



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Modificación estructural y evaluación tipo antidepresiva
en ratones de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina aislada de
Casimiroa pubescens

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ROBERTO DE LA ROSA SIERRA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL:	Profesor:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
SECRETARIO:	Profesor:	Dr. Mariano Martínez Vázquez
1er. SUPLENTE:	Profesor:	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
2° SUPLENTE:	Profesor:	Dra. Mabel Clara Fragoso

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mariano Martínez Vázquez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Denisse Ubaldo Suárez

SUSTENTANTE (S):

Roberto De la Rosa Sierra

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Depresión	4
2.2. Neurobioquímica de la depresión	8
2.2.1. Hipótesis catecolaminérgica	9
2.2.2. Hipótesis monoaminérgica	10
2.2.3. Hipótesis de la serotonina	13
2.3. Antidepresivos	16
2.4. Modelos animales para el estudio de la depresión	25
2.4.1. Modelo de Suspensión en Cola	27
2.4.2. Modelos de Nado Forzado	28
2.5. Género <i>Casimiroa</i>	30
2.5.1. <i>Casimiroa pubescens</i>	34
2.5.2. Antecedentes farmacológicos y químicos de <i>Casimiroa pubescens</i> sobre el SNC	36
3. Justificación	43
4. Hipótesis	44
5. Objetivos	45
5.1. Objetivo general.	45
5.1.1. Objetivos particulares.	45
6. Diseño experimental.	46
7. Materiales y Métodos.	47
7.1. Material vegetal.	48
7.2. Obtención del extracto de hexano de la corteza de raíces de <i>Casimiroa pubescens</i> . . .	48
7.3. Aislamiento de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina.	49
7.4. Obtención de 3-(1',1'-dimetil-propil)-herniarina.	50
7.5. Evaluación farmacológica	50
7.6. Animales	50
7.7. Fármacos y sustancias utilizados	51
7.8. Modelo de Nado Forzado	51
7.9. Modelo de Suspensión en Cola	53

7.10. Modelo de Campo Abierto	55
7.11. Análisis estadístico	56
8. Resultados	57
8.1 Resultados químicos	57
8.1.1. Modificaciones estructurales	59
8.2. Resultados farmacológicos	61
8.2.1. Modelo de Nado Forzado	61
8.2.2. Modelo de Suspensión en Cola	64
8.2.3. Evaluación de la actividad locomotriz en el Modelo de Campo Abierto	67
9. Discusión de resultados	68
10. Conclusiones	73
11. Referencias	74

Figura 1. Síntomas más comunes que presentan los pacientes con depresión	5
Figura 2. La neurona monoaminérgica y el sitio de acción de los antidepresivos	12
Figura 3. Auto- y heteroreceptores en la neurona serotoninérgica	14
Figura 4. Sitio de acción de los antidepresivos.	16
Figura 5. Familia Rutaceae y subfamilias; ubicación del género <i>Casimiroa</i>	30
Figura 6. <i>Casimiroa edulis</i>	32
Figura 7. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies de <i>Casimiroa</i>	33
Figura 8. <i>Casimiroa pubescens</i>	35
Figura 9. Efecto de la administración aguda y triple de HCP en el modelo de NF	37
Figura 10. Efecto de la administración aguda de HCP en el modelo de SC	38
Figura 11. Estructura de la 3-(1'1' dimetilalil)-herniarina	40
Figura 12. Efecto de la administración triple y aguda de la 3-(1'1' dimetilalil)-herniarina en NF y SC	41
Figura 13. Diseño experimental	46
Figura 14. Modelo de Nado Forzado (NF)	52
Figura 15. Modelo de Suspensión en Cola (SC)	53
Figura 16. Modelo de Campo Abierto (CA)	55
Figura 17. Estructura de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina	58
Figura 18. Estructura de la 3-(1',1'-dimetil-propil)-herniarina	59
Figura 19. Interacciones C→H, HMBC de 3-(1',1'-dimetil-propil)-herniarina.	60
Figura 20. Efecto de la triple administración de la HHR, IQUI e IMI, FLX vs. C en SC.	62
Figura 21. Efecto de la triple administración de la HHR y IQUI vs. HER en SC.	63
Figura 22. Efecto de la administración aguda de la HHR, IQUI e IMI, FLX vs. C en NF	65
Figura 23. Efecto de la administración aguda de la HHR y IQUI vs. HER en NF.	66
Figura 24. Mecanismo de formación de la 3-(1',1'-dimetil-propil)-herniarina.	70

Tabla 1. Categorías del episodio depresivo mayor y criterios para su diagnóstico	7
Tabla 2. Categorías del trastorno de depresión mayor y criterios para su diagnóstico	8
Tabla 3. Neurotransmisores que participan en la depresión	10
Tabla 4. Antidepresivos tricíclicos (ATC)	17
Tabla 5. Antidepresivos Inhibidores de la Recaptura de Serotonina (ISRSs)	18
Tabla 6. Antidepresivos Inhibidores de la Monoamina oxidasa (IMAOs)	20
Tabla 7. Antidepresivos Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Noradrenalina (ISRNAS)	21
Tabla 8. Antidepresivos Inhibidores de la Recaptura de Dopamina (ISRDA)	22
Tabla 9. Potenciadores en el tratamiento de la depresión	24
Tabla 10. Género <i>Casimiroa</i>	31
Tabla 11. Actividad locomotriz. Efecto de la administración aguda y triple del HCP en CA	39
Tabla 12. Actividad locomotriz. Efecto de la administración aguda y triple de HER en CA	42
Tabla 13. Esquema de administración de fármacos y sustancias utilizadas	54
Tabla 14. Efecto de la administración aguda y triple de la HER, HHR, IQUI e IMI, FLX vs. C en CA	67

°C. Grados Celsius.

5-HIAA. 5-hidroxi-indol acético.

5-HT. 5-hidroxitriptamina / serotonina

AC. Adenil Ciclasa.

AcOEt. Acetato de Etilo.

AD. Adrenalina.

Adm. Administración.

AMPA. Receptor glutamatérgico ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ar. Aromático.

ATC. Antidepresivos tricíclicos.

BDNF. Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro.

CA. Modelo de Campo Abierto.

d. Doblete.

DA. Dopamina.

dd. Doble de dobles.

DSM-IV. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales.

EEM. Error Estándar Medio.

EM. Espectrometría de Masas

FLX. Fluoxetina.

Gi. Proteína G inhibitoria.

h. Horas.

HCP. Extracto de Hexano de la corteza de raíz de *Casimiroa pubescens*.

HER. 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina.

HHR. 3-(1'1'-dimetilpropil)-herniarina.

i.p. Vía intraperitoneal.

IMAOs. Antidepresivos Inhibidores de la monoamina oxidasa.

IMI. Imipramina.

IQUI. Producto en proceso de patente.

IR. Espectroscopia de Infrarojo

IRMAOs. Antidepresivos Reversibles Inhibidores de la Monoamina Oxidasa.

ISRDA. Antidepresivos Selectivos de la Recaptura de Dopamina.

ISRNAS. Antidepresivos Selectivos de la Recaptura de Noradrenalina.

ISRSs. Antidepresivos Selectivos de la Recaptura de Serotonina.

LCR. Líquido cefalorraquídeo.

kg. kilogramo

m. multiplete

M⁺. Ion Molecular

MAO. Monoamina oxidasa.

MHPG. [(3-metoxi-4-hidroxi)fenil]etilenglicol.

min. Minutos

mg. Miligramos

NA. Noradrenalina.

NF. Modelo de Nado Forzado.

NMDA. Receptor Glutamatérgico N-metil-D-aspartato

p.f. Punto de fusión.

RMN. Resonancia Magnética Nuclear.

s. Singulete.

SC. Modelo de Suspensión de Cola.

SNC. Sistema Nervioso Central.

t. Triplete.

TMS. Tetrametilsilano.

v.o. Vía oral.

δ. Desplazamiento químico.

1. Introducción

La depresión es una enfermedad debilitante que se caracteriza por sentimientos de tristeza y culpa, anhedonia, falta de autoestima, trastornos del sueño, trastornos del apetito, pérdida de peso, pérdida de la libido, sensación de cansancio, irritabilidad, falta de concentración y en el peor de los casos conduce al suicidio. Adicionalmente, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), este trastorno psiquiátrico conlleva un alto impacto socio-económico.

Desafortunadamente, el creciente impacto de la depresión no es paralelo a la mejora de su tratamiento. Existen varias clases de antidepresivos, como los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRSs) o los inhibidores de la recaptura de noradrenalina (ISRNAs) de uso recurrente en clínica como la fluoxetina o la venlafaxina. Estos fármacos suelen ser eficaces; sin embargo, presentan algunos inconvenientes; por ejemplo, su efecto sólo se presenta después de varias semanas de haber comenzado el tratamiento y su respuesta farmacológica presenta una heterogeneidad aproximadamente del 50%.

Tomando en cuenta lo anterior se ha impulsado la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas tanto el aislamiento de fuentes naturales así como la síntesis de nuevas moléculas. Bajo este enfoque se obtuvieron compuestos que no solo inhibían la recaptura de las monoaminas sino que también evitaban generar actividades farmacológicas adicionales. Así se obtuvieron los antidepresivos ISRSs y más tarde los ISRNAs que dieron paso a una nueva era en el tratamiento de la depresión y de otras enfermedades psiquiátricas; haciendo que los pacientes cumplan su régimen terapéutico con un aumento en los efectos antidepresivos.

Sin embargo, a pesar de mostrar una mejora en su desempeño farmacológico, el inicio de su acción terapéutica sigue siendo lento, ya que tarda en ejercer su efecto terapéutico después de 4 – 6 semanas. Una teoría para explicar lentitud en la acción terapéutica supone que el inicio de la respuesta antidepresiva está estrechamente relacionado a la síntesis de neurotransmisores, proteínas o acciones tróficas y estos efectos están relacionados a la complejidad para evocar cambios plásticos en ciertas áreas del cerebro. Por ejemplo, la neurogénesis en el hipocampo, la expresión de BDNF o la remodelación del circuito neuronal.

Por esta razón existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos antidepresivos que ejerzan su efecto terapéutico de manera más expedita y que sean más selectivos y consiguientemente con menos efectos adversos y por lo tanto con una mejor eficacia.

Considerando lo anterior esta tesis tiene como objetivo la modificación estructural de una cumarina con efecto sobre SNC, con el propósito de mejorar su actividad tipo antidepresiva en ratones mediante dos modelos de conducta.

2. Antecedentes

2.1. Depresión

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más comunes en la sociedad moderna. A nivel mundial se ha calculado que entre el 3.3% y el 21.4% de la población padece algún tipo de trastorno en el estado de ánimo, dentro de los cuales se destaca la depresión ^[1, 2]. El alto costo de esta enfermedad en mayor parte se debe a su gran incidencia en la población general ^[2, 3].

Este padecimiento es una enfermedad de bilite que se caracteriza por la presencia de tristeza, pérdida de interés en las cosas placenteras (anhedonia), sentimientos de culpa o inutilidad, falta de autoestima, trastornos del sueño y del apetito, lo que conduce a una pérdida o ganancia de peso, disminución del libido, fatiga o falta de energía, irritabilidad, falta de concentración y pensamientos recurrentes de muerte que en el peor de los casos lleva al suicidio (Figura 1) ^[3, 4].

Uno de los principales motivos por lo que los trastornos depresivos tienen un impacto tan elevado, en la salud pública, es su alto grado de discapacidad que generan. La elevada prevalencia e impacto negativo de la depresión ha sido ampliamente documentada a nivel nacional e internacional ^[5-7]. Pese al impacto que tiene este trastorno, una gran parte de los pacientes no recibe el tratamiento adecuado debido a una mala elección en el mismo, o bien, al mal diagnóstico de esta enfermedad.

Este trastorno se caracteriza por ser un padecimiento recurrente que reduce sustancialmente la calidad de vida de las personas y que a su vez tiene importantes costos económicos y sociales. Aproximadamente el 50% de los pacientes que padecen algún trastorno depresivo intentan suicidarse y solo un 15% lo logran [6, 7]. Es por ello que la depresión se encuentra entre los primeros lugares de la lista de enfermedades discapacitantes y se ha convertido en un objetivo prioritario de atención en todo el mundo [3, 8].

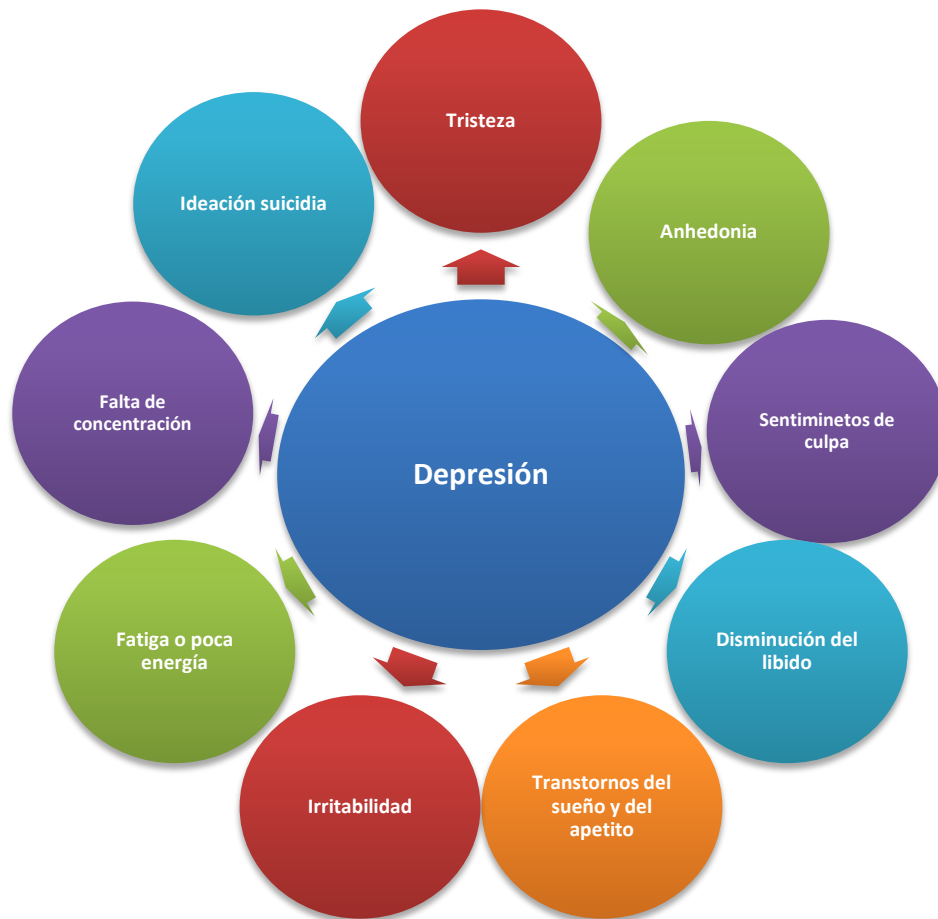


Figura 1. Síntomas más comunes que presentan los pacientes con depresión.

Por otra parte, la contribución genética para la manifestación de los trastornos depresivos ha sido estimada entre un 40-50%. La combinación de múltiples factores genéticos pueden participar en el desarrollo de la depresión; sin embargo, el defecto en un solo gen puede alterar la expresión de proteínas lo que eventualmente conducirá a la aparición de los síntomas depresivos [9, 10].

Además, diversos factores no genéticos tales como el estrés, el trauma afectivo, infecciones virales o bacterianas, y anomalías en el desarrollo del sistema nervioso contribuyen a la patogénesis de esta enfermedad [11].

Por ello es indispensable conocer cuáles son los signos y síntomas que caracterizan a la depresión para así diferenciarla entre los diferentes trastornos mentales que hay. Respecto a su diagnóstico, éste se realiza mediante el uso de cuestionarios basados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) de la American Psychiatric Association [4].

El DSM-IV clasifica a la depresión en dos categorías: a) Episodio depresivo mayor, el cual tiene una duración menor a 2 semanas en el cual las personas deben presentar mínimo 5 síntomas, dentro de los cuales deben estar presentes un estado de ánimo depresivo y/o anhedonia (Tabla 1).

Tabla 1. Categorías del Episodio depresivo mayor y criterios para su diagnóstico

Síntoma	Criterio basado en el DSM-IV
Ánimo depresivo	Estado de ánimo deprimido casi todo el día
Anhedonia	Marcada disminución del interés o placer en casi cualquier actividad casi todo el día
Alteraciones del sueño	Insomnio o hipersomnias, casi todos los días
Cambios de apetito y de peso	Cambios considerables en el apetito casi todos los días o pérdida no intencionada de peso o aumento de peso mayor al 5% del peso corporal en un mes
Pérdida de energía	Fatiga o pérdida de la energía casi todos los días
Aumento o descenso de la actividad psicomotora	Agitación o enlentecimiento psicomotriz casi todos los días
Pérdida de la concentración	Disminución de la capacidad de pensar o concentrarse o indecisión casi todos los días
Sentimientos de culpa o de inutilidad	Sentimientos de inutilidad o excesiva culpa casi cada día.
Ideación suicida	Pensamientos recurrentes de muerte o suicidio.

Tabla 1. Categorías del Episodio depresivo mayor y criterios para su diagnóstico ^[4].

b) Trastorno depresivo mayor que al igual que en el episodio depresivo mayor las personas deben presentar los mismos síntomas; sin embargo, el trastorno depresivo mayor se subdivide en tres categorías: trastorno depresivo menor, trastorno depresivo mayor y distimia; las cuales se logran diferenciar por su duración y número de los síntomas (Tabla 2).

Tabla 2. Categorías del trastorno de depresión mayor y criterios para su diagnóstico

Categorías	Criterio basado en el DSM-IV	Duración
Trastorno depresivo mayor	≥5 síntomas depresivos, incluyendo un estado de ánimo depresivo o anhedonia, que causan un deterioro significativo social, laboral o en otras áreas importantes de funcionamiento	≥2 semanas
Trastorno depresivo menor	2 a 4 síntomas depresivos, incluyendo un estado de ánimo depresivo o anhedonia, que causan un deterioro significativo social, laboral o en otras áreas importantes de funcionamiento	≥2 semanas
Distimia	3 ó 4 síntomas distímicos, incluyendo un estado de ánimo depresivo o anhedonia, que causan un deterioro significativo social, laboral o en otras áreas importantes de funcionamiento	≥2 años

Tabla 2. Categorías del trastorno depresivo mayor y criterios para su diagnóstico ^[4].

2.2. Neurobioquímica de la depresión

Diversos estudios han conducido a una variedad de hipótesis para explicar la base molecular de la depresión y los trastornos relacionados al estado del ánimo. La hipótesis de las monoaminas, en conjunción con la eficacia de los antidepresivos dirigidos hacia los sistemas de monoaminas, ha sido el tema central de la investigación de la depresión. Si bien es aceptada ampliamente que el comienzo de

la eficacia antidepressiva puede implicar cambios agudos en los sistemas de monoaminas. El interés de la investigación actual está dirigida hacia los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios posteriores a largo plazo en el cerebro después del tratamiento antidepressivo crónico, alcanzando con ello una vista detallada de la fisiopatología de la depresión y los trastornos relacionados al estado de ánimo [12-14].

2.2.1. Hipótesis catecolaminérgica

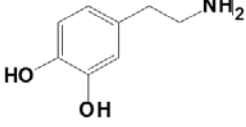
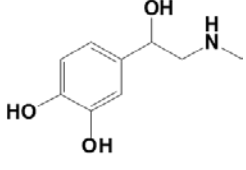
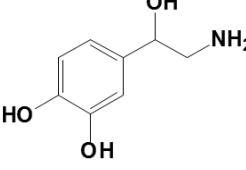
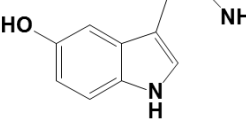
Esta teoría menciona que en la depresión hay una deficiencia importante de catecolaminas: noradrenalina (NA), dopamina (DA) y adrenalina (AD). También menciona entre otras cosas que el estado depresivo puede estar asociado a un déficit de la actividad noradrenérgica en sitios cerebrales importantes. Las evidencias por las cuales se basa esta propuesta fueron farmacológicas e indirectas; como es el caso de la reserpina, un antiguo agente antihipertensivo que bloquea las reservas de catecolaminas produciendo síntomas depresivos en algunos pacientes.

Una de las tantas evidencias de esta hipótesis es que al medir los niveles de NA en pacientes deprimidos; mostraron que sus niveles de esta catecolamina y sus metabolitos como es el caso del [(3-metoxi-4-hidroxi)fenil]etilenglicol (MHPG) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) eran muy bajos en comparación con individuos no deprimidos [15, 16].

Por otro lado, al probar dos compuestos relacionados estructuralmente y que fueron desarrollados con fines no psiquiátricos, llamados iproniazida e imipramina, tuvieron efectos antidepresivos potentes en seres humanos [15].

2.2.2. Hipótesis monoaminérgica

La "hipótesis de la monoamina," sugiere una deficiencia o un desequilibrio en los neurotransmisores monoaminas, como la serotonina (5-HT), la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA), como la causa de la depresión. Esta teoría ha sido el tema central de la investigación en la depresión durante los últimos 50 años. Esta hipótesis inició y se ha apoyado en el hecho de que los primeros antidepresivos tricíclicos (ATC) así como los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), tienen un efecto en común: la mejora aguda de la función monoaminérgica [17, 18].

Tabla 3. Neurotransmisores que participan en la depresión			
Catecolaminas		Dopamina	Monoaminas
		Adrenalina	
		Noradrenalina	
		Serotonina	

Sin embargo, esta teoría ha sufrido varios inconvenientes y no explica varios hechos. En primer lugar, hay ciertas moléculas como la cocaína y las anfetaminas que pueden aumentar la actividad monoaminérgica en el cerebro, pero no son eficaces clínicamente como antidepresivos. En segundo lugar, no todos los pacientes con depresión responden igual al mismo antidepresivo. En tercer lugar y lo más importante, estos cambios en los niveles de monoaminas en la sinapsis tardan en efectuarse al cabo de horas después de la administración de los antidepresivos; sin embargo, para alcanzar la respuesta terapéutica óptima se requiere de una administración continua de estos fármacos durante semanas para observar su efecto terapéutico ^(18, 19).

Después de varias décadas de investigación sobre los mecanismos que participan en la depresión, se ha dado lugar de un gran número de evidencias que apoyan la idea del papel importante que juegan las monoaminas en la depresión. Estas evidencias se han obtenido mediante el estudio de los efectos a largo plazo de los antidepresivos sobre las monoaminas, su densidad de receptores, así como en las funciones tanto en modelos animales como en pacientes deprimidos (como el tejido cerebral *post-mortem* obtenido a partir de pacientes deprimidos) ^(13, 14).

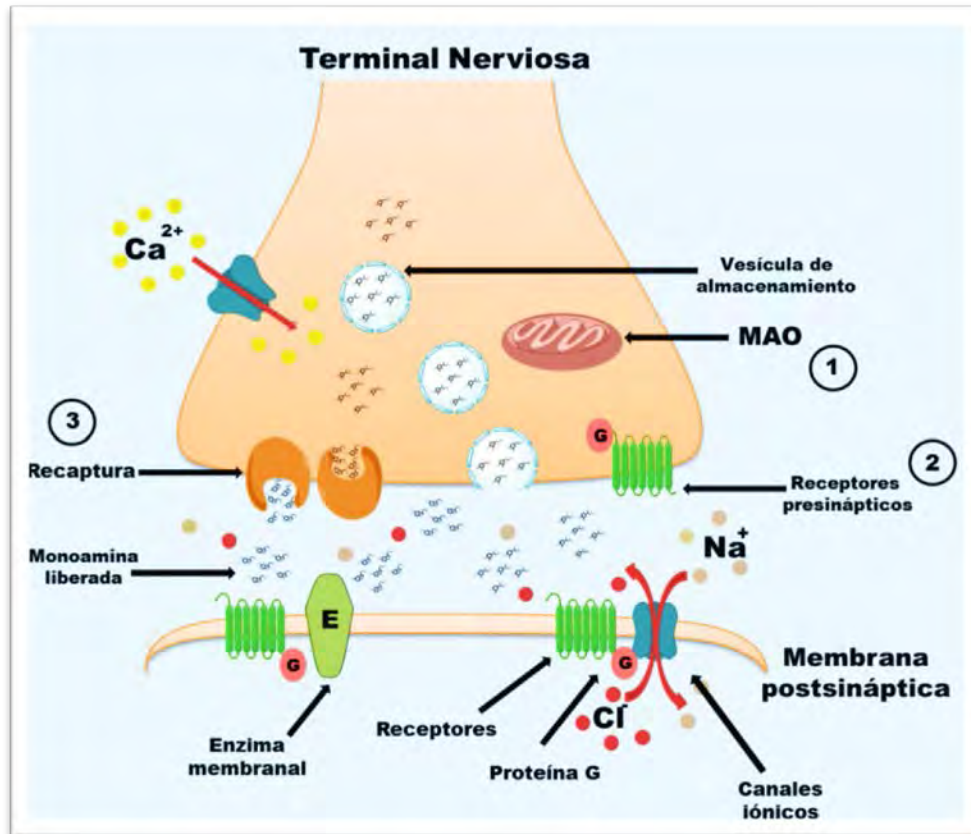


Figura 2. La neurona monoaminérgica y el sitio de acción de los antidepresivos. Las monoaminas son sintetizadas en la terminal nerviosa presináptica; las cuales son almacenadas dentro de vesículas por el transportador monoamino vesicular y son liberadas por exocitosis dependiente de Ca^{2+} . Después de su liberación las monoaminas actúan sobre los receptores postsinápticos o presinápticos. La mayoría de los receptores monoaminérgicos están acoplados a proteínas G, los cuales se activan al abrirse ciertos canales iónicos o bien al activar o inactivar ciertas enzimas de la membrana neuronal. La inactivación de las monoaminas se realiza mediante su recaptura dentro de la neurona presináptica y/o de células glial utilizando un transportador específico dependiente de Na^+/Cl^- . Después de la recaptura dentro de la terminal presináptica las monoaminas se vuelven a almacenar dentro de vesículas de almacenamiento mediante el transportador vesicular o se exponen a la oxidación de la Monoamino oxidasa (MAO). El efecto que ejercen los antidepresivos sobre el sistema monoaminérgico es: (1) la inhibición de la MAO neuronal, (2) el bloqueo de los receptores presinápticos como los α_2 adrenérgicos y (3) la inhibición de la recaptura de las monoaminas. Estos tres mecanismos incrementan la concentración de monoaminas en la sinapsis. (Elhwuegi, 2004).

Las recientes modificaciones que ha sufrido la hipótesis de las monoaminas han sugerido que el aumento agudo en los niveles de las monoaminas en la sinapsis nerviosa, puede ser sólo un primer paso en una cascada potencialmente compleja de eventos, que en última instancia resulta en actividad antidepresiva. Se ha

encontrado que este aumento agudo induce la desensibilización de la inhibición de los auto- y heteroreceptores ubicados en ciertas regiones del cerebro. Lo que se traduciría en una mayor actividad monoaminérgica central que coincide con la aparición de la respuesta terapéutica. (Figura 2). Actualmente se sabe que el incremento agudo en la cantidad de monoaminas sinápticas inducidas por los antidepresivos producen cambios neuroplásticos secundarios, que a largo plazo implican cambios de transcripción y traducción que median la plasticidad molecular y celular [11-14].

2.2.3. Hipótesis de la serotonina

Esta hipótesis postula que una disminución en la actividad de la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) puede conducir a la depresión clínica o ser un factor causal. Sin embargo, algunas investigaciones al respecto han argumentado que la hipótesis de 5-HT ha sido mal utilizada por promover un modelo biológico simplista de la depresión. Por el contrario, en la actualidad hay evidencias sustanciales de que los pacientes deprimidos sin ningún tipo de tratamiento sufren de un déficit en la función de 5-HT en el cerebro; sin embargo, la relación de estas anomalías hacia el trastorno clínico no es clara [20, 21].

Algunas de las evidencias son: una disminución en la disponibilidad del triptófano cerebral, precursor metabólico de 5-HT, así como de su metabolito e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que se encuentra reducido en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Generando una menor frecuencia de descarga en las

neuronas de 5-HT secundarias a la hipersensibilidad del autoreceptor, provocando el aumento en la recaptura de la 5-HT que trae como resultado una disminución en la respuesta del receptor postsináptico. Estos resultados han sido correlacionados con la sintomatología depresiva. Además de una disminución en la recaptura de la 5-HT plaquetaria en los pacientes con depresión [20- 22].

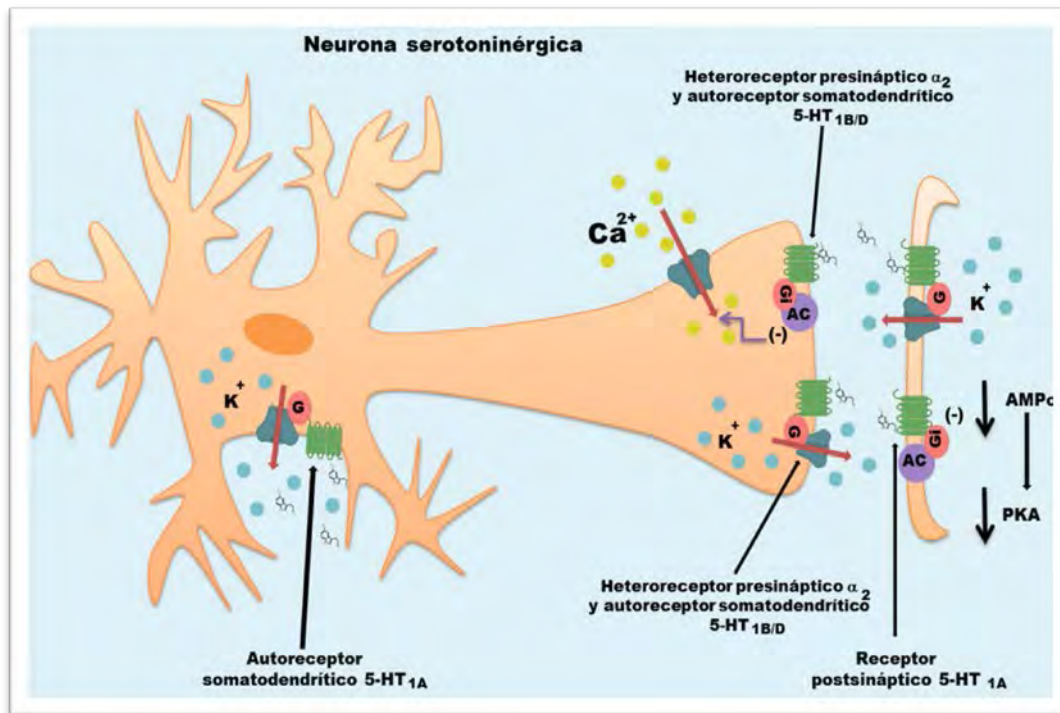


Figura 3. Auto- y heteroreceptores en la neurona serotoninérgica. Se conocen como autoreceptores a aquellos receptores que se expresan en las terminales nerviosas junto con su neurotransmisor (ej. 5-HT_{1B/D}). Cuando los receptores presinápticos se expresan junto a un neurotransmisor diferente se le conocen como heteroreceptores (ej. Adrenoreceptores α_2). Cuando los receptores presinápticos se expresan en el cuerpo de la neurona o en las dendritas, se les conocen como autoreceptores somatodendríticos (ej. Autoreceptores 5-HT_{1A}). La activación de los autoreceptores somatodendríticos abre canales de potasio (K^+) en el dorsal en el rafe lo que conduce a una hiperpolarización de la membrana inhibiendo la actividad neuronal; esto limita la disponibilidad de 5-HT en las áreas del prosencéfalo. Los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos están acoplados a la proteína G inhibidora (Gi) la cual inhibe a la adenil ciclasa (AC) membranar; la cual conduce a una disminución en los niveles del segundo mensajero AMPc. La expresión de los autoreceptores 5-HT_{1B/D} y adrenoreceptores α_2 acoplados a proteínas G inhibitorias (Gi) aumentan la conductancia de K^+ produciendo una hiperpolarización de la terminal nerviosa o inhiben la formación de AMPc, disminuyendo la concentración de Ca^{2+} intracelular el cual es requerido para la exocitosis del neurotransmisor. El tratamiento a largo plazo con diferentes antidepressivos genera la desensibilización de estos receptores inhibiéndolos, trae como resultado el incremento de la disponibilidad de las monoaminas en ciertas áreas del cerebro. (Elhwuegi, 2004).

Sin embargo, al igual que las otras teorías, esta teoría también presenta varias inconsistencias. Por ejemplo, no explica la reducción de los niveles centrales de 5-HT que de forma transitoria, se induce en personas sanas, mediante la administración de una mezcla de aminoácidos en donde se ha excluido el L-triptófano (precursor de la serotonina), lo cual no induce efectos depresivos. Incluso en personas sanas que están recibiendo antidepressivos. Aún más, en pacientes deprimidos sin tratamiento a los que también se les reducen los niveles de 5-HT tampoco presentan exacerbación de su sintomatología depresiva. Por otro lado, pacientes deprimidos bajo tratamiento con ISRSs y que responden bien a ellos, presentan una breve recaída cuando se suprimen sus niveles de 5-HT mediante la mezcla de aminoácidos.

Estos hallazgos indican que la causa de la depresión está lejos de ser una simple deficiencia de monoaminas centrales, ya que no es una condición suficiente para que se presente la depresión [20, 22].

2.3. Antidepresivos

Los antidepresivos se agrupan tomando en consideración sus características químicas y en función de su efecto sobre los sistemas neurotransmisores.

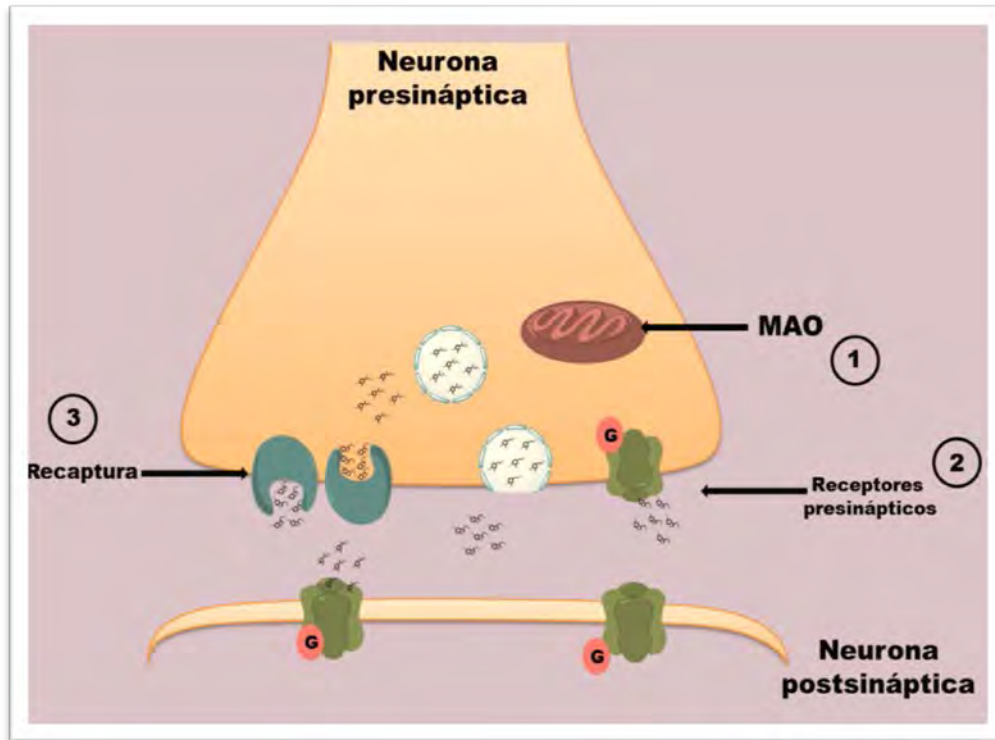
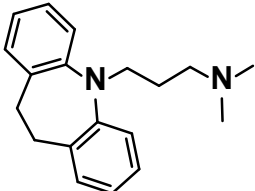
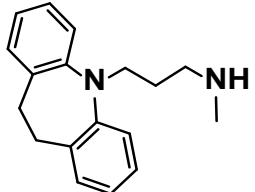
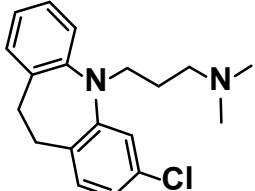


Figura 4. Sitio de acción de los antidepresivos. Los efectos que ejercen los antidepresivos sobre el sistema monoaminérgico son: (1) la inhibición de la MAO neuronal, (2) el bloqueo de los receptores presinápticos como α_2 adrenérgicos y (3) la inhibición de la recaptura de las monoaminas. Estos tres mecanismos incrementan la concentración de monoaminas en la sinapsis. (Elhwuegi, 2004).

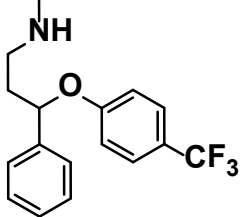
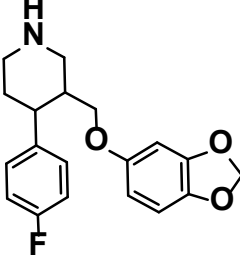
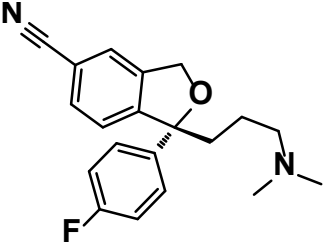
Los antidepresivos tricíclicos (ATC) reciben su nombre debido a su estructura química, que incluye un sistema de tres anillos uno de ellos con una amina terciaria con una cadena lateral que contiene a medias secundarias. A algunos de ellos son amitriptilina, imipramina, nortriptilina y desipramina. Estos fármacos se caracterizan por ser inhibidores de la recaptura no selectiva de los neurotransmisores noradrenalina y serotonina. Algunos son capaces de bloquear el ingreso de NA a las

neuronas noradrenérgicas como la desimipramina. Otros son capaces de bloquear el ingreso de 5-HT como la clomipramina y algunos como la imipramina que actúa preferentemente sobre la recaptura de NA (Figura 4).

Además de bloquear la recaptura de las monoaminas, los ATC exhiben una alta afinidad para un gran número de receptores de monoamina (α_1 -adrenoceptores, los receptores H_1 de histamina, los receptores muscarínicos, etc.). Esta interacción de los antidepresivos tricíclicos con esta gama de receptores trae como resultado la expresión de efectos adversos tales como problemas de hipertensión postural, problemas de memoria/cognición, visión borrosa, boca seca, estreñimiento, disfunción sexual, trastornos del sueño y del apetito. Obligando a muchos pacientes a abandonar los tratamientos [23-25].

Tabla 4. Antidepresivos Tricíclicos (ATC)	
	Imipramina
	Desipramina
	Clomipramina

Después de los ATC se diseñaron otros antidepresivos, los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRSs). Dentro de este grupo se encuentran la fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram y el racemato activo de citalopram S-citalopram o escitalopram.

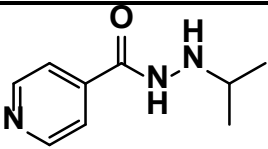
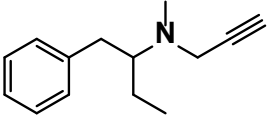
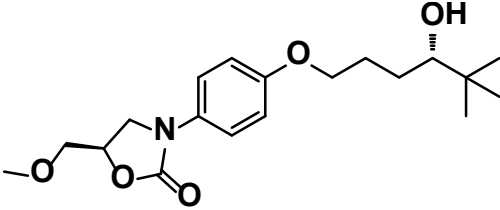
Tabla 5. Antidepresivos Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina (ISRSs)	
	Fluoxetina
	Paroxetina
	Escitalopram

Todos estos fármacos tienen un mecanismo de acción parecido: bloquean la recaptura de serotonina, aumentan su disponibilidad en la hendidura sináptica; disminuyen la recaptura de 5-HT (bajos niveles del catabolito de la 5-HT, el ácido 5-hidroxi indolacético, 5-HIAA) y modifican la sensibilidad de los receptores 5-HT₂ (regulación hacia la neurona postsináptica) y regulan los receptores 5-HT_{1A}.

Por otra parte, se ha visto que el periodo de latencia que transcurre entre la administración de los antidepresivos ATC y la mejoría clínica, tiene un lapso alrededor de 4 a 6 semanas. Esta latencia de tiempo se debe a la activación inicial de los autoreceptores 5-HT_{1A} de las neuronas serotoninérgicas presinápticas, cuya función es inhibitoria, atenuando la liberación de serotonina. Después de varias semanas estos autoreceptores se desensibilizan y permiten entonces el incremento en la neurotransmisión responsable de la mejoría clínica⁽²³⁾.

Los antidepresivos inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), históricamente fueron los primeros antidepresivos. La iproniazida, que se sintetizó como un antifímico, resultó ser un antidepresivo en los enfermos tuberculosos y con el tiempo se observó que inhibía a la MAO de manera no selectiva y de esta forma aumentaba el tiempo de actividad de las monoaminas (NA, DA, y 5-HT). Los IMAOs se han vinculado a eventos desagradables que incluyen crisis hipertensivas y reacciones letales, principalmente cuando se combinan con los ISRSs. Algunos de los efectos secundarios con este tipo de fármacos son insomnio, somnolencia diurna, hipotensión ortostática, anorgasmia, ganancia de peso, mioclonus y edemas de miembros inferiores.

Existen dos isoformas de MAO en el SNC. La MAO A, que cataboliza a la NA, 5-HT, DA, tiramina y la MAO B que metaboliza a la DA y tiramina. Algunos inhibidores de la MAO B como la selegina (Deprenil®) son poco eficaces en la depresión.

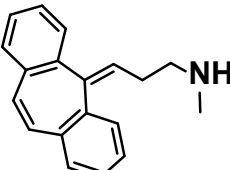
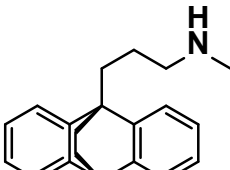
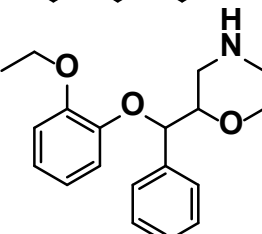
Tabla 6. Antidepresivos Inhibidores de la Monoamina oxidasa (IMAOs)	
	Iproniazida
	Selegina
	Befloxafona

Sin embargo, los antidepresivos IMAOs son irreversibles, poco eficaces en los episodios depresivos mayores, aun cuando son más eficaces en las formas atípicas de depresión. No son útiles en el manejo de depresiones psicóticas por lo cual se les ha considerado en la práctica como medicamentos de 2^a o hasta 3^a elección [23,-25, 27].

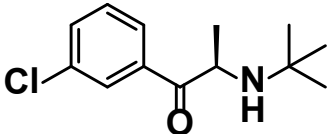
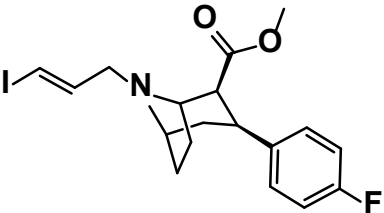
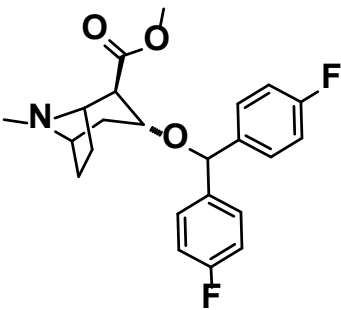
Existe otra familia de IMAOs, los cuales son reversibles y a los que se les ha denominado IRMAOs (por sus siglas Inhibidores Reversibles de la MAO). De esta familia destacan tres fármacos: moclobemida, brofaromina y befloxafona. Estos tres antidepresivos inducen menos reacciones hipertensivas; además, dadas sus características de reversibilidad, tienden a producir menos efectos secundarios que los IMAO irreversibles. Adicionalmente los IRMAOs tienen mayor selectividad hacia la MAO A. En cuanto al perfil de modificaciones sobre los sistemas de

neurotransmisores se sabe que afectan más a DA, en segundo lugar a NA y finalmente pocos efectos a 5-HT [24, 26, 27].

Posteriormente, se sintetizaron los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptura de NA (ISRNAs). El ejemplo más representativo de esta familia corresponde a los fármacos con una cadena lateral que contiene aidas secundarias y esto, al parecer, les da la característica estructural para bloquear la recaptura de NA de manera selectiva. Algunos fármacos que pertenecen a este grupo son nortriptalina, protriptilina, maprotilina y la reboxetina [24].

Tabla 7. Antidepresivos Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Noradrenalina (ISRNAs)	
	Protriptilina
	Maprotilina
	Reboxetina

Dentro de los antidepresivos de más reciente creación se encuentran los inhibidores selectivos de la recaptura de dopamina (ISRDA). El bupropión está relacionado con las feniletilaminas, su potencia para bloquear la recaptura de DA es moderada; sin embargo, se observan efectos adicionales como: agitación, insomnio, anorexia y psicosis; además, puede causar hipomanía o manía en enfermos bipolares.

Tabla 8. Antidepresivos Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Dopamina (ISRDA)	
	Brupropion
	Altropano
	Difluoropina

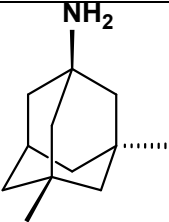
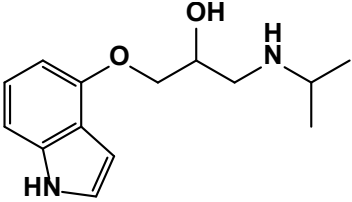
De esta nueva era de antidepresivos se ha postulado el tratamiento de la depresión combinado los efectos que tienen los antidepresivos entre sí o junto con agonistas selectivos o agonistas parciales a cada uno de los receptores involucrados en el mecanismo de la depresión.

Después de la administración repetida de los ISRSs, los receptores 5-HT_{1A} se desensibilizan, lo cual permite a las neuronas de 5-HT recuperarse del dispauro neuronal lo que conlleva a un incremento de 5-HT extracelular a un nivel mayor que el observado después del tratamiento único. El bloqueo de estos mecanismos de retroalimentación negativa con antagonistas al receptor 5-HT_{1A} y/o 5-HT_{1B} potencia el incremento en los niveles de 5-HT producido por los ISRS; lo cual podría acelerar los efectos antidepresivos deseados [24, 28].

Sin embargo, la ausencia de la selectividad de antagonistas al receptor 5-HT_{1A} puede ser una estrategia que se podría redimir usando antagonistas parciales al receptor β -adrenérgico/5-HT_{1A}, como el pindolol. Teóricamente, el pindolol a dosis sub-efectivas puede acelerar la respuesta antidepresiva y aumentar la actividad antidepresiva inhibiendo la retroalimentación negativa [28].

Por otra parte, otros de los sistemas de neurotransmisión que también muestran anomalías durante la depresión es el glutamato [28, 29]. Varios fármacos alternativos se han centrado sobre los receptores de glutamato; en especial sobre el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Sin embargo, el antagonismo directo de receptores de NMDA produce efectos adversos graves; por lo tanto, la búsqueda de nuevos antidepresivos se ha centrado en aquellos que

actúan en sitios moduladores de este receptor, tales como el sitio de la glicina. Estos agentes pueden ejercer su acción a través de una modulación de la actividad glutamatérgica, como es el caso de la memantina, un bloqueador no competitivo al receptor NMDA que ejerce un efecto adicional sobre la neuroplasticidad del hipocampo [30].

Tabla 9. Moduladores en el tratamiento de la depresión	
	Memantina
	Pindolol

Actualmente se están evaluando el posible uso de moduladores de los receptores NMDA. Uno de ellos es la Memantina, un bloqueador del receptor NMDA no competitivo. Su posible eficacia terapéutica podría estar relacionada con el aumento en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), además de aumentar la transmisión serotoninérgica [30].

Otro receptor de reciente interés es el receptor AMPA; ya que su modulación positiva ayuda en las terapias antidepresivas [32].

2.4. Modelos animales para el estudio de la depresión

Los modelos animales pueden definirse como la fase experimental que se desarrolla en una especie, con el propósito de estudiar los fenómenos que ocurren en otra especie distinta. En el caso de los modelos animales de las enfermedades humanas se busca desarrollar síndromes en los animales que simulen la fisiopatología humana. De estos estudios se ha logrado obtener información acerca de las acciones de los antidepresivos en diversas estructuras cerebrales desde el punto de vista neuroquímico, el electrofisiológico y conductual, lo que ha permitido proponer nuevas hipótesis que tratan de explicar los procesos neurofarmacológicos que subyacen a las acciones terapéuticas de los antidepresivos. Aunque los modelos por definición no son el estado real, pueden tener un valor heurístico y predictivo.

Con el fin de estudiar la depresión se han propuesto criterios para validar los modelos animales basándose en las similitudes existentes entre el modelo experimental y el fenómeno clínico observado; el modelo debe:

(i) Ser razonablemente análogo a la enfermedad humana en su sintomatología (validez aparente).

(ii) Los cambios conductuales que se produzcan deben ser monitoreados objetivamente.

(iii) Los cambios conductuales que se provoquen deben ser reversibles por las mismas modalidades del tratamiento que son eficaces en los seres humanos (validez predictiva)

(iv) Los modelos deben ser reproducibles entre los diferentes grupos de investigación.

Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, la depresión es un trastorno multifactorial del cual se desconocen diversos efectos de su fisiopatología. A pesar de varios estudios no se ha logrado comprender en su totalidad las acciones de los fármacos utilizados. Este hecho ha propiciado el desarrollo de modelos animales que permiten estudiar las acciones de los fármacos antidepresivos encaminados a entender su mecanismo de acción.

En investigación básica, el uso de modelos animales que son predictivos de la acción antidepresiva, se han utilizado ampliamente para desarrollar nuevos compuestos terapéuticos y para la comprensión de los substratos neurales que subyacen al comportamiento depresivo.

Tomando en cuenta que la exposición al estrés o acontecimientos traumáticos tienen un fuerte impacto en la manifestación de la depresión, lo que sugiere, que en pacientes deprimidos, existe un deterioro de la respuesta adecuada a las estrategias de afrontamiento. Como resultado, la mayoría de los modelos animales para estudiar la depresión se basan en la exposición a diversos tipos de estrés agudo o crónico. Estos paradigmas son capaces de generar constantemente cambios de conducta parecidos a los síntomas de la depresión; que pueden ser revertidos por el

tratamiento con antidepresivos. Uno de los modelos más utilizados para evaluar la depresión y la conducta tipo-antidepresivo es la prueba de nado forzado.

En el presente estudio se utilizaron dos modelos de depresión: el modelo de nado forzado (NF) y el modelo de suspensión en cola (SC). Ambos modelos fueron seleccionados debido a que son sensibles y selectivos para fármacos antidepresivos, además se construyeron a partir de bases teóricas que subyacen a la depresión (situaciones estresantes), son económicos y no son metodológicamente complicados [33, 34].

2.4.1. Modelo de Nado Forzado

Entre los modelos conductuales para evaluar las acciones de los antidepresivos destaca el modelo de nado forzado propuesto por Porsolt en 1977. Es uno de los modelos más utilizados ya que ha demostrado su utilidad para detectar un amplio espectro de nuevas sustancias con eficacia antidepresiva. Adicionalmente es un modelo de fácil instalación y altamente reproducible (33-35).

Esta prueba está basada en observar la conducta de los roedores cuando son obligados a nadar en un cilindro con agua. Inicialmente hacen esfuerzos vigorosos (nadar) para tratar de escapar; sin embargo, posteriormente desarrollan una conducta de inmovilidad (movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote). En este modelo, la inmovilidad es interpretada como una conducta pasiva o de desesperanza que toman los roedores para hacer frente al estímulo estresante o como un bajo estado de ánimo del individuo.

En lo general se acepta que la inmovilidad incrementada reproduce uno de los síntomas principales de la depresión clínica, es decir, la falta de motivación para confrontar una situación premiante, lo que refleja el abatimiento del estado de ánimo. Sin embargo, los animales tratados con antidepresivos clínicamente efectivos reducen en gran medida el tiempo de inmovilidad, sugiriendo así un incremento de la “motivación” del animal para buscar una solución a la situación de apr emio que representa el nado forzado.

Diversos estudios han señalado que este efecto es mediado por la interacción con los sistemas de neurotransmisión de NA, DA, 5-HT y GABA. Estas consideraciones han colocado a la prueba de nado forzado como uno de los modelos más utilizados en el estudio de posibles fármacos antidepresivos y de los receptores neur onales involucrados en las acciones farmacológicas de estas sustancias [34, 35].

Así mismo, se ha sugerido que la disminución de la inmovilidad provocada por los ant idepresivos podría ser el resultado de un decremento de la actividad locomotriz general del roedor. Sin embargo, la actividad ambulatoria de los animales se incrementa sólo con sustancias que son estimulantes del SNC como las anfetaminas, pero no con los fármacos ant idepresivos. En contraparte, los depresores del SNC disminuyen la actividad am bulatoria e incrementan la inmovilidad durante la prueba de nado forzado. Por lo anterior, se considera un buen antidepresivo aquel que disminuye la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado, sin modificar la actividad ambulatoria del sujeto experimental [34-36].

2.4.2. Modelo de Suspensión en Cola

Al igual que el modelo de nado forzado, el modelo de suspensión en cola (SC) se basa en la observación de los roedores, después de hacer movimientos iniciales orientados al escape, desarrollan una postura de inmovilidad cuando se colocan en una situación de estrés inevitable ^[37]. En el caso de la prueba de SC la situación de estrés implica la tensión hemodinámica al ser colgado de una manera incontrolable por su cola ^[38]. Si se da el tratamiento antidepressivo antes de la prueba, los sujetos mantienen una conducta activa dirigida al escape por períodos largos de tiempo ^[39].

En este paradigma, la inmovilidad es debida a la incapacidad o renuencia a mantener el esfuerzo. Presentándose una hipo-actividad generalizada, evidenciada por el hecho de que los animales pueden adoptar esta postura de forma rápida la cual es contrarrestada o suprimida por los antidepressivos ^[39]. La conducta de inmovilidad puede ser analoga a las observaciones clínicas con los pacientes deprimidos que a menudo carecen de la fuerza sostenida para mantener un esfuerzo lo que se refleja en un deterioro psicomotor pronunciado ^[40]

].

2.5. Género *Casimiroa*

El género *Casimiroa* (Rutaceae) fue establecido en 1825, por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza. Dicho género, está conformado por diez especies (Tabla 10); las cuales son originarias de México y Centroamérica [41].

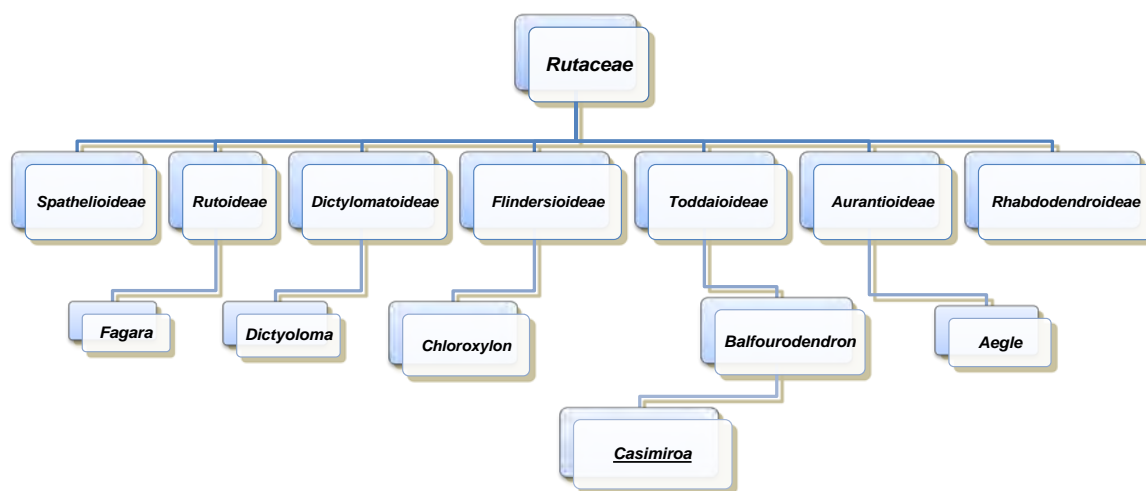


Figura 5. Familia Rutaceae y subfamilias; ubicación del género *Casimiroa*.

El género *Casimiroa* está constituido por árboles de corteza morena-grisácea salpicada de lenticelas, que crecen en climas cálidos; poseen hojas alternas, pecioladas, digitadas, foliadas (de 3 -5 foliolos); sus hojas pueden ser lanceoladas, subelípticas, ovales u obovadas, con peciolo cortos o largos, glabras, con nervaduras en el envés. Flores pequeñas, blanco-verdosas y unisexuales y sus

frutos son drupas de 2 a 12 cm de diámetro, con semillas (de 1-5), con testa apergaminada y reticulada.

Tabla 10. Especies del género *Casimiroa*

1. *C. tetrameria* Millps.
 1. *C. pringlei* (Wats.) Engl.
 2. *C. watsoni* Engler
 3. *C. edulis* Llave et lex.
 4. *C. pubescens* Ramírez
 5. *C. sapota* Oerst f. typical
 6. *C. emarginata* St. et Steyerm
 7. *C. microcarpa* Lundell
 8. *C. calderoniae* Chiang & Medrano
 9. *C. greggii* (Watson) Chiang
-

De este género *C. pubescens*, *C. pringlei*, *C. microcarpa*, *C. greggii*, *C. watsonii*, *C. tetrameria*, *C. emarginata* y *C. calderoniae*, se encuentran en forma silvestre y solo *C. edulis* y *C. sapota*, por sus frutos comestibles, son las únicas especies que se cultivan [41, 42].

Por otra parte, se ha de mostrado que las especies del género *Casimiroa* tienen efectos sobre el SNC [43-45]. Entre ellas, se encuentra *Casimiroa edulis*, conocida popularmente como “zapote blanco” o “zapote dormilón”; de la cual se han utilizado sus hojas, su corteza y especialmente sus frutos y semillas como remedios sedantes, antihipertensivos y como inductores del sueño [46,-48].

Debido a su valor comercial y a las propiedades medicinales que se le atribuyen a *C. edulis*, es la especie del género a la que se le han realizado una mayor cantidad de estudios fitoquímicos y farmacológicos.



Figura 6. *Casimiroa edulis*; imagen del “Zapote blanco” tomada de Internet

Nuestro grupo de trabajo ha conducido de forma sistemática estudios sobre la composición química y la evaluación farmacológica de varias especies del género *Casimiroa*. Nuestros hallazgos han confirmado que los metabolitos secundarios del tipo de cumarinas y flavonoides son los químicos marcadores de este género [51-54].

La presencia de las cumarinas: felopterina, isopimpinellina, heraclenol y heraclenina en casi todas las especies de este género indica una similitud química inter-especies (49-54).

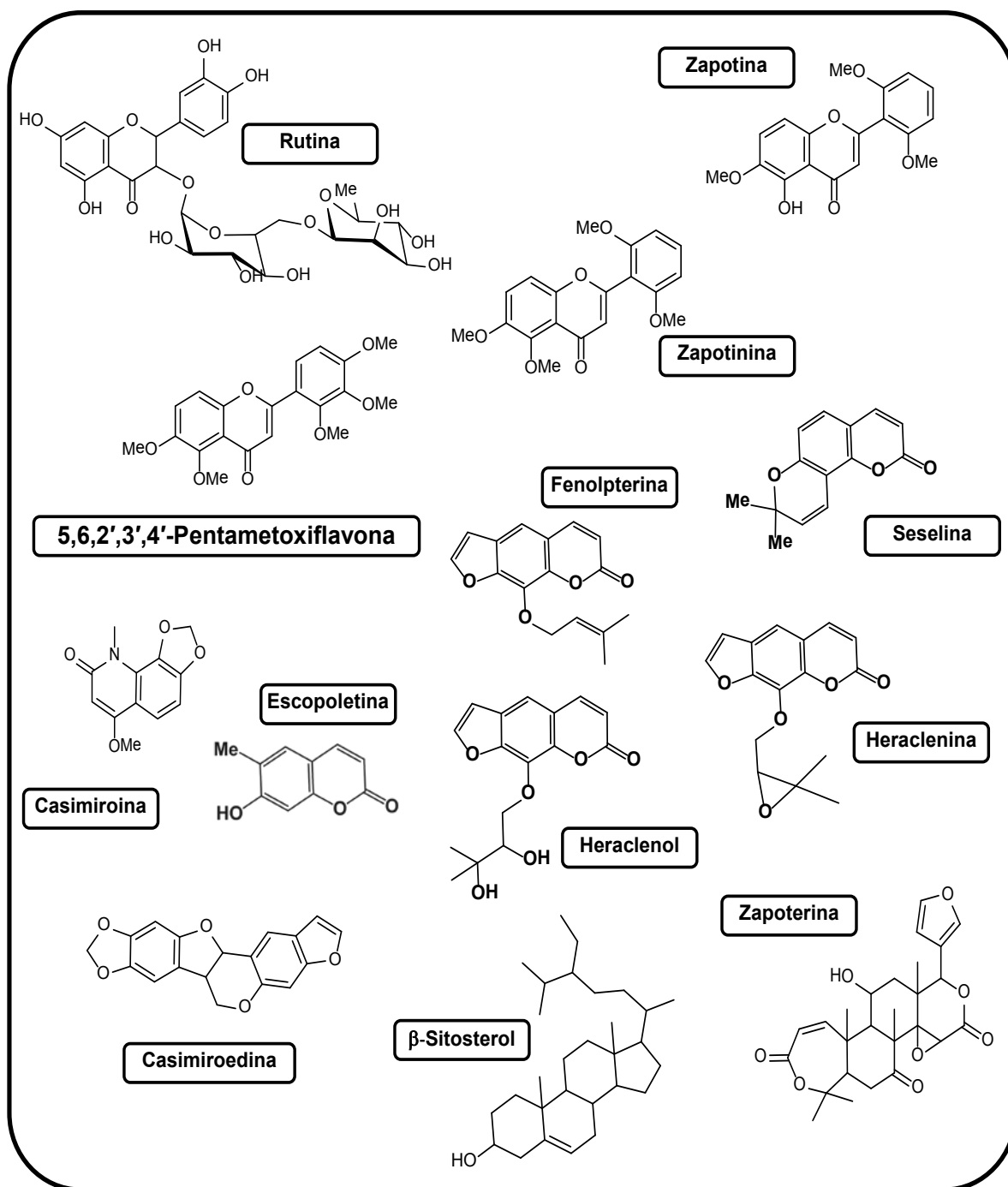


Figura 7. Metabolitos Secundarios aislados de algunas especies del género *Casimiroa*.

2.5.1. *Casimiroa pubescens*

Con el objetivo de obtener sustancias, a partir de especies del género *Casimiroa*, con efectos sobre el SNC, decidimos estudiar la *Casimiroa pubescens* conocida como “zapote de rata” o “zapote cimarrón”. Esta especie se usa en la medicina tradicional Mexicana como tranquilizante. Sin embargo, a diferencia de *C. edulis*, para la *C. pubescens* la información química y farmacológica es escasa^[41].

La clasificación botánica de *C. pubescens* es la siguiente:

- ✓ **Reino:** Plantae
- ✓ **Filo:** Magnoliophyta
- ✓ **Clase:** Magnoliopsida
- ✓ **Orden:** Rutales
- ✓ **Familia:** Rutaceae
- ✓ **Género:** *Casimiroa*
- ✓ **Especie:** *Casimiroa pubescens*. An. Inst. Med. N. II. 19. 1896.

C. pubescens es un árbol de 2-3 m de altura inerme y ramoso, con las ramas casi erguidas y rugosas; hojas alternas, gruesas y coriáceas, compuestas de 3 folíolos ovales u ovo-oblongos de borde entero y pubescentes con pecíolos cortos también pubescentes. Con flores aglomeradas y globosas de color blanco verdoso y pubescentes. Con drupas pubescentes compuestas por 5 semillas con testa pergaminada y reticulada. Esta especie es endémica de México; su mayor distribución se encuentra entre los estados de Hidalgo y Querétaro [41, 42].



Figura 8. *Casimiroa pubescens*. “Zapote de rata” imagen tomada en julio 2012.

2.5.2. Antecedentes farmacológicos y químicos de *Casimiroa pubescens*

Como parte de nuestro estudio sistemático de *Casimiroa pubescens* hemos determinado que el extracto de hexano de la corteza de raíces (HCP) ejerce un efecto tipo antidepressivo en ratones en los modelos de nado forzado (NF) y suspensión en cola (SC) sin afectar su conducta ambulatoria evaluada en el modelo de campo abierto (CA).

En una primera etapa, en la prueba de NF, HCP fue administrado en ratones en forma aguda a las dosis de 7.5, 15, 30, 60, 90 y 120 mg/kg (v.o.). Los resultados mostraron que el extracto HCP no fue capaz de reducir el tiempo de inmovilidad en el modelo de nado forzado (NF) al igual que fluoxetina (FLX) un antidepressivo inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRSs) evaluado a las dosis de 5, 10 y 15 mg/kg. En contraste, imipramina (IMI) y desipramina (DIM) dos antidepressivos tricíclicos (ATC) a las dosis de 12.5, 25 y 32 mg/Kg; y 3.12, 6.25, 12.5 y 25 mg/kg respectivamente; produjeron cada uno un efecto tipo antidepressivo dependiente de la dosis al disminuir en un 93.5% y 84.8% respectivamente el tiempo de inmovilidad respecto al grupo control (Figura 9).

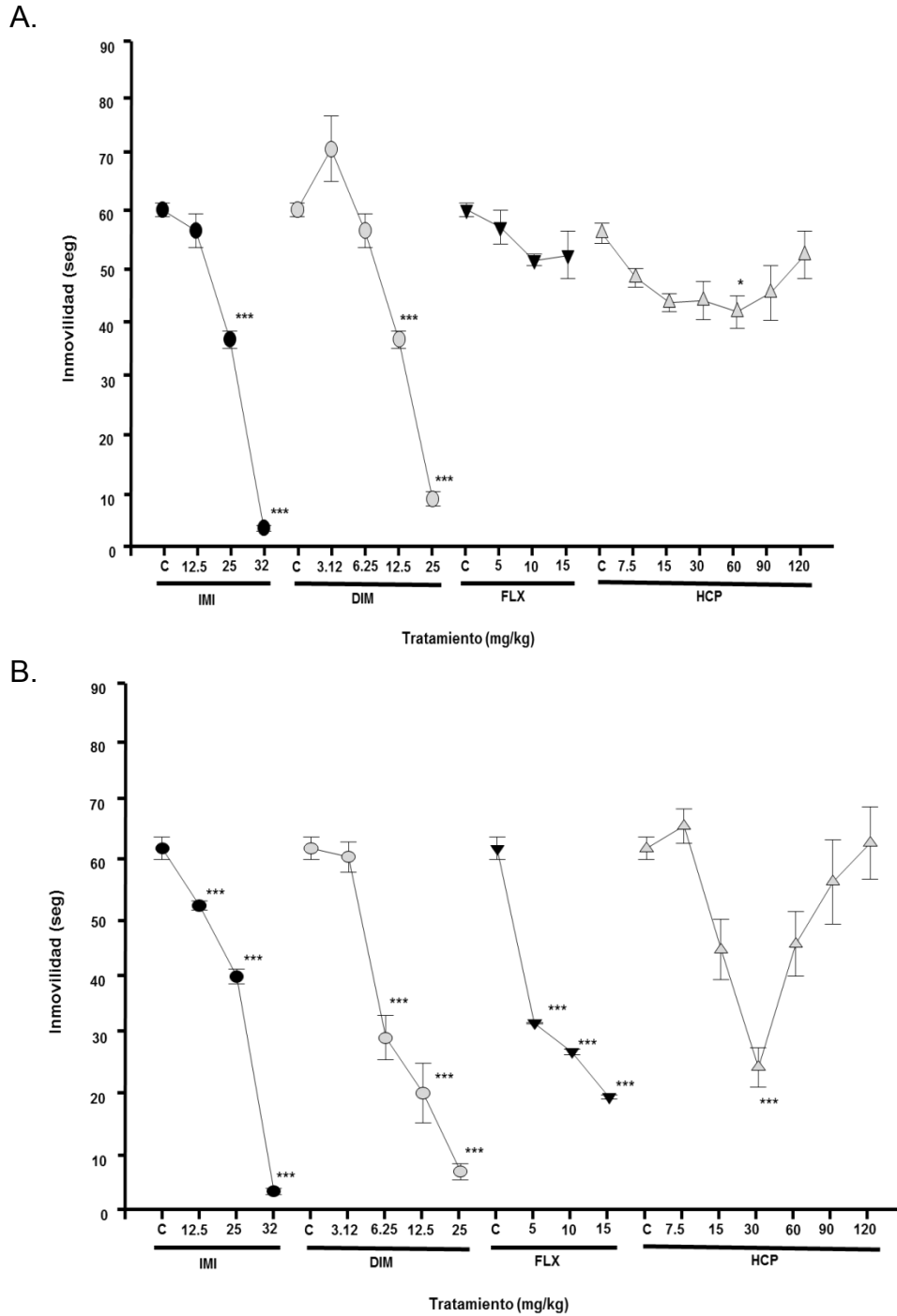


Figura 9. Efecto de la administración oral aguda (A) y triple (B) HCP en NF (Inmovilidad (seg)); IMI: Imipramina, FLX: Fluoxetina, DIM: Desipramina, HCP: Extracto de Hexano de corteza de raíz *Casimiroa pubescens*. Todos los resultados están expresados en base a su media \pm EEM con un n=16. [(*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001] (Resultados tomados de Ubaldo-Suárez et al., 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, se procedió a evaluar los efectos tipo antidepressivos del HCP en NF bajo un esquema de administración triple. Los resultados bajo este régimen de tratamiento mostraron que este extracto HCP produjo un efecto tipo antidepressivo en NF que es el inducido por la administración de única dosis. El mayor efecto se mostró a la dosis de 30 mg/kg disminuyendo el tiempo de inmovilidad en un 59.8%. Este efecto en la reducción del tiempo de inmovilidad fue similar al producido por la FLX con un 55.5% a una dosis de 10 mg/kg (Figura 9).

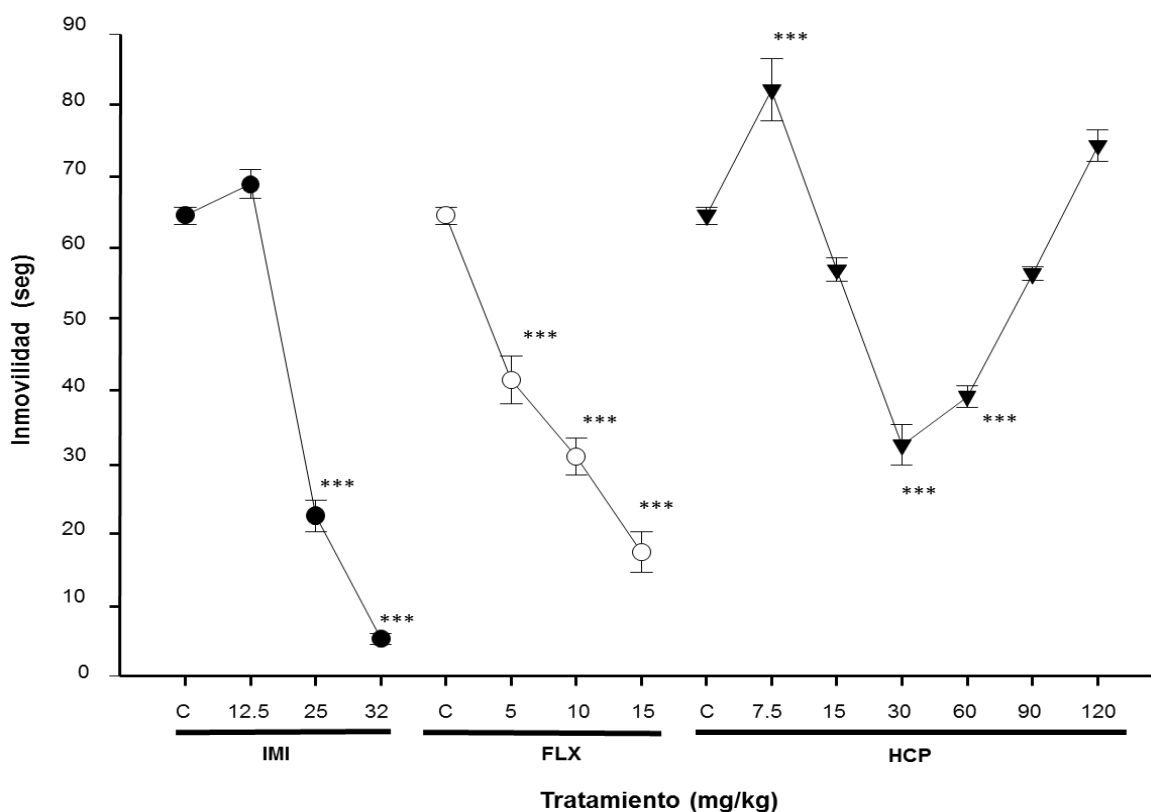


Figura 10. Efecto de la administración oral aguda de HCP en SC (Inmovilidad (seg)); IMI: Imipramina, FLX: Fluoxetina, HCP: Extracto de Hexano de corteza de raíz *Casimiroa pubescens*. Todos los resultados están expresados en base a su media \pm EEM con una N=16. [(*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001] (Resultados tomados de Ubaldo-Suárez et al., 2013).

Por otro lado, al evaluar la actividad tipo antidepresiva de HCP en la prueba de suspensión de cola (SC), utilizando una administración aguda, se observó que a la dosis de 30 mg/kg disminuye el tiempo de inmovilidad en un 49.8% respecto al grupo control. Este resultado contrasta con el obtenido en el modelo de NF donde esta dosis fue inactiva, lo que significa que en SC es un modelo más sensible que el NF. (Figura 10).

El HCP no modifica la actividad locomotriz en la administración aguda ni en la triple, a las dosis que presentó el efecto tipo antidepresivo. Estos hallazgos muestran un efecto específico del extracto de HCP en los modelos de conducta

Tabla 11		
Tratamiento (mg/kg)	Actividad (número de cuentas/ 5 min)	Actividad (número de cuentas/ 5 min)
	Media± EEM	Media± EEM
	Administración Aguda	Administración Triple
Control	74.75 ± 4.79	79.75 ± 4.19
HCP 7.5	72.00 ± 6.76	88.12 ± 1.14
HCP 15	71.87 ± 6.65	87.25 ± 1.35
HCP 30	76.50 ± 11.3	89.50 ± 1.28
HCP 60	75.62 ± 4.06	88.37 ± 1.77
HCP 90	81.62 ± 5.19	87.87 ± 1.14
HCP 120	70.50 ± 4.66	90.50 ± 0.77
	$F_{6,55} = 0.323, p = 0.922$	$F_{6,55} = 3.063, p = 0.013$

Tabla 11. Efecto de la administración aguda y triple del extracto de HCP de *C. pubescens* y los antidepresivos usados en el modelo de Campo abierto. Todos los resultados están expresados en base a su media ± EEM con una N=8. (Resultados tomados de Ubaldo-Suárez et al., 2013)

El estudio fitoquímico de este extracto activo permitió el aislamiento de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina, una de las cumarinas mayoritarias presentes en este extracto [51].

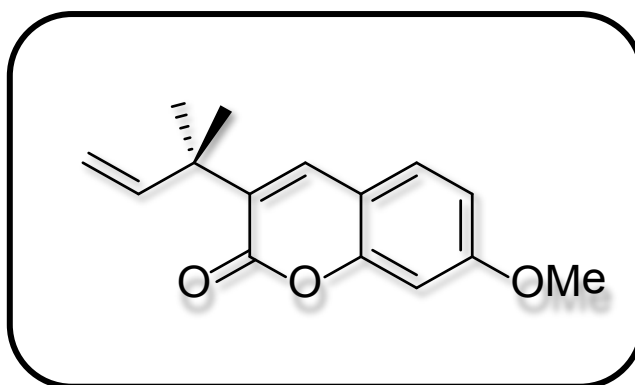


Figura 11. Estructura de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina.

Nuestros estudios han de mostrar que la administración aguda v.o. de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina induce efectos tipo antidepresivos en la prueba SC. (38, 39) A la dosis de 60 mg/kg; esta cumarina disminuye el tiempo de inmovilidad en un 39.3% (Figura 12). Aún más, bajo un esquema de administración triple la actividad de HER mejoró significativamente al reducir el tiempo de inmovilidad en NF a la dosis de 30 mg/kg en un 44.5% el tiempo de inmovilidad (Figura 12), sin modificar la conducta ambulatoria de los ratones evaluada en CA (Tabla 11).

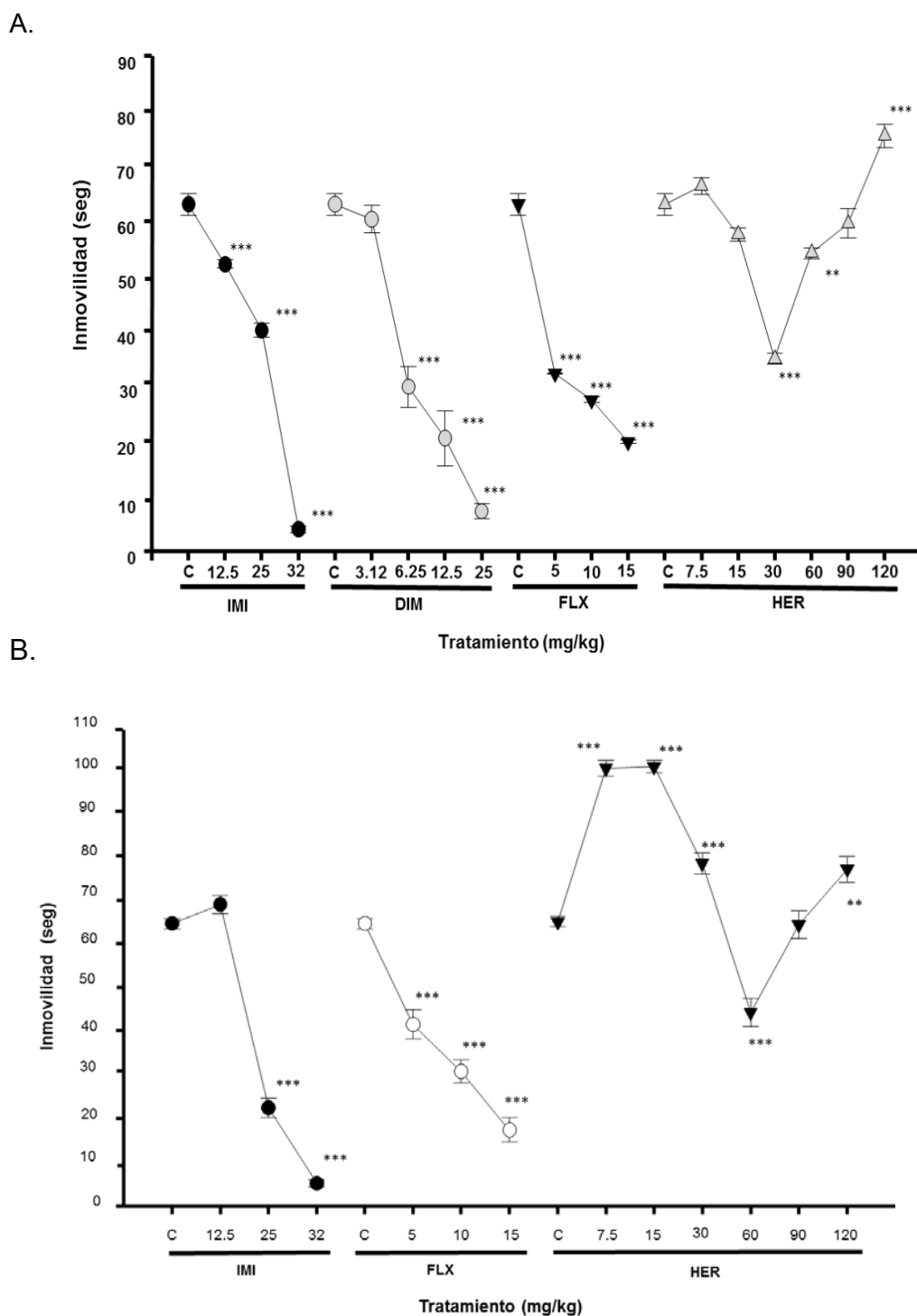


Figura 12. Efecto de la administración oral triple (A) y administración aguda (B) de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina aislada de *Casimiroa pubescens* en NF (A) y SC (B) (Tiempo de inmovilidad (seg)); IMI: Imipramina, FLX: Fluoxetina, DIM: Desipramina, HER: 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina. Todos los resultados están expresados en base a su media \pm EEM con una N=16. [(*) P<0.05; (**) P<0.01; (***) P<0.001] (Resultados tomados de Ubaldo-Suárez D. Tesis doctoral., 2013).

Tratamiento (mg/kg)	Actividad (número de cuentas/ 5 min) Media± EEM		Actividad (número de cuentas/ 5 min) Media± EEM	
	Administración Aguda		Administración Triple	
Control	74.75 ± 4.79		74.75 ± 4.79	
HER 7.5	69.50 ± 7.18		75.12 ± 4.83	
HER 15	75.50 ± 5.86		73.75 ± 3.61	
HER 30	72.00 ± 4.45		72.00 ± 6.76	
HER 60	76.62 ± 3.19		71.87 ± 6.65	
HER 90	77.63 ± 2.84		75.62 ± 4.06	
HER 120	76.12 ± 3.82		70.75 ± 5.81	
	F _{6, 55} =0.354, p =0.904		F _{6, 55} =0.124, p =0.993	

Tabla 12. Efecto de la administración oral aguda y triple de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina aislada de *Casimiroa pubescens* en el modelo de Campo abierto Todos los resultados están expresados en base a su media ± EEM con una N=8. (Resultados tomados de Ubaldo-Suárez , 2013).

Tomando en cuenta la actividad antidepressiva de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (1) y con el fin de establecer los grupos esenciales para su actividad antidepressiva se decidió evaluar la actividad antidepressiva de la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (2) obtenida como producto de la hidrogenación de HER as í como el derivado DMHN el cual por sus excelentes efectos antidepressivos está en proceso de patente y por lo tanto no se discutirán ni su estructura ni su proceso de obtención, solamente se discutirán sus propiedades antidepressivas.

3. Justificación

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más comunes a nivel mundial. Se caracteriza como un bajo estado del ánimo, anhedonia, con manifestaciones afectivas, ideáticas, conductuales, cognitivas, vegetativas y motoras con serias repercusiones en el Sistema Nervioso Central (SNC). Para contrarrestar estas alteraciones se han diseñado una gama de fármacos de eficacia clínica para el tratamiento de la depresión; sin embargo, esta eficacia se ve limitada por el tiempo que tarda en aparecer el efecto antidepressivo, su respuesta farmacológica presenta una heterogeneidad aproximadamente del 50%; lo cual conlleva a que los pacientes no obtengan una remisión completa y sumado a esto los efectos adversos que producen.

Por otra parte, en la búsqueda de nuevos fármacos antidepressivos con menos efectos adversos y con una mayor eficacia, nuestro grupo ha estudiado de forma sistemática la composición química y la actividad tipo antidepressiva de los extractos de raíces de hexano de *Casimiroa pubescens* (HCP) en ratones. Los resultados mostraron que este extracto induce un efecto tipo antidepressivo en ratones en los modelos de conducta, nado forzado (NF) y suspensión en cola (SC) sin afectar su conducta ambulatoria evaluada en el modelo de campo abierto (CA). El estudio fitoquímico de este extracto permitió el aislamiento de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**), una de las cumarinas mayoritarias presentes en HCP la cual también presentó actividad tipo antidepressiva en los modelos de depresión antes mencionados.

Considerando lo anterior se realizó un estudio con el fin de determinar los grupos funcionales necesarios de **1** para la actividad antidepresiva así como tener derivados que eventualmente ejerzan su efecto antidepresivo más rápido, que sean más selectivos, con menos efectos adversos y una mejor eficacia para esto se decidió evaluar la actividad antidepresiva de la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**) obtenida como producto de la hidrogenación de HER así como el derivado DMHN el cual por sus excelentes efectos antidepresivos está en proceso de patente y por lo tanto no se discutirán ni su estructura ni su proceso de obtención, solamente se discutirán sus propiedades antidepresivas.

4. Hipótesis

Se conoce la actividad antidepresiva de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) por lo tanto es factible suponer que la variación estructural de esta cumarina mediante reacciones químicas se obtengan derivados con diferentes actividades antidepresivas.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar la actividad tipo antidepresiva de los derivados 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**) y DMHN obtenidos a partir de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) aislada de *Casimiroa pubescens*.

5.1.1. Objetivos particulares

- Obtener extractos de hexano a partir de corteza de raíz de *Casimiroa pubescens*.
- Aislar a la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) a partir de extractos de hexano.
- Obtener los derivados 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**) y DMHN
- Evaluar la actividad tipo antidepresiva de **2** y DMHN
- Evaluar la actividad locomotriz de los derivados **2** y DMHN

6. Diseño experimental

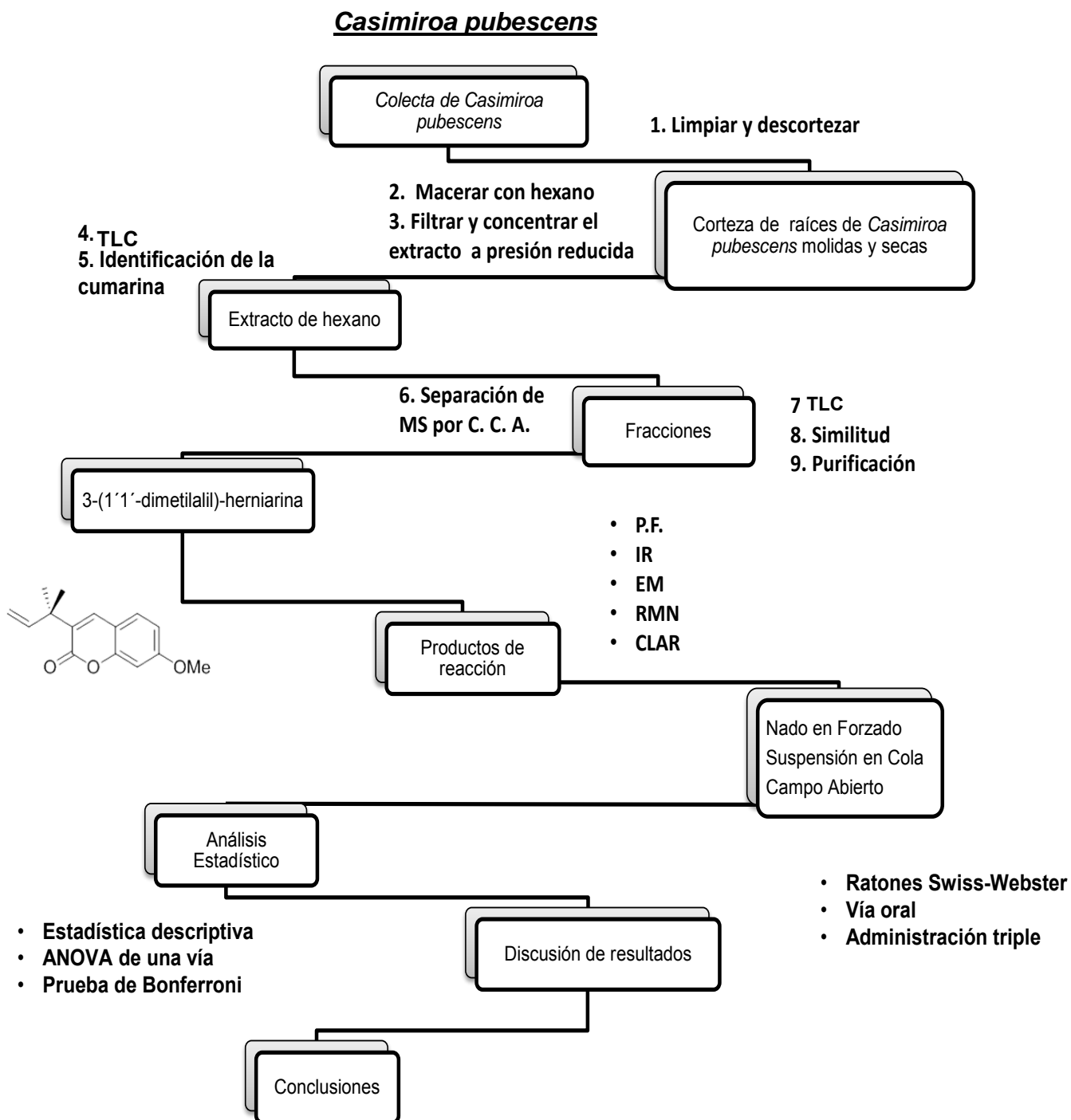


Figura 13. Diseño experimental.

7. Materiales y métodos

Los puntos de fusión se determinaron a partir de 1 mg de muestra utilizando un equipo Fischer-Jones®, los valores para cada compuesto no están corregidos y se reportaron en grados Celsius (°C).

Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron mediante de un espectrofotómetro Nicolet Magna IR 750, en solución utilizando 3 mg de muestra. Las absorbancias se representan en cm^{-1} .

Los espectros de RMN ^1H se obtuvieron a 500 MHz y a 126 MHz para RMN ^{13}C , a través de espectrómetros analíticos Varian UNITY-300, Bucker Avance-300, SUI Varian UNITY Plus-500 utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Se estableció como referencia interna al tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm). Las señales observadas se representan como: s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete; las constantes de acoplamiento (J) se muestran en Hertz (Hz). Por cada producto se emplearon 15 mg para su análisis.

Los espectros de masas se determinaron mediante un espectrofotómetro de masas JOEL JMS-AX505HA; mediante impacto electrónico a 70 eV, utilizando 5 mg de muestra. Los resultados se representaron como la relación de la masa sobre la carga (m/z).

La pureza de cada uno de los productos aislados y purificados se determinó a través de un cromatógrafo UV-Visible Shimadzu, U160; con una columna Zorbax Eclipse Plus C18, con un detector de UV a una $\lambda=254\text{ nm}$,

utilizando una fase móvil de MeOH/agua inicial 10:90, 20 min después 100:0; a un flujo de 0.2 mL/min.

7.1. Material vegetal

Las raíces de *Casimiroa pubescens* se colectaron en los alrededores de Cardonal, Ixmiquilpan, Hidalgo en agosto de 2012. Los ejemplares de herbario se depositaron en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México con número de registro 84833 (FCME).

7.2. Obtención del extracto de hexano de la corteza de raíces de *C. pubescens* (HCP)

Las raíces colectadas de *C. pubescens* se limpiaron y descortezaron por completo. La corteza resultante se secó a temperatura ambiente y se molió hasta obtener la consistencia de un polvo fino.

El polvo resultante se maceró durante tres días con hexano. Posteriormente el extracto resultante se filtró al vacío utilizando papel filtro # 2 (Whatman®). La solución obtenida se concentró a una temperatura de 50°C utilizando un rota-evaporador. Finalmente el extracto se pesó, se identificó (HCP) y se almacenó en un frasco.

7.3. Aislamiento de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (1)

Se realizó un análisis cualitativo del HCP por cromatografía en capa fina (TLC) en donde se observó la presencia de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (1) utilizando como referencia una muestra auténtica de esta cumarina [51].

La separación de los componentes del HCP se realizó utilizando una columna abierta de vidrio empacada con Sílice MN-Kieselgel G (MACHEREY-NAGEL®) en una proporción 1:3 con respecto al peso del extracto. Inicialmente una solución de AcOEt de HCP se mezcló con 12 g de Sílice y se evaporó hasta tener un sólido homogéneo el cual se colocó en la parte superior de la columna cromatográfica previamente empacada con sílice.

La elución de la columna se inició con hexano aumentando la polaridad con mezclas con acetato de etilo (AcOEt), hasta llegar al 100 % de AcOEt, posteriormente se aumentó la polaridad gradualmente con mezclas con metanol (MeOH), hasta terminar con 100 % de éste último disolvente.

Se colectaron fracciones de 50 mL, las cuales se concentraron a presión reducida a una temperatura >50°C. Las fracciones concentradas se colocaron en viales de vidrio; las cuales fueron analizadas mediante TLC y aquellas fracciones que mostraban un perfil cromatográfico similar a **1** fueron reunidas.

La purificación de **1** se logró por cristalizaciones sucesivas; utilizando AcOEt y hexano.

7.4. Obtención de 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (2)

En un matraz para hidrogenación se disolvieron 100 mg de **1** en 100 mL de AcOEt; a la solución se le adicionaron 50 mg de PtO₂.

La mezcla se colocó en atmósfera de hidrógeno (H₂) por 3 horas en agitación constante. Posteriormente la solución se filtró a través de celita y se concentró a presión reducida a una temperatura de 50°C.

La purificación del producto de hidrogenación se realizó por cristalizaciones sucesivas utilizando AcOEt y Hexano.

7.5. Evaluación farmacológica

La evaluación de la actividad tipo antidepresiva de los derivados **2** y **DMHN** se realizó en el Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", en el Laboratorio de Fitofarmacología de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias.

7.6. Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa Swiss Webster de 6 a 8 semanas de edad y de 25 -30 gramos de peso, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Los ratones se dividieron en grupos de 8, con libre acceso al agua y al alimento, manteniendo un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12 h/12 h a una temperatura entre 20-22°C. Previo a cada prueba los animales fueron habituados en el cuarto de experimentación durante una semana para disminuir su estrés.

El uso y cuidado de los animales se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO (1999) y los establecidos por la Guía Internacional de Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio y con la aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Todos los experimentos fueron video-grabados para su posterior análisis.

7.7. Fármacos y sustancias utilizados

Fluoxetina (Clorhidrato de Fluoxetina, Sigma-Aldrich México®) (FLX) e Imipramina (Clorhidrato de Imipramina Sigma-Aldrich México®) (IMI) se disolvieron en una solución isotónica de NaCl al 0.9% (SS) más la adición de Tween 80 (Sigma-Aldrich México®). Ambos antidepresivos se administraron vía intraperitoneal (i.p.),

La cumarina **1** así como sus dos derivados se disolvieron en solución salina más Tween 80 (Sigma-Aldrich México®) y se administraron vía oral con ayuda de una cánula de acero.

7.8. Modelo de Nado Forzado (NF).

El equipo consta de un cilindro de 14 cm de diámetro y 21 cm de altura con 15 cm de agua (aprox. 2.2 L de agua) a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta prueba consiste de dos etapas la primera de ellas es una sesión de entrenamiento, en la cual el ratón se introduce al cilindro por 15 min; en donde el

roedor “*aprende*” que no hay posibilidad de escapar y entonces sólo realiza los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote (inmovilidad).

Una vez terminada la prueba, el animal es retirado del cilindro, se seca con una franela y se deposita en una caja con una fuente de calor hasta que recupera su temperatura normal. En la segunda parte del experimento, 24 h después del entrenamiento, el animal es sometido a la prueba durante 5 min y se registra el tiempo de inmovilidad, utilizando sólo el tiempo de inmovilidad registrado durante los primeros 3 min para el análisis estadístico (Figura 14).



Figura 14. Modelo de Nado Forzado (NF) La prueba consta de 2 sesiones la primera denominada sesión de entrenamiento (15 min) y la segunda llamada sesión de prueba. Una disminución en el tiempo de inmovilidad respecto al control se considera que la molécula en cuestión tiene actividad tipo antidepresiva.

En este modelo una disminución del tiempo de inmovilidad respecto al grupo control es considerado como una actividad tipo antidepresiva. Todos los

experimentos fueron video-grabados para realizar un análisis posterior a su conducta.

7.9. Modelo de Suspensión en Cola (SC).

El equipo consta de una varilla de 1m de largo por 2 cm de espesor, la cual se coloca a una altura de 35 cm de la superficie de trabajo. En esta prueba el roedor es administrado con el compuesto o el fármaco una hora o 30 min antes del experimento, posteriormente el ratón es sujetado del extremo de la cola más alejado del cuerpo con cinta adhesiva a la varilla, en donde éste asume una conducta activa di rigida hacia el escape por lapsos de tiempo, des arrollando durante este tiempo una conducta de inmovilidad. Al término de la prueba el animal es retirado de la varilla y depositado en una caja de plástico. Esta prueba tiene una duración de 6 min registrando solo el tiempo de los últimos 4 min para el análisis estadístico.



Figura 15. Modelo de Suspensión en Cola (SC) La prueba tiene una duración de 6 min; una disminución en el tiempo de inmovilidad respecto al control se considera que la molécula en cuestión tiene actividad tipo antidepresiva.

Esquema de administración Aguda								
Tratamiento	Vía de administración	Dosis mg/kg	Sesión de entrenamiento (15min)			Latencia de administración (h)		
						1ª Adm	2ª Adm.	3ª Adm
C	v.o.	-----				0.5	-----	-----
2	v.o.	30				1	-----	-----
DMHN	v.o.	30				1	-----	-----
IMI	i.p.	32				0.5	-----	-----
FLX	i.p.	15				0.5	-----	-----
Esquema de administración Triple								
Tratamiento	Vía de administración	Dosis mg/kg	Sesión de entrenamiento (15min)			Latencia de administración (h)		
						1ª Adm	2ª Adm.	3ª Adm
C	v.o.	30				24	6	0.5
2	v.o.	30				24	6	1
DMHN	v.o.	32				24	6	1
IMI	i.p.	15				24	6	0.5
FLX	i.p.	30				24	6	0.5

Tabla 13. Administración aguda y triple de la 3-(1',1'-dimetil-propil)-herniarina (2), El producto en proceso de patente (DMHN), Imipramina, (IMI), Fluoxetina (FLX) y Grupo control (C).El esquema de administración de 1, 2, DMHN y los fármacos antidepresivos se realizó partiendo de los trabajos previos de Ubaldo Suarez D.

7.10. Modelo de Campo Abierto (CA)

Este modelo evalúa la actividad locomotriz de los roedores, el cual consiste de una caja de acrílico de 53 X 43 cm y 21cm de altura, dividido en 6 cuadrantes del mismo tamaño; donde el roedor se coloca en el centro de la caja y durante 5 min se cuentan los cuadrantes que el roedor los atraviesa.

El aumento o disminución en el número de transiciones de un cuadrante a otro con respecto a un grupo control es considerado como una alteración en la actividad locomotriz ^[36].



Figura 16: Modelo de Campo Abierto (CA). La prueba tiene una duración de 5 min. Una disminución en el número de transiciones de un cuadrante a otro con respecto al control se considera que la molécula en cuestión tiene actividad tipo antidepresiva.

7.11. Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron utilizando una ANOVA de una vía en rangos; seguida de una prueba *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

El análisis estadístico de cada una de las pruebas se realizó utilizando el programa estadístico IBM SPSS (versión 21). Las gráficas por otro lado fueron trazados utilizando el programa SigmaPlot (versión 12.0 Jandel Scientific).

8. Resultados

8.1. Resultados químicos

A partir de 29 39.4 g de corteza de raíz de *C. pubescens* se obtuvieron 26.4960 g de extracto de hexano (HCP). La comparación de este extracto con una muestra auténtica de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) por un análisis cromatográfico en placa fina (TLC) demostró la presencia de esta cumarina en HCP.

De las fracciones eluidas con hexano-AcOEt 9:1 de la cromatografía en columna de HCP, se aislaron 7458.9 mg de un sólido blanquecino cristalino. Asimismo, de las aguas madres resultantes se aislaron 1614.7 mg del mismo producto. Este sólido fue purificado por medio de cristalizaciones sucesivas para obtener 9073.6 mg de cristales con un p.f. de 119-120°C y una pureza del 99.33%. La identidad de este sólido como la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) ($C_{15}H_{16}O_3$; 244 g/mol) se logró mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

EM (IE, 70 eV) [m/z]: 244 [M^+], 229 ($M^+ - CH_3$), 217 ($M^+ - CH=CH_2$), 201 ($M^+ - CH_2 - CH_2 - CH_3$), 180 ($M^+ - 64$), 156 ($M^+ - 88$), 139 ($M^+ - 105$), 111 ($M^+ - 133$), 75 ($M^+ - 169$), 29 ($M^+ - 215$).

IR ($CHCl_3$ /sol.) $\nu_{m\acute{a}x}$: 3084 ($=CH_2$), 3054 (*ar*), 2998 ($=CH-$), 2974 (CH_3), 2916 ($=CH_2$), 2875 (CH_3), 2839 (OCH_3), 1695 (α -pirona), 1612 ($=CH_2$), 1501 (α -pirona), 1458 (CH_3), 1360 (CH_3), 1246, 1220, 965 y 943 cm^{-1} .

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.54 (H-4) (s, 1H), 7.36 (H-5) (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.83 (H-6) (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.81 (H-8) (s, 1H), 6.27 – 6.05 (H-2') (m, 1H), 5.13 (H-3'a) (s, 1H), 5.09 (H-3'b) (dd, J = 6.5, 1.0 Hz, 1H), 3.88 (OCH_3) (s, 3H), 1.50 (CH_3) (s, 6H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 163.31 (C-7), 161.73 (C-2), 156.78 (C-10), 146.85 (C-2'), 139.00 (C-4), 133.85 (C-3), 130.75 (C-6), 113.24 (C-9), 112.82 (C-6), 111.96 (C-3'), 101.09 (C-8), 56.04 (OCH_3), 37.16 (C-1'), 30.75 – 30.36 (2- CH_3).

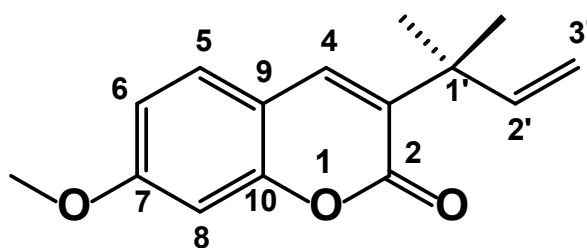


Figura 17. Estructura de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (1).

8.1.1. Modificaciones estructurales

Después del aislamiento e identificación de **1** se procedió a realizar las modificaciones estructurales pertinentes. Mediante dos procesos de semi-síntesis. Se obtuvieron dos derivados de esta cumarina. El primero de ellos fue un producto que hasta el momento se encuentra en proceso de patente con número IQU 1542/12 (**DMHN**), que es un sólido amarillo claro con un p. f.=134- 135°C y el segundo producto a diferencia de su antecesor es un sólido beige con un p.f.= 86- 87°C con una pureza del 98. 78% correspondiente a la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**) (C₁₅H₁₈O₃; 246 g/mol); cuyo rendimiento fue del 80%.

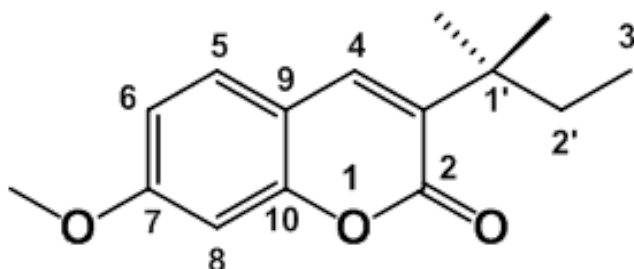


Figura 18. Estructura de la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**).

Sus datos espectroscópicos y espectrométricos son los siguientes:

EM (IE, 70 eV) [*m/z*]: 246 [**M⁺**], 244 (**M⁺ - H₂**), 229 (**M⁺ - 17**), 217 (**M⁺ - CH₂-CH₃**), 201 (**M⁺ - 45**), 189 (**M⁺ - 57**), 173 (**M⁺ - 73**), 155 (**M⁺ - 91**), 115 (**M⁺ - 131**).

IR (CHCl₃ /sol.) $\nu_{\text{máx}}$: 3547 (**ar**), 3085 (**ar**), 3037, 3018, 3002 (**CH₃**), 2966, (**CH₂**), 2934 (**CH₃**), 2874 (**OCH₃**), 2842 (**CH₂**), 1711(**α -pirona**), 1616(**α -pirona**), 1508(**α -pirona**), 1463 (**CH₃**), 1360 (**CH₃**), 1246, 1220 (**CH₃-C-CH₃**), 965 y 943 cm⁻¹.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.44 (H-4) (s, 1H), 7.34 (H-5) (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.82 (H-6) (dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H), 6.79 (H-8) (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.86 (OCH₃) (s, 3H), 1.87 (H-2') (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.32 (2-CH₃) (s, 6H), 0.72 (H-3') (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).

^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 161.84 (C-7), 160.10 (C-2), 154.90 (C-10), 138.20 (C-4), 131.98 (C-3), 128.38 (C-5), 113.05 (C-9), 112.18 (C-6), 99.97 (C-8), 55.69 (C-2'), 38.26 (C-1'), 32.05 (OCH₃), 26.66 (2-CH₃), 9.31 (C-3').

DEPT-90 (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 138.20 (CH-4), 128.38 (CH-5), 112.18 (CH-6), 99.97 (CH-8).

DEPT-135 (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 138.21 (CH-4), 128.39 (CH-5), 112.19 (CH-6), 99.97 (CH-8), 55.69 (OCH₃), 32.06 (CH₂-2'), 26.67 (2-CH₃), 9.32 (CH₃-3').

HMBC, HSQC: C-3 → H-2', H-4, 2-CH₃; C-4 → H-5, H-4; C-5 → H-4; C-6 → H-8, H-6; C-7 → OCH₃, H-5; C-8 → H-7; C-10 → H-4, H-5; C-1' → H-2', H-3', H-4, 2-CH₃; C-2' → H-3', 2-CH₃.

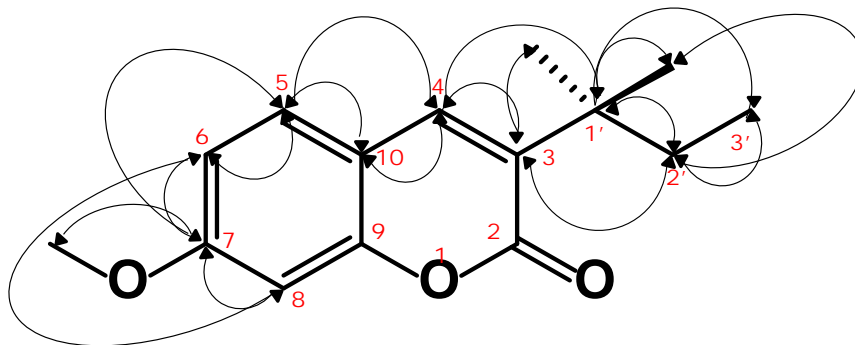


Figura 19. Interacciones C→H, HMBC de 2.

8.2. Resultados farmacológicos

8.2.1. Modelo de Nado Forzado (NF)

El efecto de la triple administración de **(2)** (2 ; $30\text{mg/kg} = 78.55 \pm 0.9$; $F_{4, 79} = 286.08$, $p \leq 0.001$) no redujo el tiempo de inmovilidad (seg.); ya que al compararlo contra el grupo control **(C)** ($C = 73.77 \pm 2.91$; $F_{4, 79} = 286.08$, $p \leq 0.001$), no se observó diferencia significativa como se observa en la figura 20. Sin embargo, **DMHN** (DMHN ; $30\text{mg/kg} = 21.49 \pm 3.24$; $F_{4, 79} = 286.08$, $p \leq 0.001$) bajo el mismo esquema de administración redujo en un 70.86% el tiempo de inmovilidad similar al de **FLX** (FLX ; $15\text{mg/kg} = 19.85 \pm 0.37$; $F_{4, 79} = 286.08$, $p \leq 0.001$) la cual redujo el tiempo de inmovilidad en un 73.08%.

Sin embargo, esta reducción fue menos potente que la ejercida por **IMI** (IMI ; $32\text{mg/kg} = 3.92 \pm 0.54$; $F_{4, 79} = 286.08$, $p \leq 0.001$) la cual redujo en un 94.68% el tiempo de inmovilidad (seg.) respecto al grupo control **C** (Figura 20). Así mismo, al comparar el efecto de la triple administración de **1** (1 ; $30\text{mg/kg} = 34.97 \pm 1.01$;) respecto a sus dos derivados se observó (Figura 21) que **DMHN** (DMHN ; $30\text{mg/kg} = 21.49 \pm 3.24$; $F_{2, 47} = 212.6$, $p \leq 0.001$) redujo aún más el tiempo de inmovilidad en un 38.52%; mientras que **2** (2 ; $30\text{mg/kg} = 78.55 \pm 0.99$; $F_{2, 47} = 212.6$, $p \leq 0.001$) aumento el tiempo de inmovilidad en un 124.63% respecto a **1**.

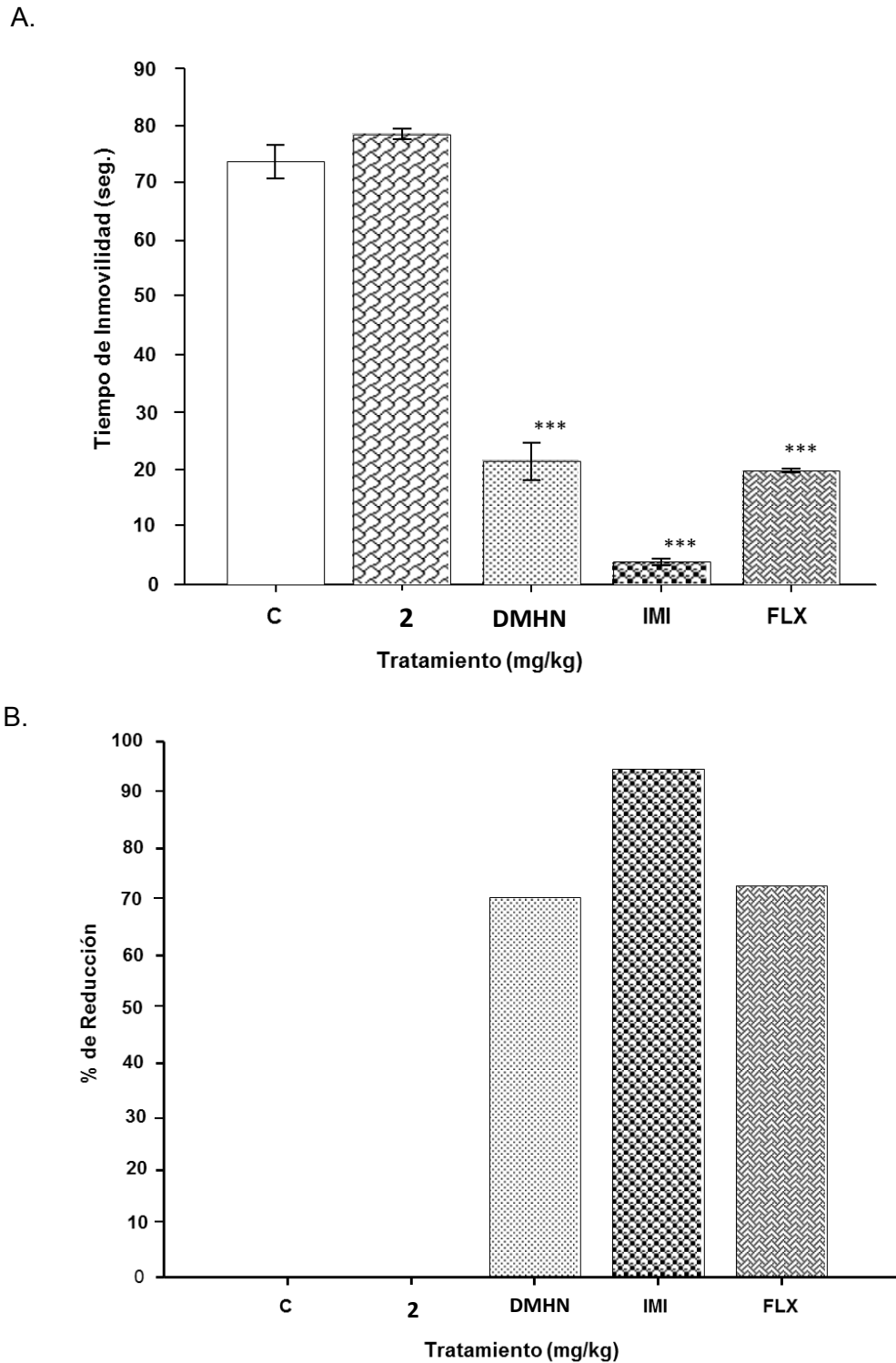


Figura 20. (A) Efecto de la triple administración de 2 y MPHN, a la dosis de 30 mg/Kg y los antidepresivos IMI y FLX contra el grupo control (C) sobre el tiempo de inmovilidad en NF. El tiempo de inmovilidad se analizó mediante una ANOVA de una vía (One-way ANOVA) seguida de prueba de Bonferroni. Los datos son representados en barras \pm EEM *** $p \leq 0.001$ con una $n=16$. **(B)** % de Reducción de 2, DMHN y los antidepresivos IMI y FLX en base al grupo control C.

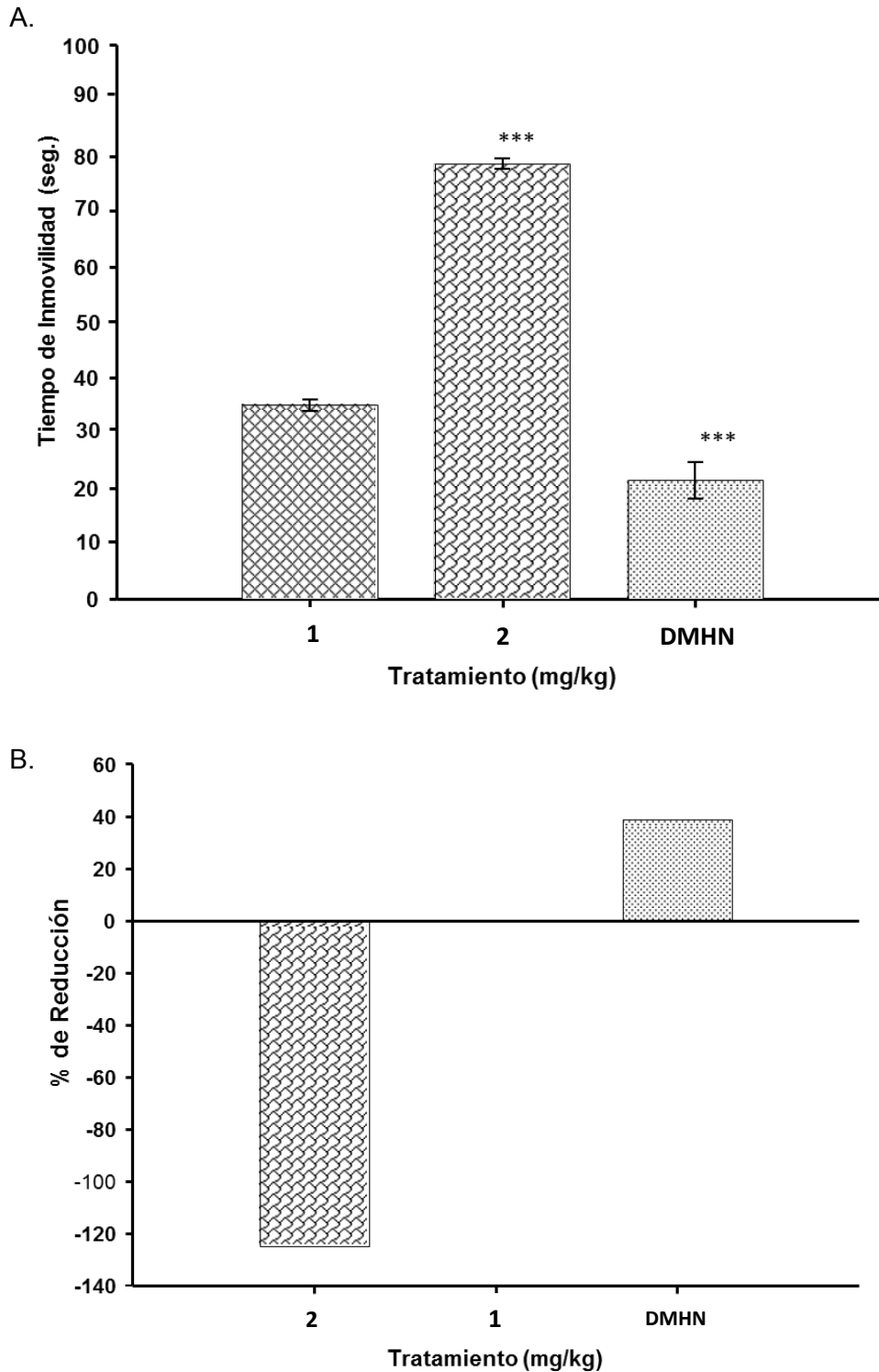


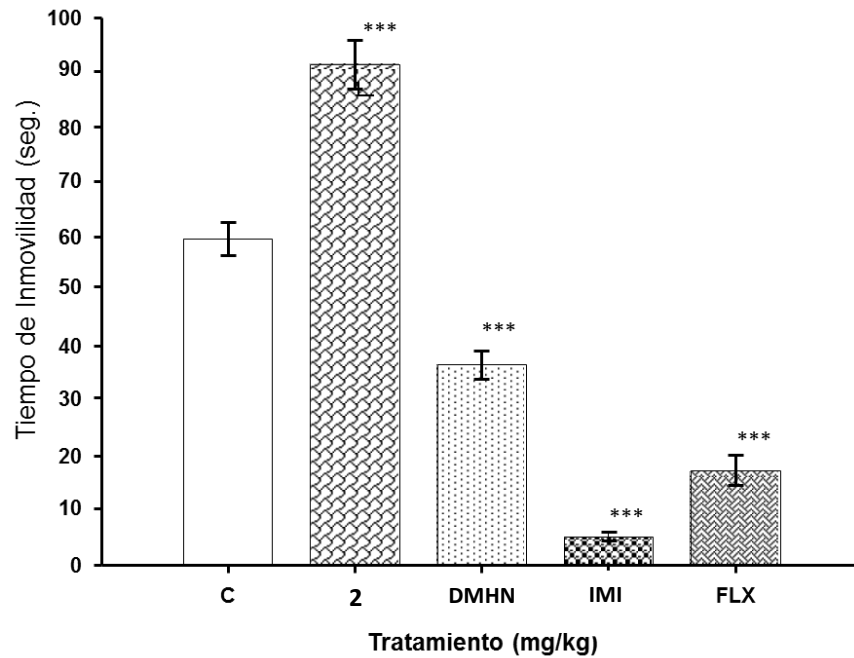
Figura 21. (A) Efecto de la triple administración de 1 a 2 y DMHN, a la dosis de 30 mg/Kg contra 1 sobre el tiempo de inmovilidad en NF. El tiempo de inmovilidad se analizó mediante una ANOVA de una vía (One-way ANOVA) seguida de prueba de Bonferroni. Los datos son representados en barras \pm EEM *** $p < 0.001$ con una $n = 16$. **(B)** % de Reducción de 2, DMHN en base a 1.

8.2.2. Modelo de Suspensión en Cola (SC)

Como se muestra en la Figura 22 la administración aguda de **2** ($2; 30\text{mg/kg}=91.42 \pm 4.11; F_{4,39} = 136.01, p \leq 0.001$) no muestra una reducción en el tiempo de inmovilidad (seg.); ya que al compararlo contra **C** ($C= 59.62 \pm 2.96; F_{4,39} = 136.01, p \leq 0.001$), se observa que aumenta significativamente el tiempo de inmovilidad en un 53.30%. Sin embargo, la administración de **DMHN** ($DMHN; 30\text{mg/kg}=36.60 \pm 2.61; F_{4,39} = 136.01, p \leq 0.001$) redujo significativamente el tiempo de inmovilidad en un 38.61%; sin embargo, esta reducción resultó menos potente que la inducida por los antidepresivos **IMI** ($IMI; 32\text{mg/kg}=5.20 \pm 0.78; F_{4,39} = 136.01, p \leq 0.001$) en un 91.27% y **FLX** en un 70.90% ($FLX; 15\text{mg/kg}=17.34 \pm 2.80; F_{4,39} = 136.01, p \leq 0.001$) respecto a **C**.

Por otra parte se observó que **2** ($2; 30\text{mg/kg}=91.42 \pm 4.41; F_{2,23} = 76.02, p \leq 0.001$) e **DMHN** ($DMHN; 30\text{mg/kg}=36.60 \pm 2.61; F_{2,23} = 76.02, p \leq 0.001$) ejercen efectos significativamente diferentes respecto a **1** ($1; 30\text{mg/kg}=78.24 \pm 2.44; F_{2,23} = 76.02, p \leq 0.001$) (Figura 23). De los cuales solamente **DMHN** mostró un aumento del 53.21% en la reducción sobre tiempo de inmovilidad; por el contrario **2** produjo un aumento sobre el tiempo de inmovilidad en un 16.85% respecto a **1**.

A.



B.

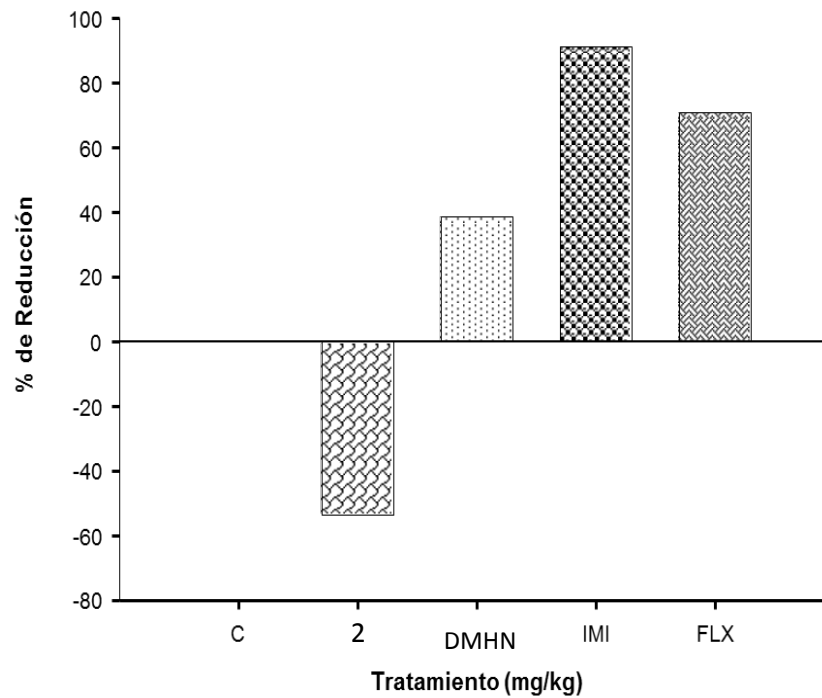


Figura 22. (A) Efecto de la triple administración de 2 y DMHN, a la dosis de 30 mg/Kg y los antidepresivos IMI y FLX vs el grupo control (C) sobre el tiempo de inmovilidad en SC. El tiempo de inmovilidad se analizó mediante una ANOVA de una vía (One-way ANOVA) seguida de prueba de Bonferroni. Los datos son representados en barras por sus medias \pm EEM *** $p \leq 0.001$ con una $n=16$. **(B)** % de Reducción de 2, DMHN y los antidepresivos IMI y FLX en base al grupo control C.

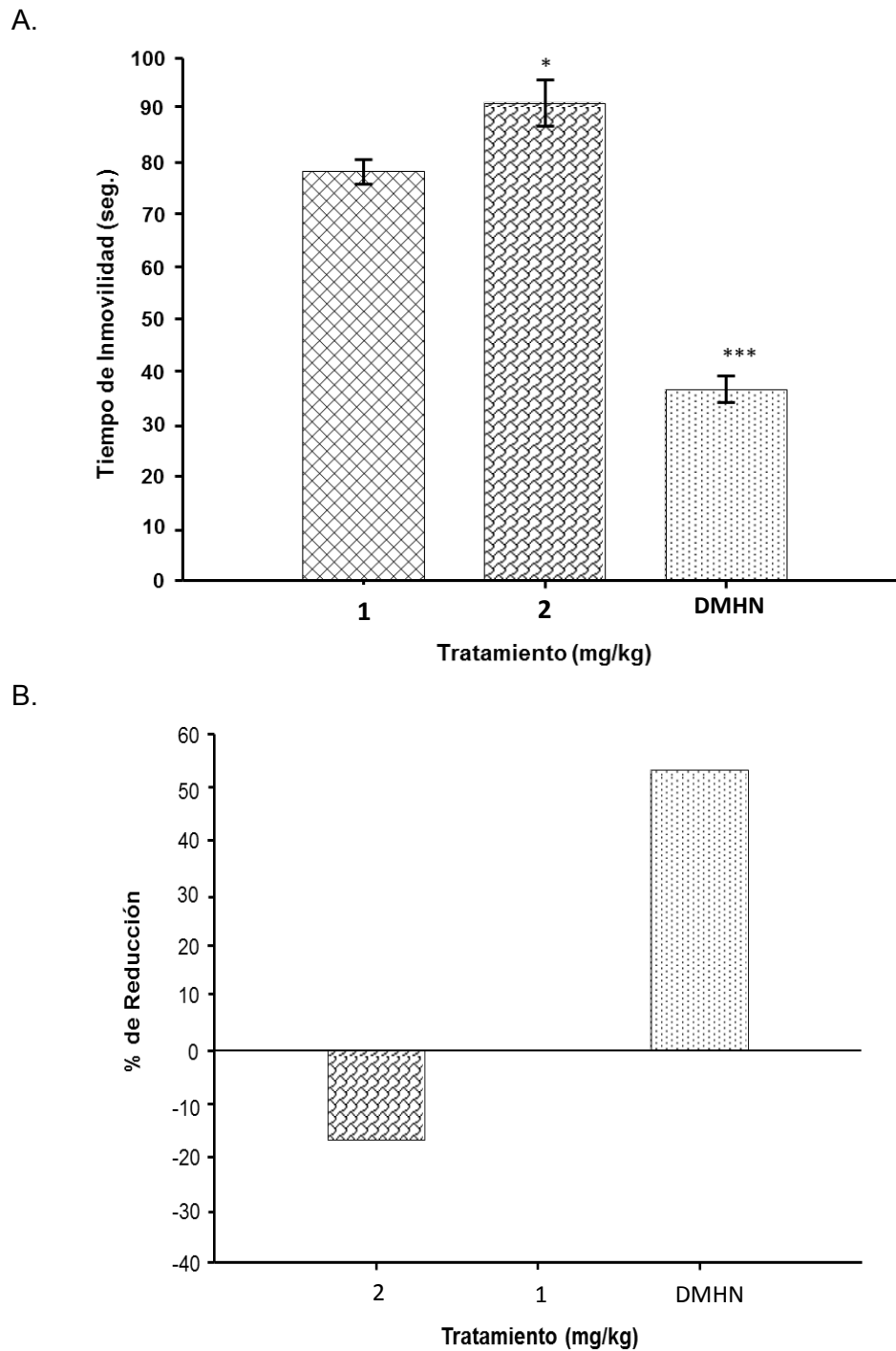


Figura 23. (A) Efecto de la triple administración de 2 y DMHN, a la dosis de 30 mg/Kg vs 1 sobre el tiempo de inmovilidad en SC. El tiempo de inmovilidad se analizó mediante una ANOVA de una vía (One-way ANOVA) seguida de prueba de Bonferroni. Los datos son representados en barras \pm EEM * $p \leq 0.5$; *** $p \leq 0.001$ con una $n=16$. **(B)** % de Reducción de 2, DMHN en base a 1.

8.2.3. Evaluación de la actividad locomotriz en el Modelo de Campo Abierto (CA)

Como se muestra en la Tabla 14 la administración aguda y triple de las moléculas administradas, en su mayoría no afectó la actividad ambulatoria de los animales experimentales. Solamente la administración de **2** afecta la actividad locomotriz de los animales experimentales presentando una diferencia significativa respecto a **C**.

Tratamiento (mg/kg)	Actividad (número de cuentas/ 5 min)	Actividad (número de cuentas/ 5 min)
	Media± EEM Administración Aguda	Media± EEM Administración Triple
Control	74.75 ± 4.79	78.50 ± 4.49
2	32.50 ± 4.70	45.50 ± 5.01
DMHN	66.25 ± 8.85	78.00 ± 4.08
IMI	75.62 ± 4.06	78.50 ± 2.05
FLX	83.50 ± 3.21	77.50 ± 2.98
	F _{4, 39} =13.26; p ≤0.001	F _{4, 39} =14.25; p≤ 0.001

Tabla 14. Efecto de la administración aguda y triple de **2**, DMHN y los antidepresivos IMI y FLX usados en el modelo de Campo abierto. Todos los resultados están expresados en base a su media ± EEM con una N=8.

9. Discusión de Resultados

La depresión es un trastorno que afecta a una gran parte de la población; ya que debido a su elevada prevalencia e impacto negativo, esta enfermedad se ubica entre las primeras causas de incapacidad en el mundo ^[3]. Esta enfermedad se manifiesta conductual y fisiológicamente con síntomas heterogéneos y multifactoriales con un alto impacto socio-económico ^[39]. Desafortunadamente, la creciente tasa de morbilidad de la depresión no es similar a la mejoría de sus tratamientos. Porque aunque existen varias clases de antidepressivos eficaces que disminuyen la sintomatología de esta enfermedad; estos fármacos presentan una variedad de efectos adicionales como hipotensión postural, problemas de memoria/cognición, visión borrosa, boca seca, estreñimiento, disfunción sexual, trastornos del sueño y del apetito debido a la fisiología de sus mecanismos de acción; obligando a muchos pacientes a abandonar los tratamientos; lo cual deriva en que los pacientes no obtengan una remisión completa de esta enfermedad ^[11].

Por lo cual se han aislado y sintetizado nuevas moléculas que tengan una mayor eficacia siendo más selectivos y que generen menos efectos adversos; como es el caso de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) aislada de *Casimiroa pubescens* la cual ha demostrado ser una molécula con propiedades tipo antidepressivas evaluadas en dos modelos de conducta.

Con la finalidad de mejorar las propiedades farmacológicas de una molécula líder, la modificación estructural de éste tipo de compuestos es una alternativa para crear mejores antidepressivos.

Como se mencionó previamente, en el presente estudio, a partir de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) se obtuvieron dos nuevas moléculas; de las cuales, **DMHN** al estar en proceso de patente no se pueden revelar datos acerca de su estructura.

Por otro lado, la hidrogenación catalítica de **1** produjo la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**) con un rendimiento del 80 %. La estructura de **2** se dedujo mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

La evaluación de la actividad tipo antidepressiva se realizó mediante los paradigmas de Nado Forzado (NF) y Suspensión en Cola (SC). Ambos modelos se han utilizado para detectar un amplio espectro de nuevas sustancias con eficacia antidepressiva.

En nuestra evaluación el modelo de Nado Forzado, es una modificación del descrito por Porsolt en 1977. Inicialmente, en lo que se denomina la fase de “entrenamiento”, los roedores son sometidos a una situación de estrés obligándolos a nadar. En ésta fase los animales “aprenden” que no pueden escapar y solo realizan los movimientos necesarios para mantenerse a flote adoptando una conducta de inmovilidad la cual es interpretada como una conducta de desesperanza o como un bajo estado de ánimo. La administración de un fármaco o compuesto que reduzca el tiempo de inmovilidad se considerará antidepressivo; ya que abarcaría la conducta de inmovilidad que los ratones previamente adquirieron.

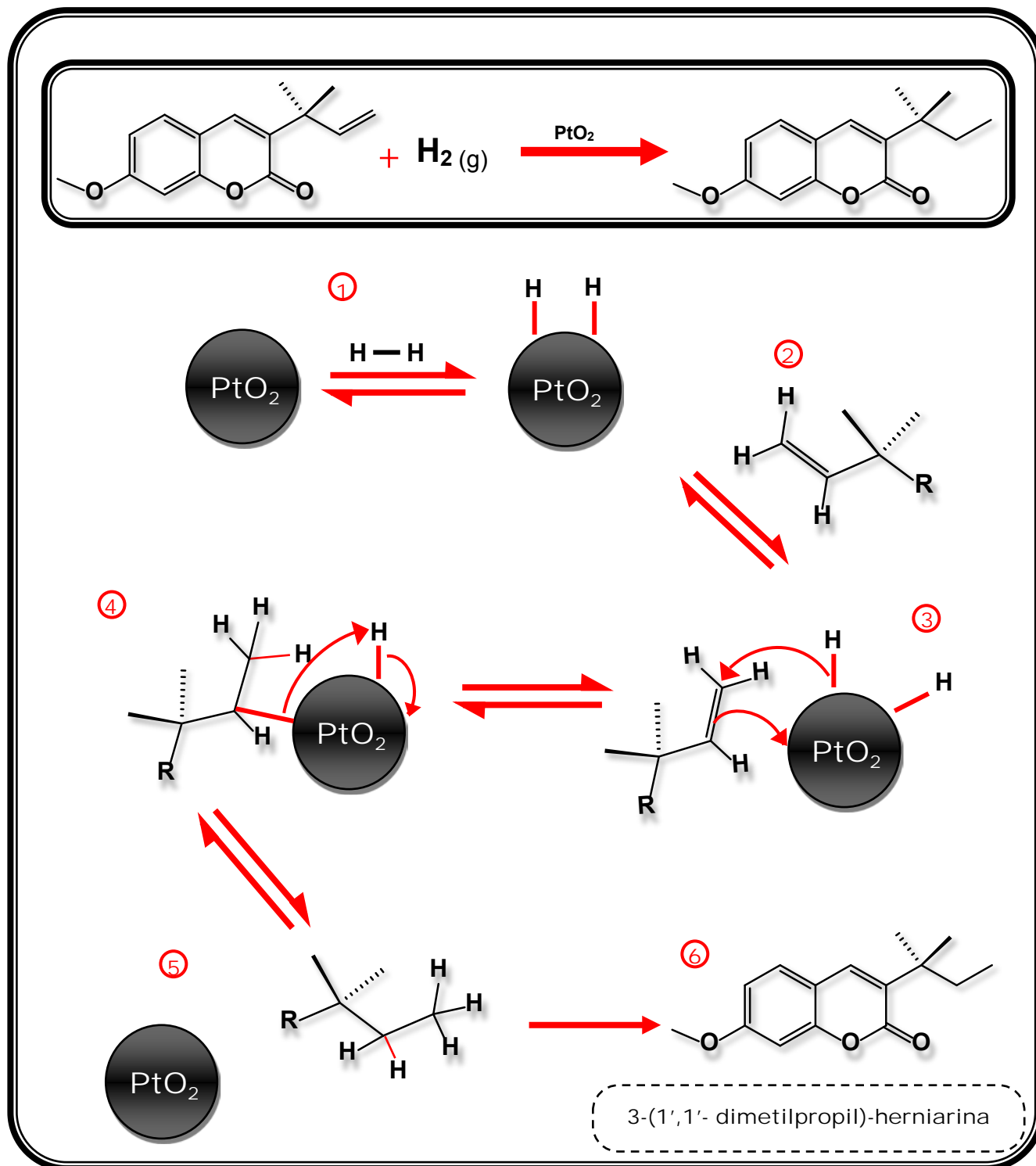


Figura 24. Mecanismo de formación de la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina. (1) Interacción entre la superficie del óxido de platino (PtO_2) y el hidrógeno molecular (H_2), (2) Adición de **1** e interacción de la doble ligadura de este con el catalizador, (3) Interacción un primer hidrógeno sobre el carbono menos sustituido por la apertura del doble enlace, (4) Adición del primer hidrógeno sobre **1** y la interacción entre el par de electrones resultante de la apertura de la doble ligadura sobre un segundo hidrógeno, (5) Adición del segundo hidrógeno sobre **1** y formación de la 3-(1',1' dimetilpropil)-herniarina **2**.

Al evaluar el efecto tipo antidepresivo de los productos de la modificación de **1** bajo el paradigma de nado forzado se observó que los animales tratados con DMHN a la dosis de 30 mg/kg, presentaron un efecto tipo antidepresivo, al disminuir significativamente el tiempo de inmovilidad en un 70.86% respecto al grupo control (Figura 20). Por el contrario, los animales tratados con **2** bajo el mismo esquema de administración y dosis, mostraron que esta molécula no ejerció un efecto sobre los roedores. Al contrario de DMHN la administración de **2** indujo a los ratones a adoptar la misma conducta de inmovilidad que la observada por el grupo control. Al comparar los efectos de ambas moléculas con aquellos producidos por dos antidepresivos utilizados comúnmente en clínica, se observó que solo DMHN bajo el mismo esquema de administración ejerció un efecto similar al inducido por la flouxetina (FLX) a la dosis de 15 mg/kg. Éste hallazgo indica que probablemente DMHN actúe de forma similar participando mayoritariamente en la inhibición selectiva de la recaptura de alguna de las monoaminas. Asimismo al comparar el efecto de DMHN contra el ejercido por imipramina (IMI) se observó que aunque ambos ejercen un efecto tipo antidepresivo, sus efectos no son similares.

Por otro lado, al comparar los efectos que tuvieron **2** y DMHN con aquellos ejercidos por **1**, se observó que DMHN mejoró el efecto tipo antidepresivo en un 38.52%; mientras que **2** por el contrario disminuyó el efecto en un 124.63%; por lo que la hidrogenación de **1** no mejoró el efecto tipo antidepresivo (Figura 21).

Por otro lado, en el modelo de suspensión en cola los ratones fueron sometidos al igual que en NF a una situación de estrés, sin embargo la naturaleza de este estrés es diferente. En este modelo el animal se somete a un estrés que implica la tensión

hemodinámica de ser colgado por la cola [38]; lo cual genera que el animal intente escapar al realizar diferentes movimientos rígidos a liberar su cola; después de hacer los movimientos orientados al escape desarrollan una postura inmovilidad (37). Sin embargo en este paradigma como se mencionó anteriormente, la inmovilidad es debida a la incapacidad de mantener el esfuerzo en lugar de una disminución en la actividad generalizada [39]. La conducta de inmovilidad observada en este modelo puede ser análoga a las observaciones clínicas en los pacientes deprimidos que a menudo carecen de fuerza para mantener un esfuerzo lo que se refleja en un deterioro psicomotor pronunciado [40].

Los resultados de la administración de **2** en el modelo de SC indicaron que este compuesto incremento la conducta depresiva de los animales de prueba al aumentar el tiempo de inmovilidad en 53 % con respecto al grupo control.

Por el contrario, DMHN disminuyó en un 38.61% el tiempo de inmovilidad de los roedores respecto al grupo control. Este resultado aunado al obtenido en el modelo de NF indica claramente que DPHN es una agente antidepresivo.

Por otra parte, con el fin de descartar otros efectos que estuvieran ligados a la disminución sobre el tiempo de inmovilidad o que afecten la actividad locomotriz, se procedió a realizar la prueba de campo abierto (CA). En este modelo el animal sigue su instinto de explorar un nuevo lugar y si esta conducta es modificada bajo algún tratamiento, la diferencia respecto al grupo control se adoptaría como un efecto sobre la actividad locomotriz de los ratones por lo que el efecto sobre el tiempo de inmovilidad no sería tipo antidepresivo. Al evaluar tanto a los antidepresivos como a los productos de reacción, se observó que solo **2** modificaba la conducta ambulatoria

de los roedores al disminuir el número de cruces significativamente respecto al grupo control.

10. Conclusiones

La obtención de nuevas moléculas por medio de la modificación estructural ha sido un campo de interés en la elaboración de nuevos fármacos antidepresivos. En el presente estudio se obtuvieron los derivados 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**) y DMHN a partir de 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**).

Los resultados de la evaluación del tipo antidepresiva de DMHN en los modelos conductuales NF y SC indicaron que este compuesto ejercía una actividad tipo antidepresiva mejor que **1** y aún más, que su efecto sobre los ratones era similar a la flouxetina (FLX) un antidepresivo inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina por lo que se procedió a la obtención de su curva dosis-respuesta y demás experimentos para el registro de esta patente.

El segundo de ellos fue la 3-(1',1'-dimetilpropil)-herniarina (**2**), la cual es el producto de hidrogenación de la 3-(1',1'-dimetilalil)-herniarina (**1**) no obstante esta nueva molécula al evaluarla en NF y SC, reveló que no ejercía un efecto tipo antidepresivo.

Estos resultados validan nuestra hipótesis la cual sustenta que cambios estructurales por métodos químicos modifican la actividad biológica de compuestos bioactivos de origen natural.

1. Kessler RC, Angermeyer M, Anthony JC, De Graaf R, Demyttenaere K, Gasquet I, De Girolamo G, Gluzman S, Gureje O, Haro JM (2007). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry* 6:168–176.
2. Rafful C, Medina-Mora ME, Borges G, Benjet C, Orozco R (2012) Depression, gender and the treatment gap in Mexico. *J Affect Disord* 138:165–169.
3. WHO | Depression - World Health Organization. <http://www.who.int> consultada en Septiembre 2013.
4. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) de la American Psychiatric Association (2004).
5. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B (2007) Depression, chronic diseases, and decrements in health: Results from the World Health Surveys. *Lancet* 370: 851-858.
6. Disalver S, Chen YH, Swann AC, Shoaib AM, Krajevski KJ (1994) Suicidality in patients with pure and depressive mania. *Am. J. Psychiatry* 151:1312-1315.
7. Strakowski SM, McElroy SL, Keck Jr PE, West SA (1996) Suicidality among patients with mixed and manic bipolar disorder. *Am. J. Psychiatry* 153: 674-676.
8. Benjet C, Borges G, Medina-Mora ME, Fleiz-Bautista C, Zambrano-Ruiz J (2004) Early onset depression: prevalence, course, and treatment seeking delay. *Salud Publica de México* 46:417-424.
9. Hamet P, Tremblay J (2005) Genetics and genomics of depression. *Metabolism* 54: 10-15.
10. Lanni C, Govoni S, Luchelli A, Boselli C (2009) Depression and antidepressants: Molecular and Cellular Aspects. *Cell Mol Life Sci* 66: 2985-3008.
11. Van Praag HM (2004) Can stress cause depression? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 891-907.
12. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of Depression. *Neuron* 34:13–25.
13. Elhwuegi AS (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28:435-51.

14. Marije aan het R, Sanjay JM, Dennis SC (2009) Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *Can Med Assoc J* 180:305-313.
15. Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7:524-533.
16. Bunney WE Jr, Davis JM (1965) Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry* 13(6):483-494.
17. Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113:1237-1264.
18. Ordway G A, Smith KS, Haycock JW (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry* 59:11-14.
19. Baldessarini RJ, Marsh ER: Fluoxetine and side effects. *Arch Gen Psychiatry* 1990; 47: 191-192.
20. Cowen PJ (2008) Serotonin and depression: pathophysiology mechanism or marketing myth? *Trends Pharmacol Sci* 29:433-436.
21. Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. 2013. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 259-268.
22. Krishnan V, Nestler E J (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
23. Salín-Pascual RJ (2008) Neurobioquímica y psicofarmacología de las enfermedades psiquiátricas. Ed. Lulu. México, D.F. pps 258-347
24. Nestler EJ (1998) Antidepressant treatments in the 21st Century. *Society Of Biological Psychiatry* 526-533.
25. Marks DM, Pae CU, Patkar AA (2008) Triple Reuptake Inhibitors: The Next Generation of Antidepressants. *Curr Neuropharmacol*. 6(4):338-343.
26. Vetulani J, Nalepa I (2000) Antidepressants: past, present and future. *Eur J Pharmacol* 405:351-363.

27. Ward K, et al. (2005) New Developments in Antidepressant Therapy. *Nurs Clin N Am* 40:95–105.
28. Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.* 19:378–383.
29. Artigas F, Celada P, Laruelle M, Adell A (2001) How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol. Sci.* 22:224–228.
30. Adell A, Castro E, Celada P, Bortolozzi A, Pazos A, Artigas F (2005) Strategies for producing faster acting antidepressants. *Drug Discovery Today* 10:578-585.
31. Pacher P, Kóhegyi E, Kécskemeti V, Furst S (2001) Current Trends in the Development of New Antidepressants. *Current Medicinal Chemistry*, 8(2):89-100.
32. O’Neill MJ, Bleakman D, Zimmerman DM, Nisenbaum ES (2004) AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS, *Neurol. Disord* 3:181-194.
33. López-Rubalcava C, Mostelac-Preciado C, Estrada-Camarena E (2009) The forced swimming test: An animal model for the study of antidepressant drugs. In *Models of Neuropharmacology*. Ed. Rocha-Arrieta LL and Granados-Soto V. 149-168.
34. Cryan JF, Holms A (2005) The Ascent of mouse advances in modeling human depression and anxiety. *Nature* 4:775-790
35. Porsolt RD, Bertin, A. Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.
36. Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Araujo Escalona AG, Ledesma Velázquez I, Martínez-Mota L, Moreno J, Heinze G (2012) Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *J Ethnopharmacol* 139:164-70.
37. Steru L, Chermat R, Thiery B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85:367-370.
38. Thierry B, Steru L, Simon P, Porsolt RD (1986) The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology* 90:284-285.

39. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29:571-625.
40. Weingarter H, Silberman E (1982) Models in cognitive impairment: cognitive changes in depression. *Psychopharmacology* 8:2.
41. Martínez M (1951). Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anales del Instituto de Biología*. 22(1):25-181.
42. Martínez M (1969). Las Plantas Medicinales de México, Edit. Botas, 5ta. Ed., México 349-355.
43. Mora SG, Diaz-Veliz G, Lungenstrass H, García-González M, Coto-Morales T, Poletti C, De Lima TCM, Herrera-Ruiz M, Tortoriello J (2005) Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. *J Ethnopharmacol* 97:191–197.
44. Magos GA, Vidrio H, Enríquez R (1995) Pharmacology of *Casimiroa edulis*; III. Relaxant and contractile effects in rat aortic rings. *J. Ethnopharmacol* 47:1–8.
45. Muccillo-Baisch AL, Urban H, Navarro-Ruiz A (2004) Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of lyophilized seed of *Casimiroa edulis* (AECe) on rat mesenteric arterial bed. *J Ethnopharmacol* 95:163-167.
46. Magos GA, Vidrio H (1991) Pharmacology of *Casimiroa edulis*; part I. Blood pressure and heart rate effects in the anesthetized rat. *Planta Med* 57:20–24.
47. Magos GA, Vidrio H, Reynolds WF, Enriquez RG (1999) Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *J Ethnopharmacol* 64:35–44.
48. Magos GA, Vidrio H, Enríquez R (1995) Pharmacology of *Casimiroa edulis*; III. Relaxant and contractile effects in rat aortic rings. *J. Ethnopharmacol* 47:1–8.
49. Landaverde NA, Juárez-Flores BI, Jiménez-Capdeville ME, Ortiz-Pérez MD (2009) Anxiolytic and sedative effects of essential oil from *Casimiroa pringlei* on Wistar rats. *J Med Plants Res* 3:791-798.
50. Frolidi G, Bertin R, Secchi E, Zagotto G, Martínez-Vázquez M, García-Argaéz AN (2011) Vasorelaxation by extracts of *Casimiroa spp.* in rat resistance vessels and pharmacological study of cellular mechanisms. *J Ethnopharmacol* 134:637–643.

51. García-Argáez NA, González-Lugo M N, Márquez C, Martínez-Vázquez M (2003) Cumarinas presentes en el género *Casimiroa*. *J Mex Chem Soc* 47:151-154.
52. García-Argáez AN, Gonzalez-Lugo NM, Parra-Delgado H, Martínez-Vázquez M (2004) Pubesamides A, B, and C, Three New N-Benzoyltyamide Derivatives Isolated from *Casimiroa pubescens*. *Z. Naturforsch* 59:245- 248.
53. García-Argáez NA, Toscano AR, Martínez-Vázquez M (2001) 1- β -hydroxyobacunone (Zapoterin). *J Chem Crystallogr* 11:727-730.
54. García-Argáez A N, González-Lugo N M, Parra-Delgado H, Martínez-Vázquez M (2005) Casimiroin, zapoterin, zapotina and 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone from *Casimiroa pubescens*. *Biochem Syst Ecol* 33:441-443.

ANEXO I

Solicitud de patente

DIRECCIÓN
OFICIO No. IQUI 542/12'

Asunto: Archivo patente.

DR. SERGIO M. ALCOCER MARTÍNEZ DE CASTRO
COORDINADOR DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO-UNAM
PRESENTE

Por medio de la presente y de la manera más atenta, solicitamos a Usted el apoyo de la Coordinación de Innovación y Desarrollo, para proceder con el trámite de solicitud de patente de la invención titulada: "*Uso de la 7-metoxi-3-(2-metilbut-3-en 2-il)-2H-chromen-2-ona (2,2-dimetil-3-alil-herniarina)* [REDACTED] como fármacos antidepresivos".

En dicha invención han participado como inventores los siguientes investigadores: Mariano Martínez Vázquez, Rosa Estrada Reyes, Denisse Ubaldo Suárez y Roberto De la Rosa Sierra.

Estamos adjuntando la descripción de la invención, así como las cartas de cesión de derechos de los inventores y copia de las publicaciones relacionadas con dicha invención.

Quedamos a sus órdenes en caso de que requiera cualquier información adicional, aprovechando para enviarle un cordial saludo,

Atentamente,
"*Por mi raza hablará el espíritu*"
Ciudad Universitaria, D.F. a 28 de agosto de 2012.


Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González Bravo
Director

C.c.p Dr. Mtro. Juan Manuel Romero Ortega, Director General Vinculación
Mtra. Laura Almanza Ríos, Responsable, Dirección de Transferencia de Tecnología
Dr. Jesús Valdés Martínez, Secretario de Vinculación, Instituto de Química
C.P. María Guadalupe Morales Ramírez, Secretaria Administrativa Instituto de Química
Dr. Mariano Martínez Vázquez, Investigador Instituto de Química



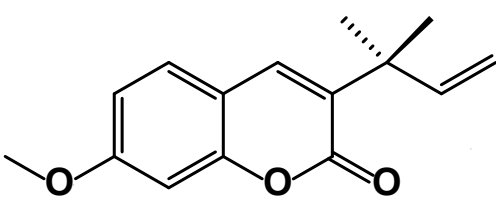
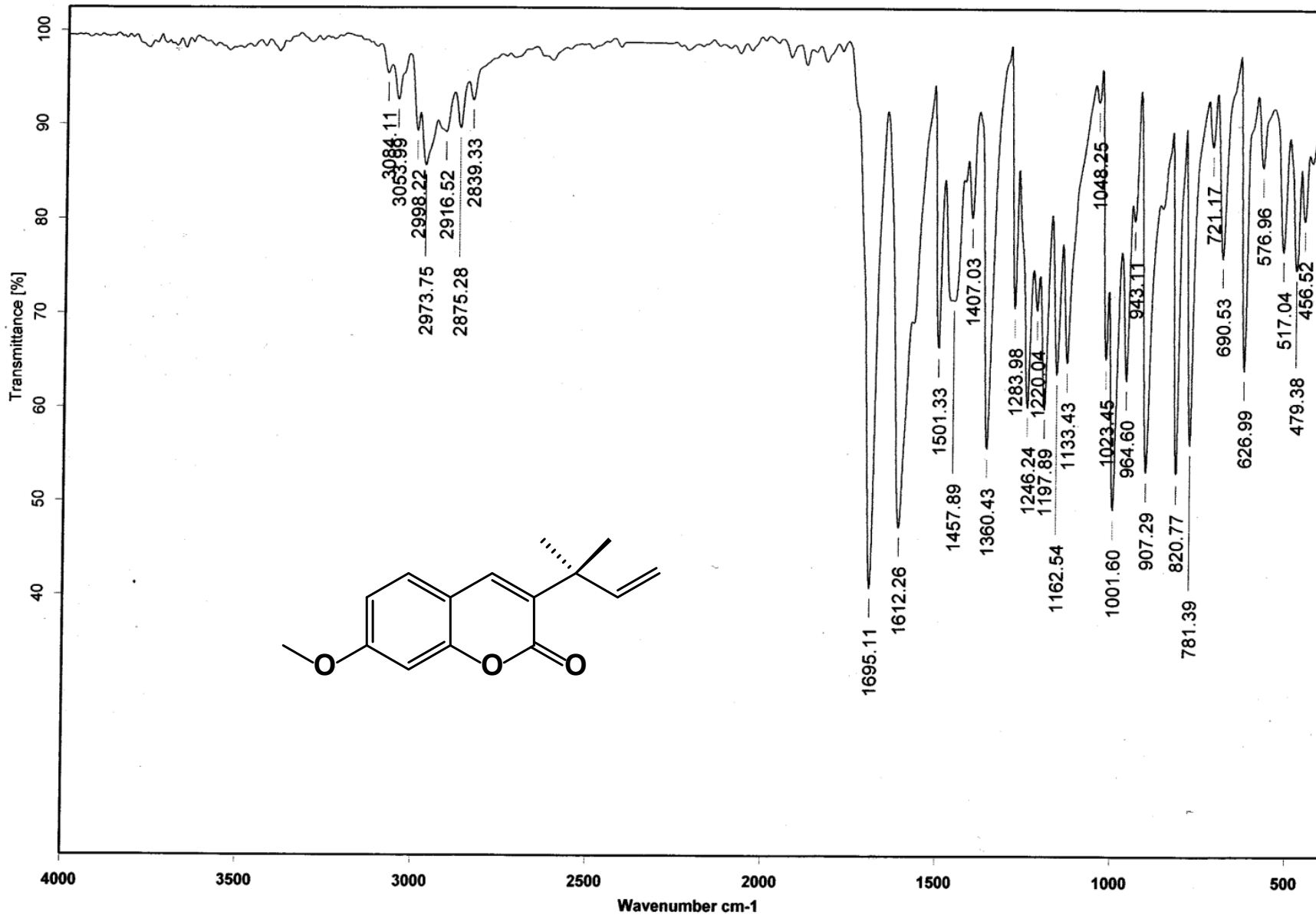
Instituto de Química, UNAM
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria
Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.
Apartado Postal 70-213
Tel.: 5616 2576, fax: 5616 2217

ANEXO II

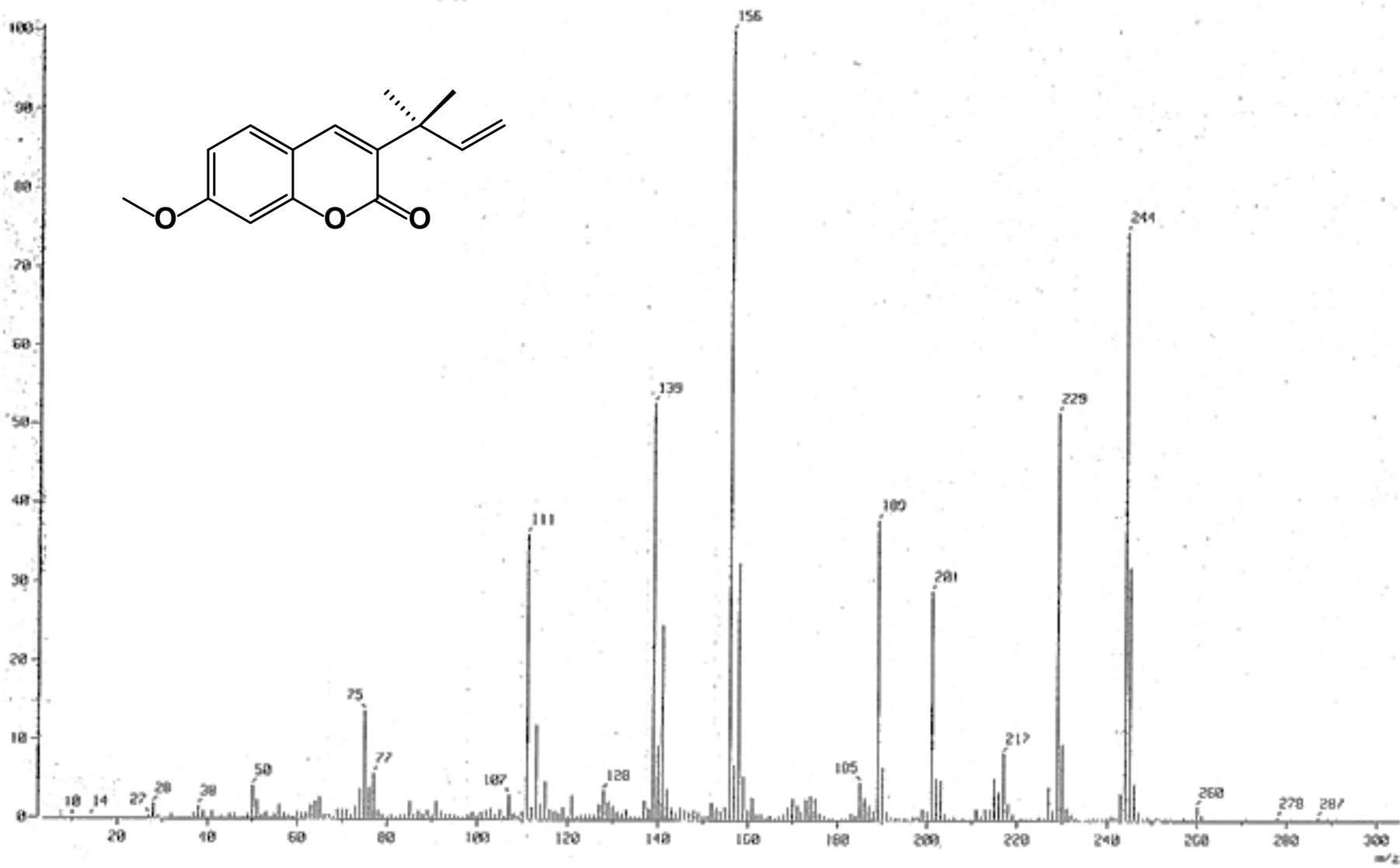
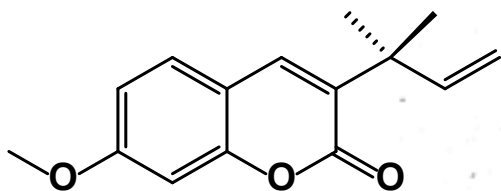
Espectroscopia y espectrometría

(Espectros)

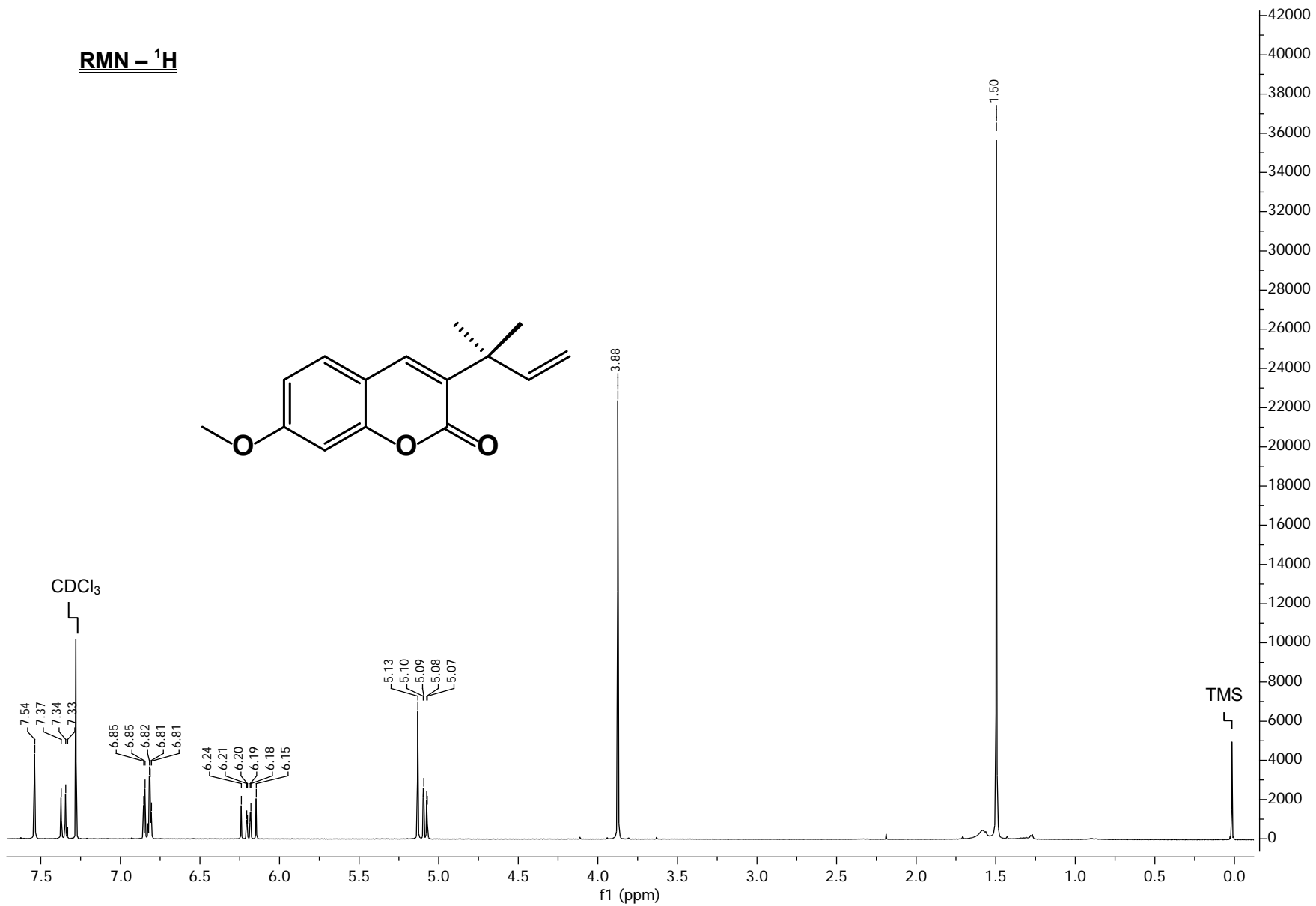
IR



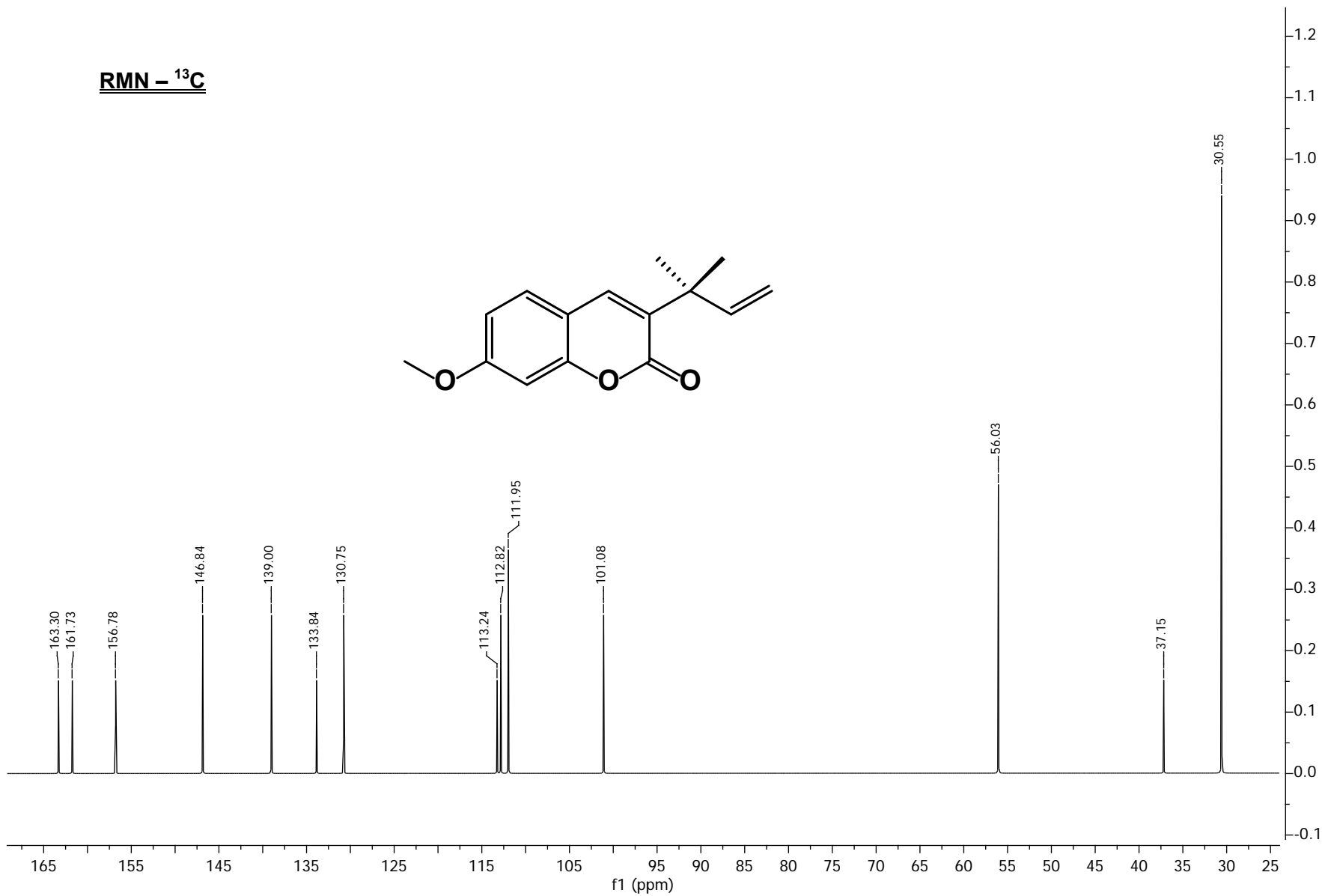
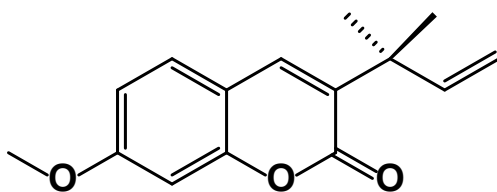
E. Masas



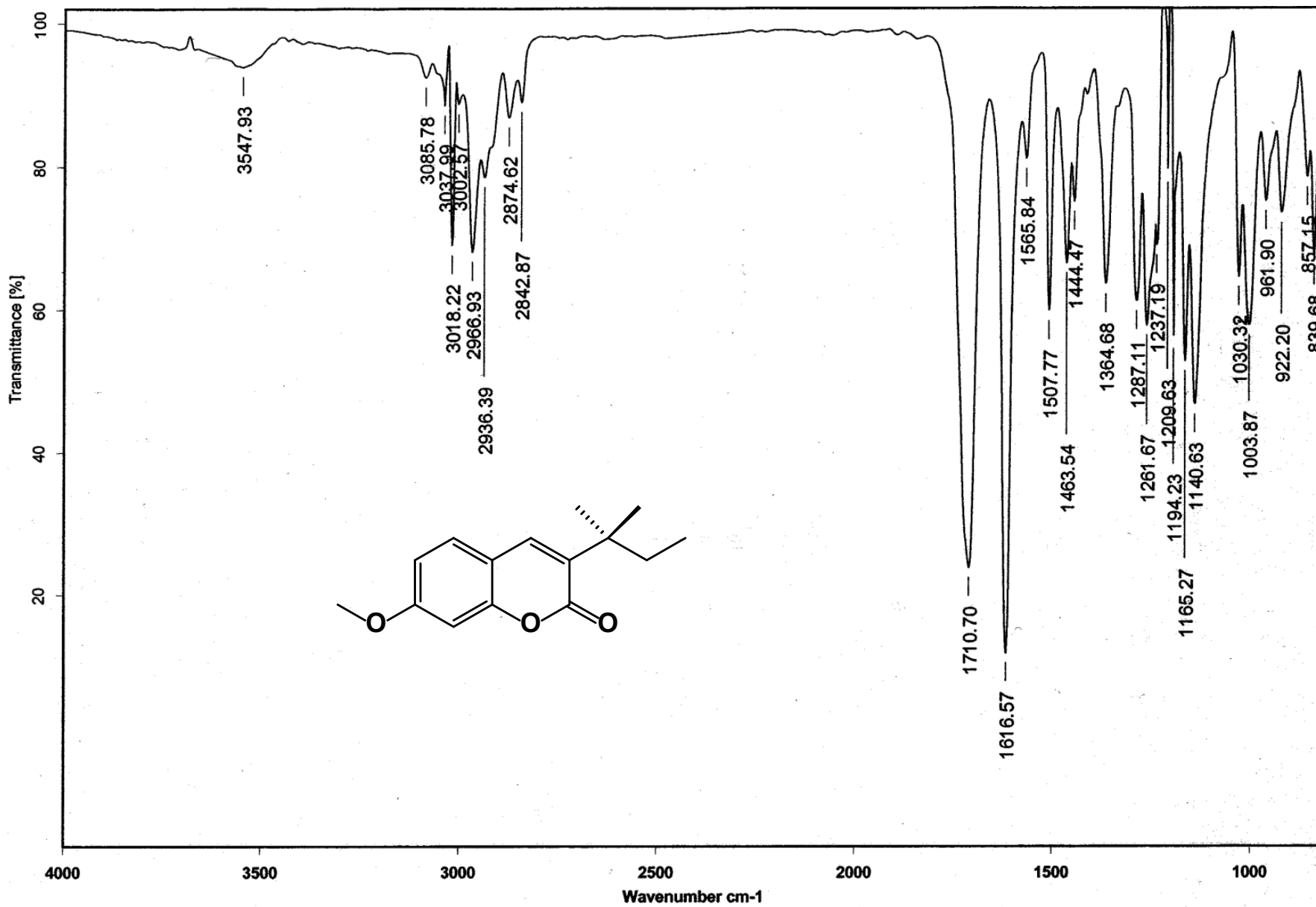
RMN - ¹H



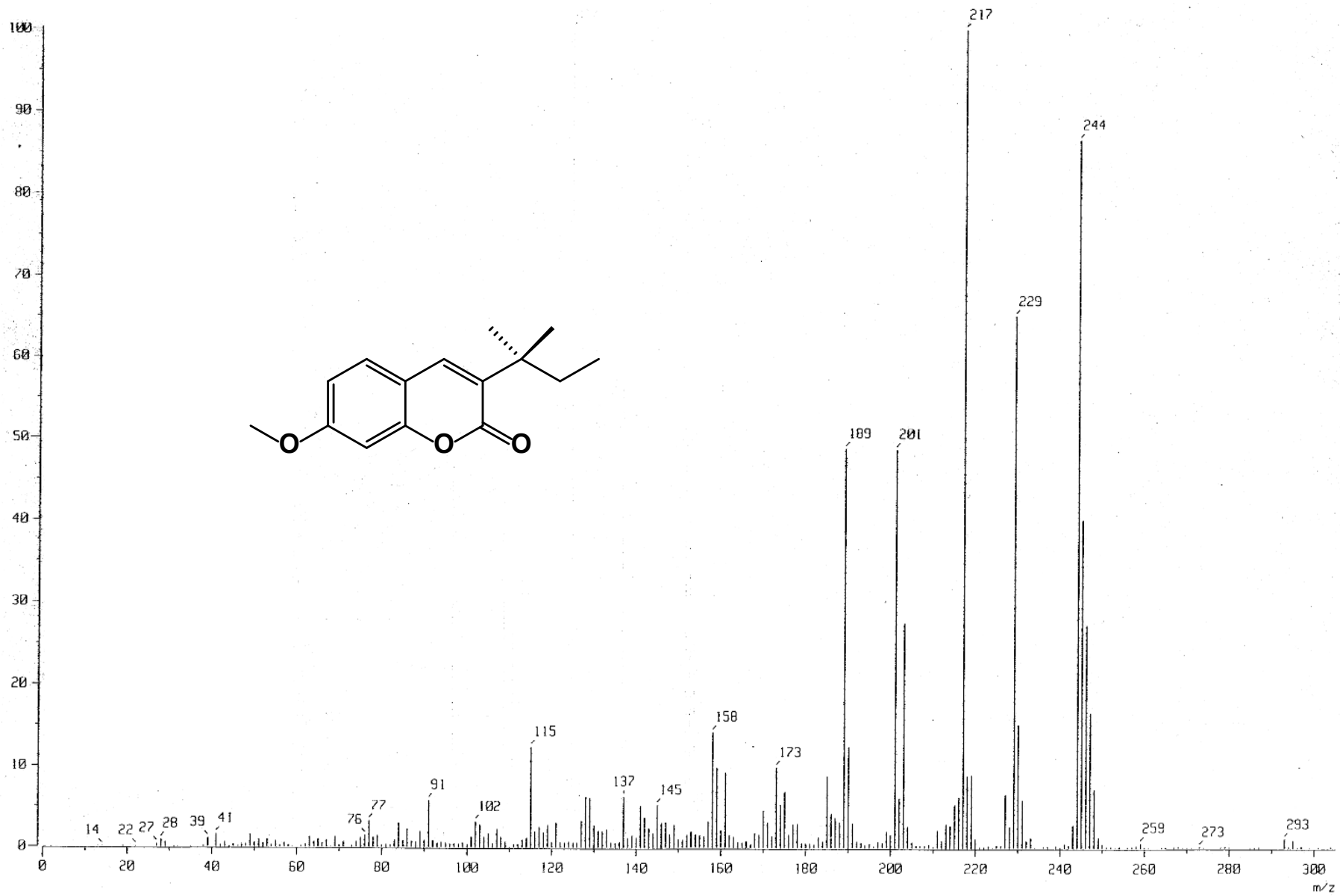
RMN - ¹³C



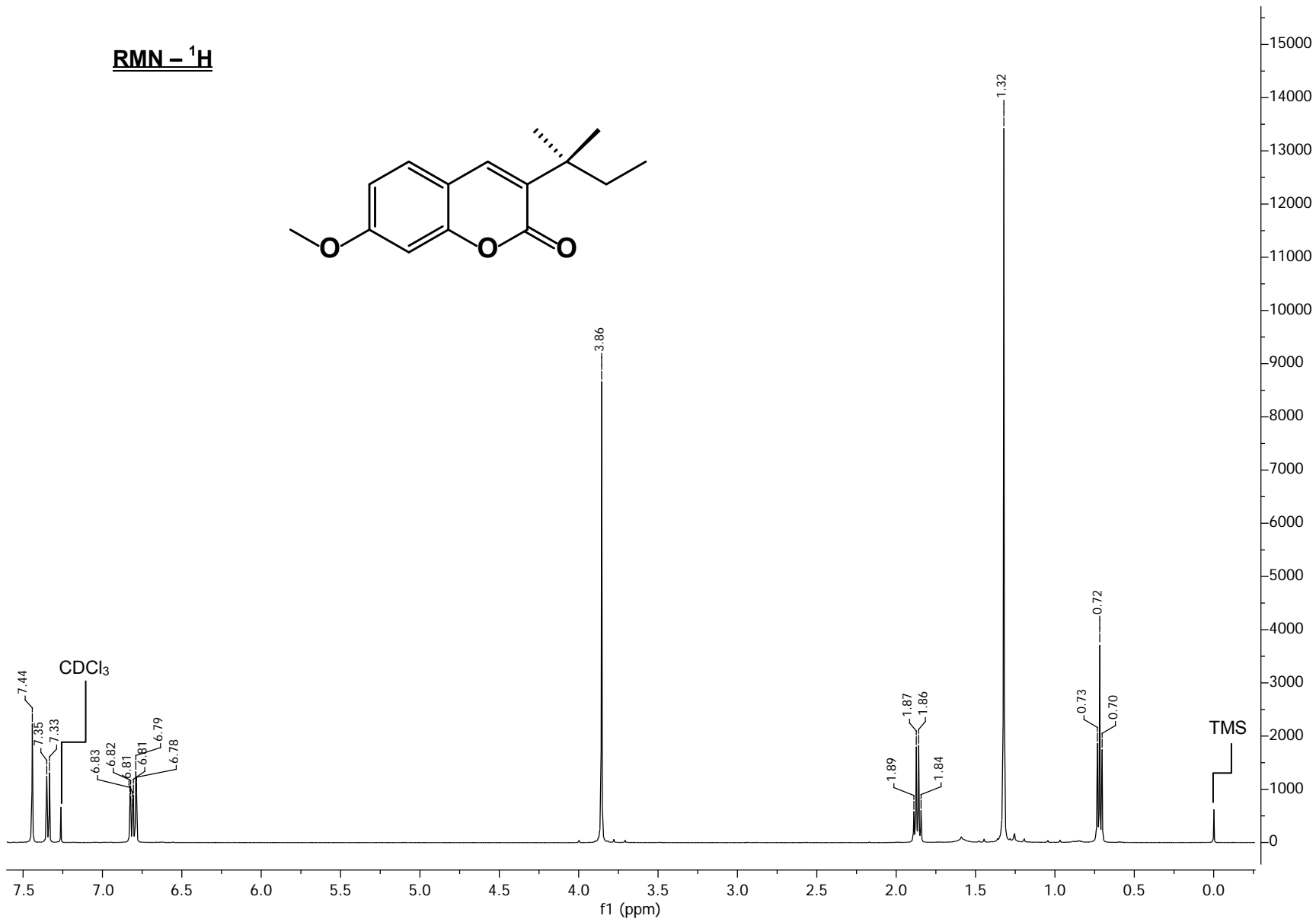
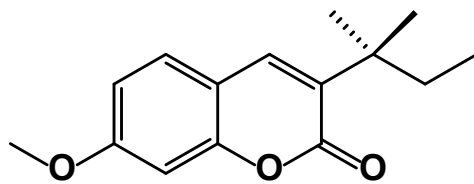
IR



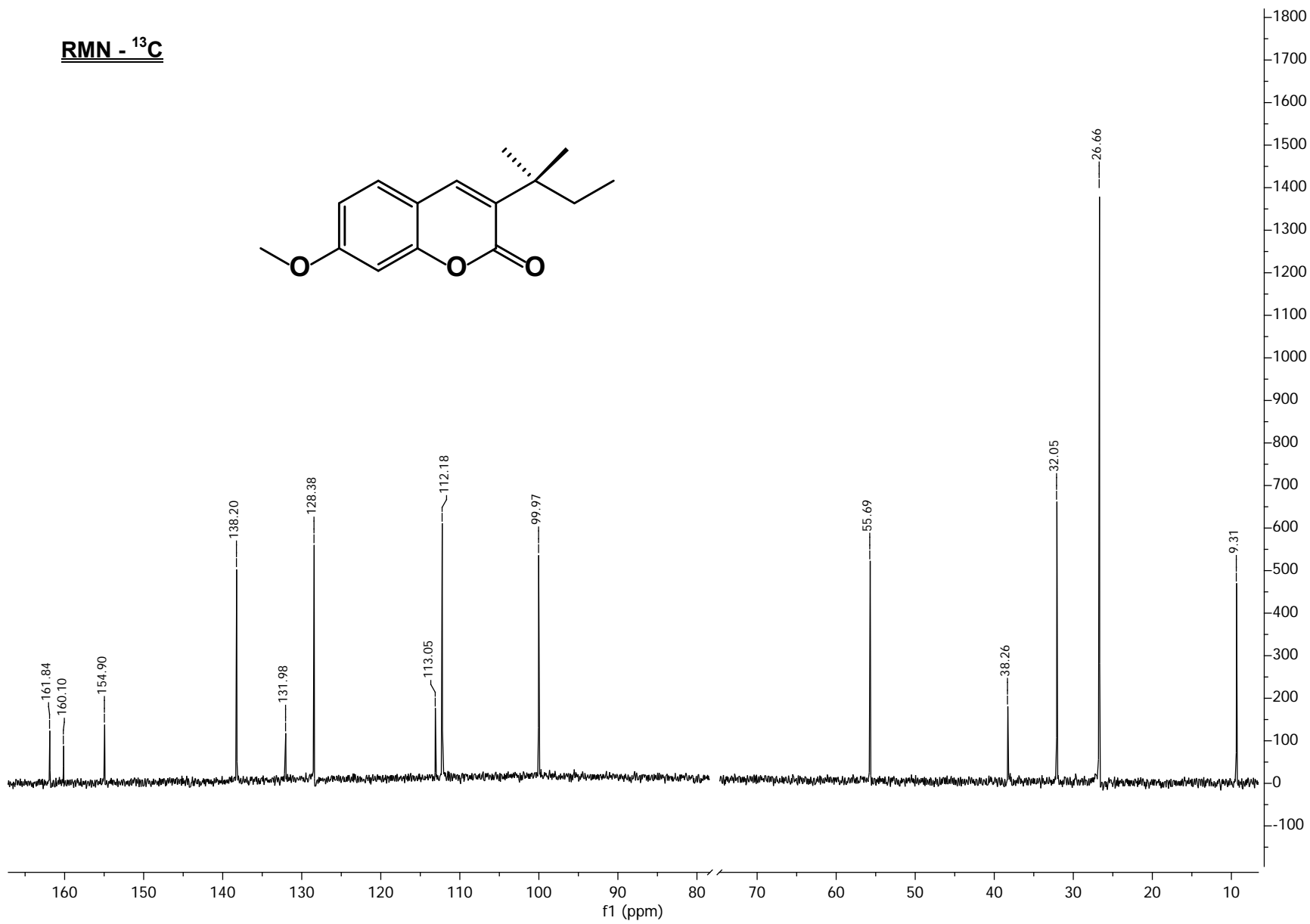
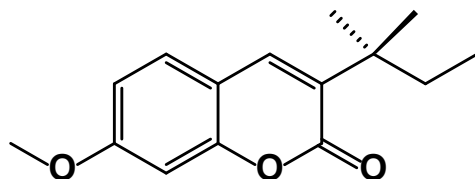
E. Masas



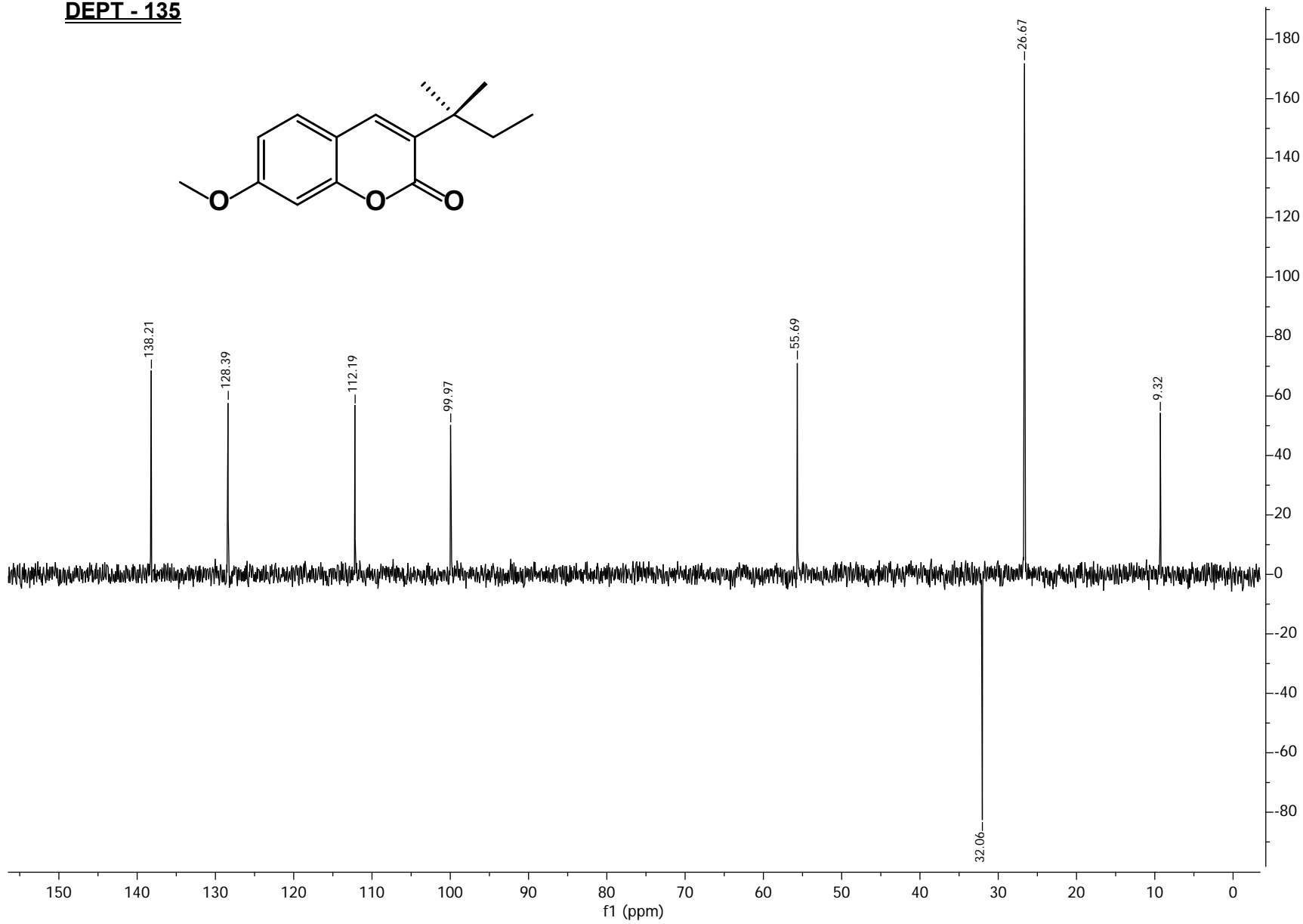
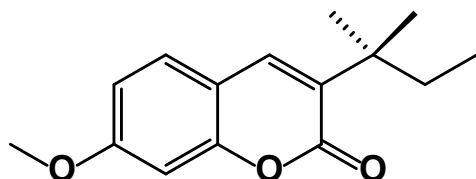
RMN - ¹H



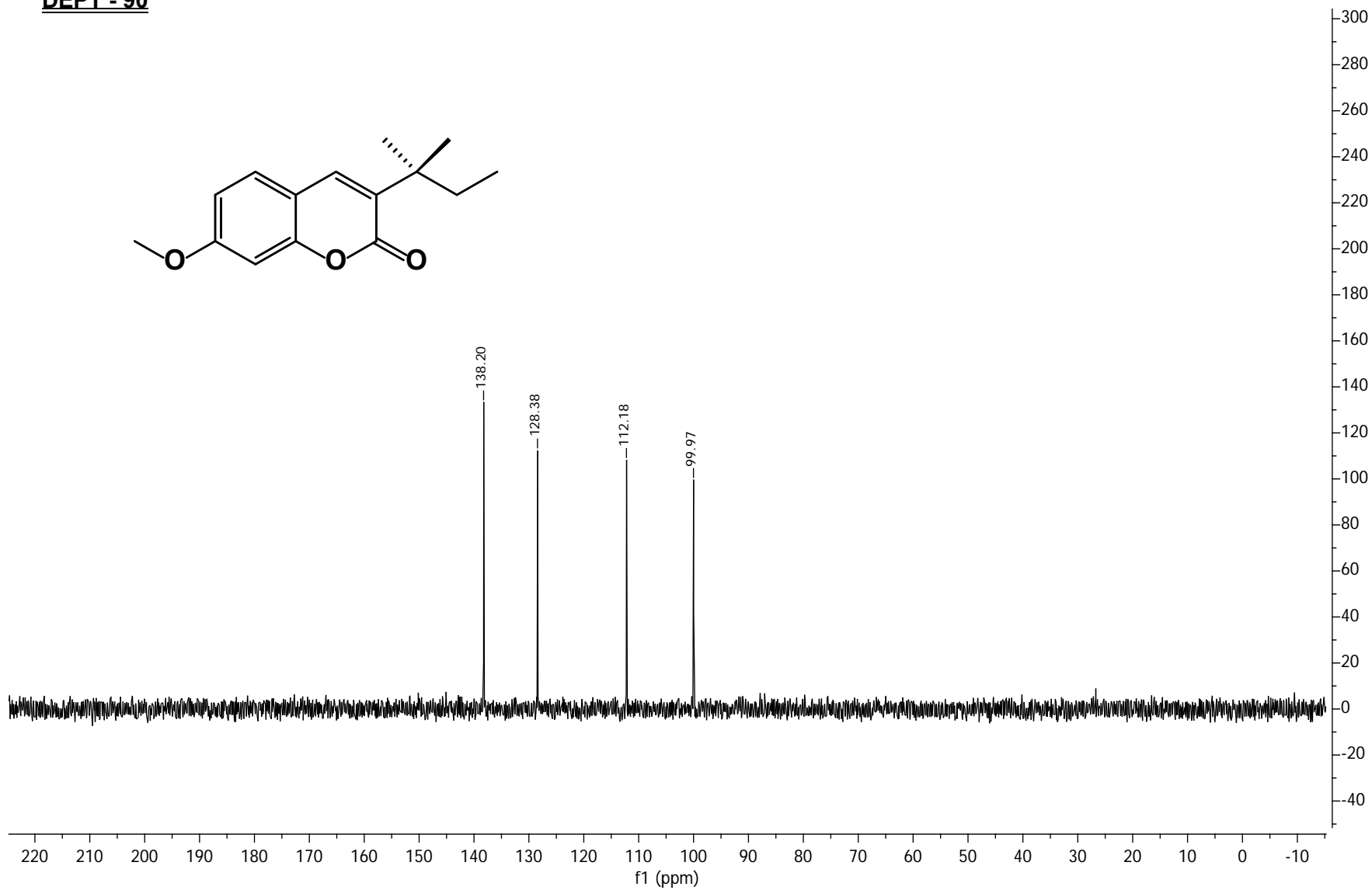
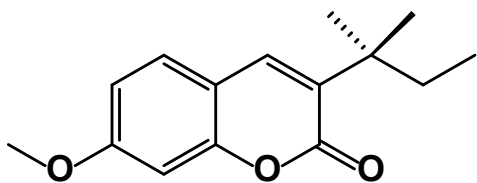
RMN - ¹³C



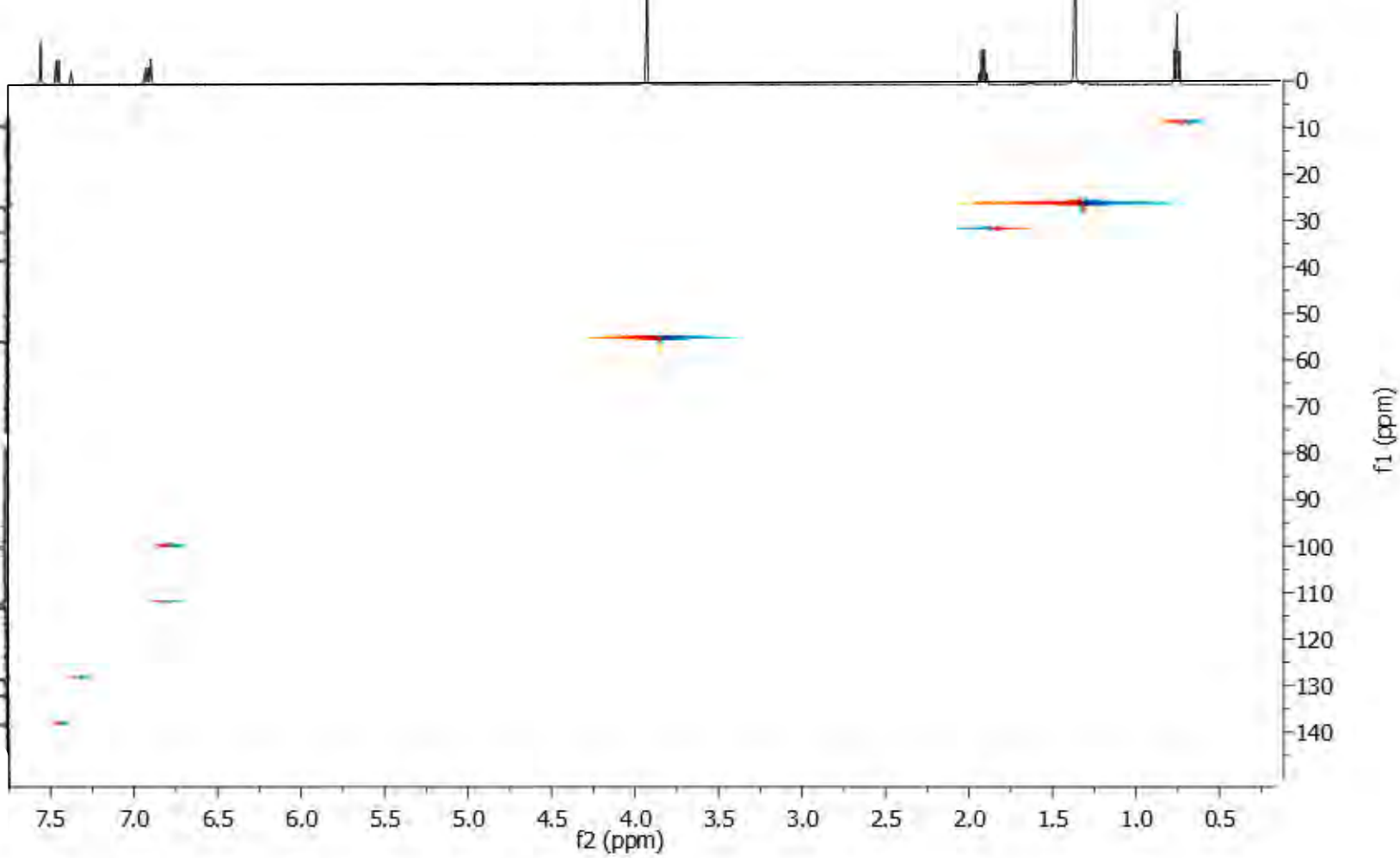
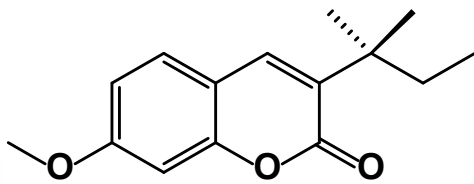
DEPT - 135



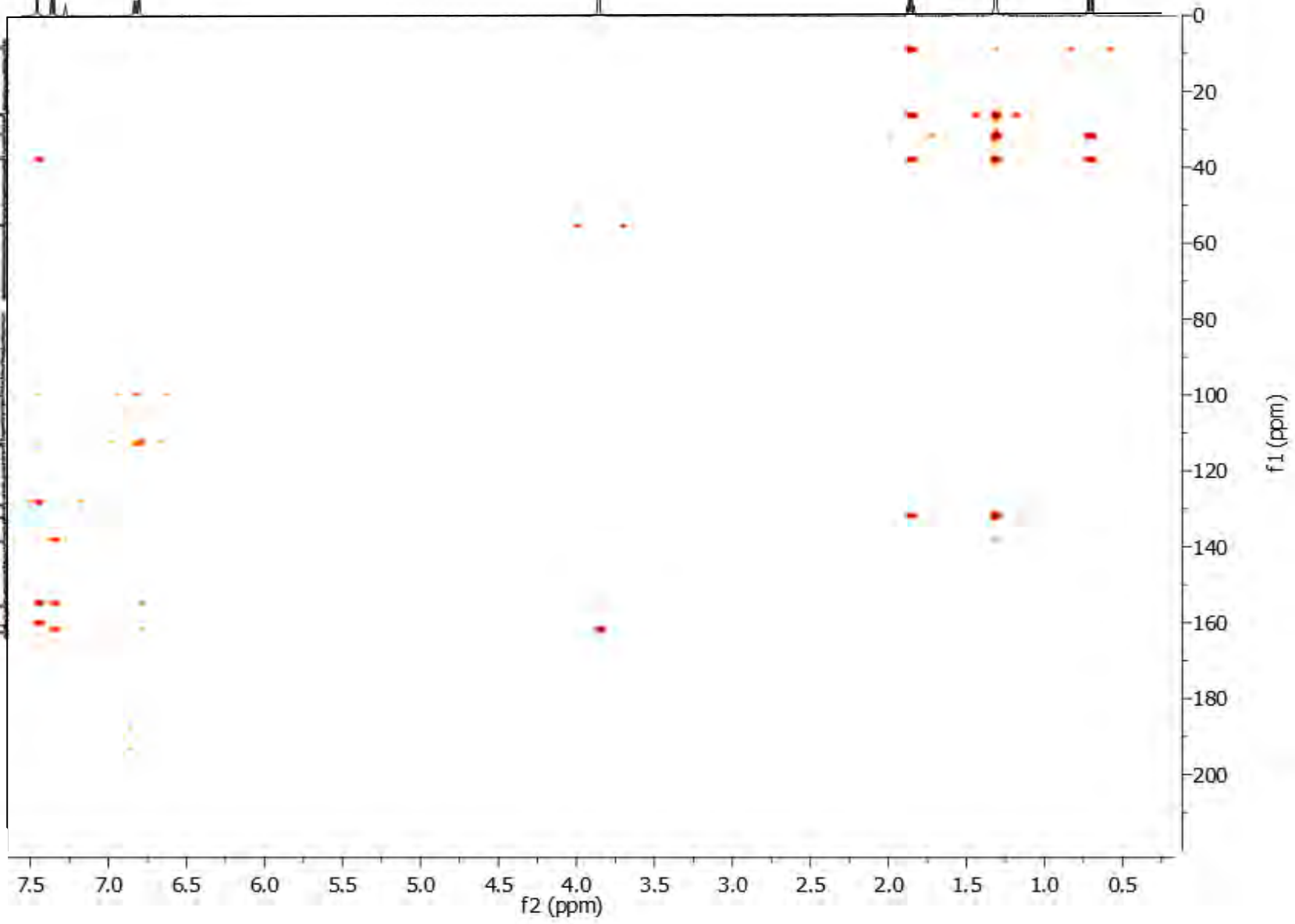
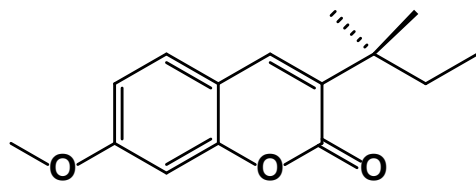
DEPT - 90



HSQC



HMBC



COSY

