estos tres compuestos se vio inhibido cuando se administró a los ratones el fármaco yohimbina, el cual es un inhibidor de los receptores α_2 de la noradrenalina. Estos resultados sugieren que el sistema noradrenérgico sería la vía por la cual actúan estos compuestos vegetales. La noradrenalina es un neurotransmisor cuyas concentraciones se encuentran disminuidas en el cerebro de pacientes con depresión (Ortega *et al.*, 2008).

Nuestro trabajo no concluye que estos compuestos incrementen la concentración de noradrenalina en el cerebro de los roedores, solo dieron resultados preliminares que sugieren que pudieran estar actuando sobre el sistema regulado por la noradrenalina. Cada uno de estos compuestos incrementó, con respecto al grupo vehículo (es

decir, sin ningún tratamiento), el tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado. Asimismo, estos compuestos incrementaron el tiempo y el número de entradas en el compartimento iluminado en el modelo de transiciones luz-oscuridad, y aumentaron el número de cruces y el tiempo de permanencia en la zona central en el campo abierto. De estos tres compuestos, la gardenin-A (25 mg/kg) mostró los mejores efectos ansiolíticos, lo cual se tradujo en incrementar en 2.5 veces, con respecto al grupo vehículo, el tiempo y número de entradas en los brazos abiertos. La gardenin-A (25 mg/kg) incrementó en 2 y 2.5 veces el tiempo de permanencia y el número de entradas en el compartimento iluminado. Finalmente, este mismo compuesto a una dosis de 25 mg/kg incrementó en 1.6 veces el número de cruces y el tiempo de permanencia en la zona central en el campo abierto (Alonso-Castro *et al.*, 2020).

Adicionalmente, usamos un modelo de convulsiones en el cual se administró pentilentetrazol, un fármaco que a una dosis 90 mg/kg ocasiona convulsiones en ratones. Gardenin-A (25 mg/kg) inhibió las convulsiones en ratones en un 62 %. Los efectos ansiolíticos y anticonvulsivantes mostrados por gardenin-A se vieron inhibidos cuando se presentó la administración previa en los ratones de bicuculina 0.7 mg/kg (Alonso-Castro *et al.*, 2020). Este resultado sugirió que los efectos ansiolíticos y anticonvulsivantes del D-pinitol se asociaron con la participación del sistema GABAérgico. GABA (ácido



© **Angela Arziniaga**. De la serie *Astilleros Unidos de Veracruz III*. Impresión a la plata, 1983.

gamma-aminobutírico) es un neurotransmisor que inhibe la actividad neuronal. En los procesos convulsivos existe una actividad neuronal exacerbada que se traduce en convulsiones debido a que no hay GABA suficiente para regular al cerebro en su actividad neuronal (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2007). En el caso de la ansiedad, los niveles de GABA se pueden encontrar disminuidos, lo cual se traduce en un estado de alerta constante como puede ser insomnio, sudoración, intranquilidad, etcétera (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2007). GABA es un blanco terapéutico muy importante para

disminuir la actividad cerebral aumentada en la ansiedad y durante las convulsiones que se producen en enfermedades como la epilepsia. De igual manera que para la noradrenalina, nosotros no determinamos si los compuestos probados incrementan la concentración de GABA en los roedores. Los resultados solo sugieren que estas sustancias pudieran actuar a través de este neurotransmisor.

Además, es importante señalar que ninguno de estos compuestos alteró la coordinación motora en ratones, ni indujo sedación y tampoco afectaron las capacidades locomotoras en los ratones, como producir un efecto de relajación muscular. Estas son reacciones adversas que se presentan con el uso de fármacos ansiolíticos y antidepresivos (Wintz, 1998). La actividad ansiolítica y antidepresiva mostrada por estos compuestos fue muy similar a la mostrada por fármacos de referencia como son el clonazepam y la fluoxetina, respectivamente.

La importancia de nuestro trabajo radica en que estos compuestos, principalmente la gardenin-A, pueden ser una alternativa de tratamiento para esta clase de enfermedades que afecta en gran manera

© **Angela Arziniaga**. De la serie *Astilleros Unidos de Veracruz II*. Impresión a la plata, 1983.



a la población mundial. La información obtenida es, por el momento, a nivel preclínico; nuestros datos actuales no significan que estos compuestos ya se pueden usar en seres humanos. Aún necesitamos saber el tiempo que cada uno de estos compuestos tarda en ser metabolizado por el organismo y el tiempo que va a permanecer dentro del mismo (estudios farmacocinéticos); también necesitamos conocer si causan algún efecto tóxico en el organismo. Experimentos que se están llevando a cabo actualmente en nuestro grupo de investigación evaluarán y explicarán a profundidad los mecanismos moleculares por los cuales estos compuestos ejercen sus efectos en los modelos de ansiedad y depresión en roedores. Asimismo, estamos cuantificando diversos neurotransmisores en el cerebro de ratones tratados con los compuestos de origen vegetal.

REFERENCIAS

- Adewusi EA, Moodley N and Steenkamp V (2011). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S Afr J Bot* 77(3):638-644.
- Alba-Betancourt C, Sánchez-Recillas A and Alonso-Castro AJ *et al.* (2019). Antidiarrheal, vasorelaxant, and neuropharmacological actions of the diterpene tilifodiolide. *Drug Develop Res* 80(7):981-991.
- Alonso-Castro AJ, Alba-Betancourt C and Rocha-González E *et al.* (2019). Neuropharmacological effects of D-pinitol and its possible mechanisms of action. *J Food Biochem* 43(12):e13070.
- Alonso-Castro AJ, Gasca-Martínez D, Cortez-Mendoza LV *et al.* (2020). Evaluation of the neuropharmacological effects of Gardenin A in mice. *Drug Develop Res* 81(5):600-608.
- Aroniadou-Anderjaska V, Qashu F and Braga MF (2007). Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders. *Amino Acids* 32(3):305-315.
- Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN *et al.* (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clinical Pharmacol* 21(6):567-574.
- Crawley JN and Goodwin FK (1980). Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13(2):167-170.
- González-Elizondo M, López-Enríquez IL, González-Elizondo MS *et al.* (2004). Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango, p. 210. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Gould TD, Dao DT and Kovacsics CE (2009). The Open Field Test. In: Gould T. (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Neuromethods*, vol 42. Totowa, NJ: Humana Press.
- Hall CS (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as a measure of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18(3):385-403.
- López-Rubalcava C and Estrada-Camarena E (2016). Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *J Ethnopharmacol* 186:377-391.
- Montgomery KC (1952). Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. *J Comp Physiol Psychol* 45(1):50-57.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) Mental, 2017. Consultado en: http://www.who.int/mental_health/world-mental-health-day/2017/es/.
- Ortega JE, Callado LE y Meana JJ (2008). El sistema noradrenérgico en la neurobiología de la depresión. *Psiquiatría Biológica* 15(5):162-174.
- Pellow S (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodents valid? *Methods Fin Exp Clin Pharmacol* 8(9):557-565.
- Polanco LC, Vargas-Irwin C y Góngora ME (2011). Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica* 18:141-148.
- Medina ME, Borges G, Lara C *et al.* (2003). Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental* 26:1-16.
- Steru L, Chermat R, Thierry B *et al.* (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3):367-370.
- Tene V, Malagón O, Finzi PV *et al.* (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *J Ethnopharmacol* 111(1):63-81.
- Valencia M (2018). Remisión y recuperación funcional. En: *Depresión, trastornos bipolar y esquizofrenia*. APM Ediciones y Convenciones en Psiquiatría, 978- 607-8512-88-1.
- Vogel JR, Beer B and Clody DE (1971). A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 21(1):1-7.
- Wintz CJ (1998). Nursing management of psychotropic drug reactions. *Nurs Clin North Am* 33(1):217-231.

Ángel Josabad Alonso Castro
Clara Alba Betancourt
Departamento de Farmacia
División de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Guanajuato, México
angeljosabad@ugto.mx

Deisy Gasca Martínez
Unidad de Análisis Conductual
Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México
Campus Juriquilla, Querétaro, México