



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Mecanismos de acción del efecto ansiolítico y
antidepresivo del aceite esencial de *Litsea glaucescens*
(Kunth) administrado por vía inhalatoria.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

JESSICA KARINA DÍAZ CANTÓN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS

DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTORAL:

DR. RICARDO REYES CHILPA, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS
NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA

DRA. MONICA ADRIANA RAMOS TORRES, INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA "MANUEL VELASCO SUAREZ"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Mecanismos de acción del efecto ansiolítico y
antidepresivo del aceite esencial de *Litsea glaucescens*
(Kunth) administrado por vía inhalatoria.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

JESSICA KARINA DÍAZ CANTÓN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS

DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. RICARDO REYES CHILPA, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS
NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA

DRA. MONICA ADRIANA RAMOS TORRES, INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGIA Y NEUROCIROGIA "MANUEL VELASCO SUAREZ"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD (INDICAR EL NOMBRE)

OFICIO CPCB/470/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de octubre de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de Biología Experimental de la estudiante **DÍAZ CANTÓN JESSICA KARINA** con número de cuenta **311216273** con la tesis titulada "**Mecanismos de acción del efecto ansiolítico y antidepresivo del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (Kunt) administrado por vía inhalatoria**", realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ
Vocal: DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ
Vocal: DR. SOL CRISTIANS NIIZAWA
Vocal: DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS
Secretario: DR. RICARDO REYES CHILPA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 20 de mayo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme los medios para continuar mi formación científica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca número 734916 a través del programa de Becas Nacionales para realizar mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (*PAPIIT DGAPA UNAM*), **AG200321 “Filogenómica, química, farmacología y propagación del laurel mexicano (*Litsea spp.* Lauraceae): un estudio interdisciplinario para su aprovechamiento sustentable”** por los fondos otorgados y por la beca para la obtención de grado.

A mi tutora, Laura Guzmán Gutiérrez, por el tiempo que dedico a esta tesis, sin importar la cantidad de trabajo que tuviera, por su apoyo incondicional durante más de cinco años, por nunca rendirse, aunque los experimentos no nos favorecieran, pero principalmente, agradezco la confianza que ha tenido en mí, la entrega total como académica y como persona. Me siento orgullosa de ser tu primera alumna de posgrado.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por abrirme nuevamente las puertas de su laboratorio, por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por brindarme los recursos económicos y académicos necesarios para la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Mónica Adriana Torres Ramos, por su asesoría en la cuantificación de proteínas mediante la técnica de western blot, por su tiempo, paciencia, conocimientos académicos y por abrirme las puertas de su laboratorio.

DEDICATORIA

Para Arturo Preciado Maldonado,
se fue sabiendo que no había ingresado a la maestría,
ahora, sé que estará orgulloso de este logro en mi vida.

Sé que me sigue bendiciendo antes de salir de casa,
le mando un beso y un abrazo fuerte hasta donde este.

ÍNDICE

ÍNDICE	<i>i</i>
Índice de figuras	<i>iv</i>
Índice de cuadros	<i>vi</i>
Listado de abreviaturas	<i>vii</i>
I. RESUMEN	<i>1</i>
ABSTRACT	<i>4</i>
II. ANTEDECENTES	<i>7</i>
2.1. Trastorno depresivo, situación mundial y actual en México	<i>7</i>
2.2. Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud.	<i>9</i>
2.3. Neurobiología del trastorno depresivo	<i>10</i>
2.4. Neurocircuito de la depresión	<i>11</i>
2.5 Mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos monoaminérgicos	<i>12</i>
2.6 Factor neurotrófico derivado del cerebro	<i>14</i>
2.7 Evidencia preclínica de la participación de BDNF en el desarrollo de la depresión.....	<i>15</i>
2.8 Evidencia clínica de la participación de BDNF en el desarrollo de la depresión.....	<i>17</i>
2.9 Anestésico utilizado como antidepresivo	<i>18</i>
2.10 Alteración del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA)	<i>20</i>
2.11 Evidencia preclínica de la participación del eje HPA en la depresión	<i>21</i>
2.12 Evidencia clínica de la participación del eje HPA en la depresión	<i>22</i>
2.13 Medicina complementaria	<i>23</i>
2.14 Aromaterapia	<i>24</i>
2.15 Evidencia preclínica del uso de aceites esenciales para el tratamiento de la depresión o algunos de sus síntomas.....	<i>25</i>
2.16 Evidencia clínica del uso de aceites esenciales para el tratamiento de la depresión o algunos de sus síntomas.....	<i>26</i>
2.17 Biología y usos populares de <i>Litsea glaucescens</i>	<i>27</i>
2.18 Aceite de <i>Litsea glaucescens</i> como potencial terapia complementaria	<i>28</i>
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	<i>29</i>

IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVOS GENERALES.....	30
5.1 Objetivos particulares.....	30
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
6.1 Análisis químico y actividad biológica del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	31
6.1.1 Sustancias.....	31
6.1.2 Material vegetal y extracción del aceite esencial.....	31
6.1.3 Análisis químico y cuantificación de los compuestos.....	31
6.1.4 Animales de experimentación.....	32
6.1.5 Administración del aceite esencial, linalol y β -pineno por inhalación.....	32
6.1.6 Pruebas conductuales.....	33
6.1.6.1 Cilindro exploratorio.....	33
6.1.6.2 Tablero de orificios.....	33
6.1.6.3 Laberinto de cruz elevado.....	34
6.1.7 Pruebas conductuales para la determinación de la actividad antidepresiva.....	34
6.1.7.1 Campo abierto.....	34
6.1.7.2 Nado forzado.....	34
6.2. Neurofarmacología de la inhalación del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	35
6.2.1 Preparación de muestras de cerebro.....	35
6.2.2 Cuantificación de proteínas.....	35
6.2.3 Identificación de la proteína BDNF involucrada en el trastorno depresivo mediante la técnica de western blot.....	36
6.3 Activación del eje HPA asociado a comportamientos relacionados con el estrés.....	38
6.3.1 Colecta de sangre.....	38
6.3.2 Cuantificación de corticosterona.....	38
6.3.3 Análisis estadístico.....	38
VII. RESULTADOS.....	39
7.1 Análisis químico y actividad biológica del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	39
7.1.1 Análisis químico.....	39
7.1.2 Actividad biológica.....	41
7.2 Neurofarmacología de la inhalación del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	45
7.3 Activación del eje HPA asociado a comportamientos relacionados con el estrés.....	48
VIII. DISCUSIÓN.....	50
8.1 Análisis químico y actividad biológica del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	50
8.1.1 Análisis químico.....	50
8.1.2 Actividad biológica.....	50
8.2 Neurofarmacología de la inhalación del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	54
8.2.1 Proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB).....	57
8.2.2 Estudios preclínicos de CREB en el desarrollo de la depresión.....	59

8.2.3 Estudios clínicos de la participación de CREB en el desarrollo de la depresión _____	59
8.2.4 Plantas medicinales con actividad antidepresiva que regulan CREB _____	60
8.3 Activación del eje HPA asociado a comportamientos relacionados con el estrés.....	60
<i>IX. CONCLUSIONES</i>	63
9.1 Conclusión general	64
<i>X. PERSPECTIVAS</i>	65
<i>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	66

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Estimaciones de la prevalencia mundial y regional del trastorno depresivo.	8
Figura 2. Nuevo enfoque sobre el mecanismo molecular de la depresión.	11
Figura 3. Mecanismo de acción de fármacos antidepresivos monoaminérgicos.	13
Figura 4. La proteína BDNF induce mecanismos de señalización relacionados con la supervivencia.	15
Figura 5. Mecanismo de acción propuesto del efecto antidepresivo de la ketamina.	19
Figura 6. Mecanismo de retroalimentación negativa de glucocorticoides en el eje hipotalámico pituitario adrenal.	21
Figura 7. Administración del aceite esencial por vía inhalatoria.	33
Figura 8. Trasferencia húmeda de proteínas.	36
Figura 9. Efecto ansiolítico del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> (AE) en ratones sometidos a la prueba de cruz elevada.	41
Figura 10. Efecto del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> (AE) en ratones sometidos a la prueba de campo abierto.	42
Figura 11. Efecto del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> (AE) en ratones sometidos a la prueba de cilindro exploratorio.	42
Figura 12. Efecto del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> (AE) en ratones sometidos a la prueba de tablero de orificios.	43
Figura 13. Efecto del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> (AE) en ratones sometidos a la prueba de nado forzado.	44
Figura 14. Efecto del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> en ratones sometidos a la prueba de campo abierto.	45

Figura 15.	Western blot representativo del factor neurotrófico derivado del cerebro.	46
Figura 16.	Variación de la expresión de la proteína BDNF en corteza prefrontal.	47
Figura 17.	Variación de la expresión de la proteína BDNF en hipocampo.	47
Figura 18.	Elevación de los niveles de corticosterona en plasma sanguíneo de ratones sometidos a la prueba de nado forzado.	48
Figura 19.	Elevación de los niveles de corticosterona en plasma sanguíneo de ratones sometidos a la prueba de nado forzado.	49
Figura 20.	Estructura primaria de CREB.	58
Figura 21.	Unión de CREB a la secuencia de DNA (CRE) que promueve la transcripción de genes implicados en la plasticidad sináptica.	58
Figura 22.	Hipótesis de la cascada de señalización que desencadena la inhalación del aceite esencial en roedores.	64

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación Estadística Internacional de trastornos del humor.	9
Cuadro 2. Composición del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> por análisis de CG/EM.	39
Cuadro 3. Modificación de la composición del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> en función del tiempo.	40

Listado de abreviaturas

SAI	Abreviatura de las palabras latinas <i>sine alter indicatio</i> , que significan “sin otra indicación”, lo cual implica “no especificado” o “no calificado”.
COVID-19	Enfermedad respiratoria causada por el virus SARS-CoV-2.
BDNF	Proteína que en los humanos está codificada por el gen BDNF.
CREB	Factor de transcripción con la capacidad de unirse al ADN.
pCREB	Proteína CREB fosforilada en el sitio Ser 133.
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico.
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal.
GR	Receptor de glucocorticoides.
MR	Receptor mineralocorticoide.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.
IRSN	Inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina.
IMAO	Inhibidores de la monoamino oxidasa.
ATC´s	Antidepresivos tricíclicos.
5-HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina.
TDM	Trastorno depresivo mayor.

SERT	Transportador de serotonina.
NET	Transportador de noradrenalina.
NE	Noradrenalina.
NA	Norepinefrina.
DA	Dopamina.
TRD	Depresión resistente al tratamiento.
TrkB	Receptor quinasa B de la tropomiosina.
MAPK	Familia de serina/treonina quinasas activadas por factores de crecimiento y estrés.
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasas.
PLC- γ	Isoenzima fosfoinosítido fosfolipasa C gamma.
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero.
CUMS	Estrés leve impredecible crónico.
NMDA	Receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato.
FDA	Administración de medicamentos y alimentos.
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.
SNC	Sistema nervioso central.
CAM	Medicina complementaria y alternativa.
CD1	Ratones genéticamente heterogéneos con baja homocigosis e isogenicidad. Representan la variabilidad genética de una población típica.

PFC	Corteza prefrontal.
HIP	Hipocampo.
EEM	Desviación estándar poblacional dividida por la raíz cuadrada del número de observaciones. Error estándar de la media.
AE	Aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i> .
mg	Miligramo.
Kg	Kilogramo.
CUS	Estrés crónico impredecible.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.

I. RESUMEN

La depresión es un trastorno mental muy común, que se asocia con síntomas emocionales, cognitivos y físicos. Se estima que a nivel mundial afecta a más de 350 millones de personas, sin embargo, esta cifra está en aumento debido a la pandemia por COVID-19. Una alternativa a los fármacos antidepresivos disponibles en la clínica es la aromaterapia, que involucra el uso terapéutico de aceites esenciales. Por ejemplo, el aceite esencial más utilizado para tratar la depresión y la ansiedad es el de lavanda (*Lavandula angustifolia* (Miller) *syn* y *Lavandula officinalis* (Chaix)). Previamente hemos demostrado la actividad antidepresiva del aceite esencial de hojas de *Litsea glaucescens* (Kunth) -Lauraceae- en un modelo conductual en ratones por vía intraperitoneal. Esta especie es conocida como “laurel mexicano” y ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar la tristeza y el nerviosismo. El presente trabajo trata del estudio del efecto antidepresivo y ansiolítico de este aceite esencial administrado por inhalación, así como su mecanismo de acción.

En la práctica clínica, los fármacos antidepresivos que solo regulan la neurotransmisión de monoaminas son poco efectivos. El estudio de las vías de neurotransmisión implicadas en el proceso de depresión es fundamental para desarrollar nuevos fármacos para su tratamiento. Al respecto, se ha propuesto la interacción entre diversas vías fisiopatológicas que involucran la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica, factores neurotróficos, ejes endocrinos, neuroesteroides y neuropéptidos, entre otros. Los objetivos de este estudio fueron determinar si el aceite esencial de *L. glaucescens* puede ejercer su efecto antidepresivo modificando los niveles de la proteína BDNF y/o si se altera el eje hipotálamo-pituitario-adrenal elevando los niveles de corticosterona en plasma.

Métodos. El aceite esencial se obtuvo de las hojas de *Litsea glaucescens* y su composición se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Asimismo, la cuantificación de sus dos componentes activos, identificados hasta ahora, linalol y β -pineno, se realizó mediante curvas de calibración estándar.

Ratones CD1 se usaron para los ensayos biológicos. Para evaluar la actividad antidepresiva se utilizaron las pruebas conductuales de natación forzada y campo abierto. Para determinar la actividad ansiolítica se realizaron los modelos de laberinto elevado en cruz, cilindro de exploración y tablero de orificios. En cuanto a la identificación y cuantificación de las proteínas BDNF, se realizó mediante la técnica de western blot. Finalmente, para determinar la cantidad de corticosterona en las muestras de plasma de ratones, se obtuvo el kit de inmunoensayo enzimático de corticosterona Arbor Assays DetectX®.

Resultados. El análisis CG/EM identificó 31 compuestos presentes en el aceite esencial. El principal compuesto fue el eucaliptol (31,06%) y los compuestos activos identificados hasta el momento, se detectaron β -pineno (9,05%) y linalol (2,39%). El aceite esencial de *L. glaucescens* inhalado mostró actividad antidepresiva, ya que disminuyó el tiempo de inmovilidad de los ratones sometidos a la prueba de nado forzado, en comparación con el grupo control. Mientras que no modificó la actividad motora general de los roedores en la prueba de campo abierto. En la prueba cruzada elevada, los ratones a los que se les administró el aceite esencial aumentaron significativamente el tiempo que pasaron con los brazos abiertos, en comparación con el control, lo que indica un efecto ansiolítico. Asimismo, se demostró que el aceite de laurel no tiene efecto sedante, ya que en las pruebas de cilindro exploratorio y tablero de agujeros no modificó el número de crianzas ni el número de exploraciones, respectivamente.

También se encontró que el aceite esencial de laurel ejerce un efecto positivo sobre la expresión de BDNF en la corteza prefrontal (50%) y el hipocampo (40%). Estos resultados sugieren que el efecto positivo sobre la expresión de esta proteína es parte de los mecanismos moleculares de su efecto antidepresivo. Por el contrario, la inhalación del aceite esencial no disminuye los niveles de corticosterona en el plasma sanguíneo de roedores, lo que indica que los compuestos presentes en el aceite no influyen en la expresión y/o función de los receptores de glucocorticoides y/o mineralocorticoides, por lo que la actividad del

HPA eje aumentado por el estrés inducido por la prueba de nado forzado no disminuye.

Los resultados de este trabajo proporcionan evidencias de los efectos antidepresivo y ansiolítico, inducidos por el aceite esencial de *Litsea glaucescens* inhalado en roedores. Además, también se determinó que la neurotrofina BDNF participa en el mecanismo de acción de su efecto antidepresivo, pero no así el eje HPA.

ABSTRACT

Depression is a very common mental disorder, which is associated with emotional, cognitive, and physical symptoms. It is estimated that this illness affects more than 350 million people worldwide, however, this quantity is increasing due to the COVID-19 pandemic. An alternative to the antidepressant drugs treatments available in the clinic is aromatherapy, which involves the therapeutic use of essential oils. For example, the most used essential oil to treat depression and anxiety is lavender (*Lavandula angustifolia* (Miller) syn and *Lavandula officinalis* (Chaix). We have previously demonstrated the antidepressant activity of *Litsea glaucescens* (Kunth) -Lauraceae- leaves' essential oil in a behavioral model in mice by intraperitoneal route. This species is known as "Mexican bay" (Laurel mexicano) and has been used in traditional Mexican medicine to treat sadness and nervousness. The present work deals with the study of the antidepressant and anxiolytic effect of this essential oil administered by inhalation, as well as its mechanism of action.

In clinical practice, the antidepressant drugs that only regulate monoamine neurotransmission are poorly effective. The study of neurotransmission pathways involved in depression process is essential to develop new drugs for its treatment. Regarding this, the interaction between various pathophysiological pathways involving glutamatergic and GABAergic neurotransmission, neurotrophic factors, endocrine axes, neurosteroids and neuropeptides, among others, has been proposed. The objectives of this study were to determine if the essential oil of *L. glaucescens* can exert its antidepressant effect modifying the levels of the BDNF protein and/or if the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered, and the levels of corticosterone in plasma.

Methods. The essential oil was obtained from the leaves of *Litsea glaucescens* and its composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Also, the quantification of its two active components, identified until now, linalool and β -pinene, was carried out by standard calibration curves.

CD1 mice were for the biological used for biological assays. To evaluate the antidepressant activity the forced swimming and open field behavioral tests were used. To determine the anxiolytic activity, the elevated plus maze, exploration cylinder and hole board models were performed. Regarding with the identification and quantification of BDNF proteins, it was carried out using the western blot technique. Finally, to determine the amount of corticosterone in the plasma mice samples, the Arbor Assays DetectX® corticosterone enzyme immunoassay kit was obtained.

Results. The GC/MS analysis identified 31 compounds present in the essential oil. The main compound was eucalyptol (31.06%) and the active compounds identified so far, β -pinene (9.05%) and linalool (2.39%) were detected. The inhaled *L. glaucescens* essential oil showed antidepressant like activity, since it decreased the immobility time of mice subjected to the forced swim test, compared to the control group. Whereas it did not modify the general motor activity of the rodents in the open field test. In the elevated cross test, the mice administered with the essential oil significantly increased their time spent in the open arms, as compared to the control, indicating an anxiolytic effect. Likewise, it was shown that laurel oil does not have a sedative effect, since in the exploratory cylinder and hole board tests it did not modify the number of rearings nor the number of explorations, respectively.

The Bay essential oil was also found to exert a positive effect on BDNF expression in the prefrontal cortex (50%) and hippocampus (40%). These results suggest that the positive effect on the expression of this protein is part of the molecular mechanisms of its antidepressant effect. In contrast, inhalation of the essential oil does not decrease corticosterone levels in rodent blood plasma, indicating that the compounds present in the oil do not influence the expression and/or function of glucocorticoid and/or mineralocorticoid receptors, so the activity of the HPA axis increased by the stress induced by the forced swim test is not diminished.

The results of this work provide evidence of the antidepressant and anxiolytic effects induced by the essential oil of *Litsea glaucescens* inhaled in rodents. In addition, it was also determined that the BDNF neurotrophin participates in the mechanism of action of its antidepressant effect, but not the HPA axis.

II. ANTEDECENTES

2.1. Trastorno depresivo, situación mundial y actual en México

La depresión, es un trastorno mental muy común que se asocia con una amplia gama de síntomas emocionales, cognitivos y físicos. De manera general se caracteriza por un estado de ánimo deprimido, pérdida de interés y de la capacidad de disfrutar (anhedonia), y reducción de la energía que produce una disminución de la actividad. Muchas personas con depresión también padecen síntomas de ansiedad, alteraciones del sueño y del apetito, sentimientos de culpa, baja autoestima, dificultades de concentración entre otros. Este trastorno, involucra todas las funciones corporales principales, el estado de ánimo y los pensamientos (Blackburn, 2019), que pueden conducir a impedimentos sustanciales en la capacidad de un individuo para ocuparse de sus responsabilidades cotidianas. La depresión causa un problema de salud serio, especialmente cuando es de larga duración e intensidad de moderada a grave, y puede causar gran sufrimiento e incluso llevar al suicidio (OMS, 2020).

En la actualidad, la depresión se considera la principal causa mundial de discapacidad humana superando en número a las enfermedades cardiovasculares, y al cáncer (OMS, 2020). Este trastorno, afecta a más de 350 millones de personas, donde casi la mitad de estas viven en las regiones de Asia Sudoriental (85.67 millones) y del Pacífico Occidental (66.21 millones). La prevalencia mundial por región (número de personas con depresión/ población total) de trastornos mentales, incluidos los trastornos depresivos muestran que los trastornos depresivos varían según la región y el género de los individuos, por ejemplo, hay una prevalencia de depresión del 5.9% en las mujeres de África y de las Américas (OMS, 2017) (figura 1).

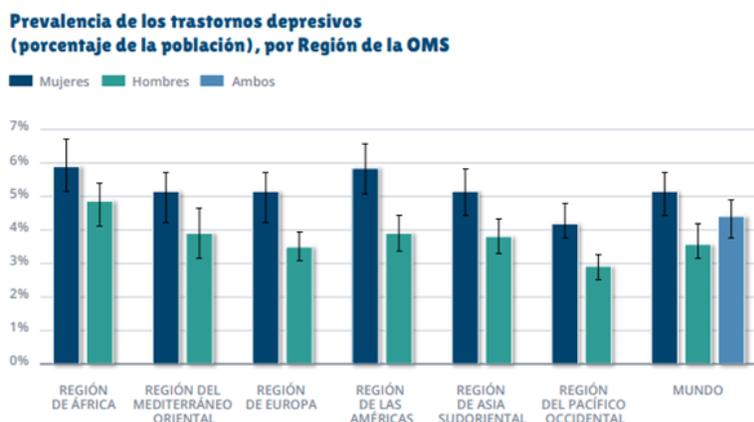


Figura 1. Estimaciones de la prevalencia mundial y regional del trastorno depresivo (Tomado de OMS, 2017).

La prevalencia mundial de depresión y de otros trastornos mentales está en aumento. Por lo que, para enfrentar este problema se están haciendo esfuerzos a nivel mundial como el plan de acción integral de salud mental, dirigido por la Asamblea Mundial de la Salud (2013-2020). Este plan tiene como objetivo promover la salud mental, prevenir trastornos mentales, dispensar atención, mejorar la recuperación, promover los derechos humanos y reducir la mortalidad, morbilidad y discapacidad de personas con trastornos mentales. Además, hay cuatro objetivos principales: 1) reforzar el liderazgo y la gobernanza en el ámbito de la salud, 2) proporcionar asistencia social y de salud mental completos, integrados y con capacidad de respuesta, 3) poner en práctica estrategias de promoción y prevención y 4) fortalecer los sistemas de información, los datos científicos y las investigaciones sobre la salud mental (OMS, 2013; OMS, 2018).

La salud mental en México es reconocida como uno de los principales problemas no resueltos dentro de la agenda de políticas de salud del gobierno. Esta indica que, además de la relevancia médica del tema, los costos individuales y sociales asociados con la discapacidad mental, deben considerarse al priorizar las políticas en la agenda del sector de la salud (González y Álvarez, 2017). En 2002, se realizó una Encuesta Nacional Mexicana de comorbilidad (WMH-CIDI), desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para evaluar el perfil epidemiológico de los trastornos mentales en México (Medina-Mora *et al.*, 2005). La encuesta encontró que 1 de cada 8 ciudadanos mexicanos sufría un trastorno

depresivo, y aproximadamente la mitad de esa población había sufrido un episodio depresivo en el último año. Sin embargo, es posible que más personas sufran de depresión en México, ya que los estudios generalmente no toman en cuenta las comunidades indígenas. Además, existen múltiples factores, como el estigma contra los trastornos mentales y las diferencias culturales, que pueden crear sesgos significativos en los informes y conducir a subestimaciones de la prevalencia de los trastornos depresivos. Por ejemplo, Weller y colaboradores en el 2008, reportaron que muchas comunidades mexicanas llaman a estos trastornos "nervios" (nerviosismo) o "susto", en lugar de usar sus nombres médicos, lo que aumenta el subregistro.

2.2. Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud.

La Clasificación Internacional de Enfermedades, es una herramienta de diagnóstico estándar para epidemiología, gestión de la salud y fines clínicos. Se utiliza para monitorear la incidencia y prevalencia de enfermedades y otros problemas de salud, proporcionando una imagen de la situación general de salud de los países y las poblaciones (CIE-11, 2018).

Cuadro 1. Clasificación Estadística Internacional de trastornos del humor.

Trastornos del humor (afectivos)		
F 32	Episodio depresivo	El paciente sufre, decaimiento del ánimo, baja autoestima, reducción en la actividad, pérdida de peso, pérdida de libido, perturbación del sueño, pérdida de concentración, disminución del apetito, frecuente cansancio, anhedonia, entre otros.
F 32.0	Episodio depresivo leve	Presentes dos o tres síntomas de F32. <u>Apto para continuar con sus actividades diarias.</u>
F 32.1	Episodio depresivo moderado	Presentes cuatro o más síntomas de F32. <u>Dificultades para continuar con sus actividades diarias.</u>

Cuadro 1. Continuación

Trastornos del humor (afectivos)		
F 32.2	Episodio depresivo grave sin síntomas psicóticos	Varios síntomas característicos son marcados y angustiantes. <u>Frecuentes ideas de suicidio y síntomas somáticos muy presentes.</u>
F 32.3	Episodio depresivo grave con síntomas psicóticos	Síntomas iguales a F32.2, pero con alucinaciones, delirios y retraso psicomotor. <u>Genera riesgos para la vida del paciente, por suicidio, deshidratación o inanición.</u>
F 32.4	Otros episodios depresivos	Depresión atípica Episodios únicos de depresión "enmascarada" SAI
F 32.5	Episodio depresivo no especificado	Depresión SAI Trastorno depresivo SAI

Revisado y modificado de CIE-11,2018.

2.3. Neurobiología del trastorno depresivo

La depresión es una enfermedad crónica, cuyas bases neurológicas y fisiopatológicas son poco conocidas. Actualmente, los tratamientos utilizados para esta enfermedad se centran en la interrupción de la neurotransmisión serotoninérgica, noradrenérgica y dopaminérgica en el cerebro, mejor conocida como la hipótesis monoaminérgica (Chávez-Castillo *et al.*, 2019). Sin embargo, esta hipótesis ha sido considerada por los expertos como demasiado simplista, ya que no hay evidencia clara de que la deficiencia de monoaminas sea la única responsable de la depresión (Hinz *et al.*, 2012; Lang y Borgwardt, 2013; Liu *et al.*, 2017).

En la actualidad, los avances en psiquiatría molecular han replanteado la desregulación neuronal de las monoaminas, como una interacción compleja entre las vías fisiopatológicas que involucran neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica, factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro, varios ejes endócrinos, así como varios neuroesteroides, neuropéptidos, opioides, endocannabinoides y endovanilloides (Caraci *et al.*, 2017; Chávez-Castillo *et al.*, 2019).

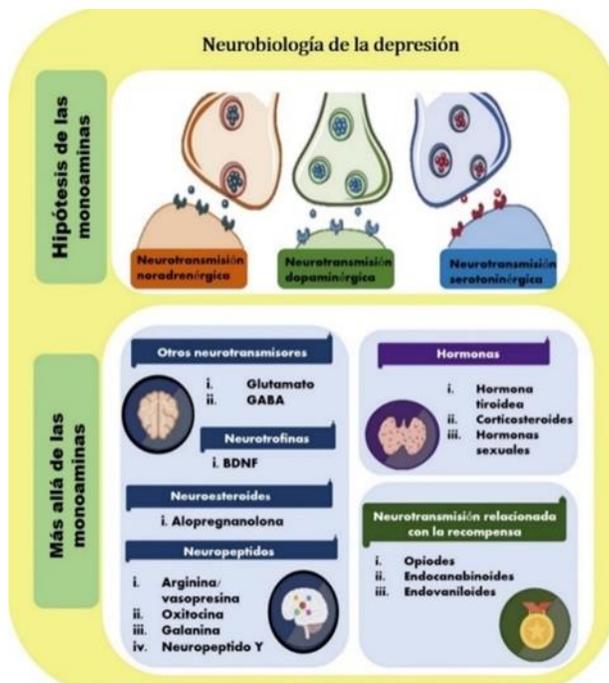


Figura 2. Nuevo enfoque sobre el mecanismo molecular de la depresión. El trastorno depresivo, por muchos años se centró en la hipótesis de la monoamina. Sin embargo, los resultados poco efectivos obtenidos en la clínica con fármacos antidepresivos disponibles actualmente han impulsado la investigación (Modificado de Chávez-Castillo *et al.*, 2019).

2.4. Neurocircuito de la depresión

Diversos estudios han propuesto que el circuito neuroanatómico que está implicado en el desarrollo de la depresión es el tracto límbico-cortical-estrial-palidal-talámico, el cual está comunicado a través del hipocampo, amígdala, núcleo caudado, putamen y corteza prefrontal (Price y Drevets, 2012).

El hipocampo es la estructura cerebral más estudiada asociada con el estrés, por lo que también es asociado con el daño cognitivo que ocurre en la depresión (Jeon y Kim, 2016). Además, el estrés crónico induce atrofia en subregiones hipocámpales y el volumen del hipocampo se reduce en pacientes con depresión mayor y con episodios de depresión recurrentes, aunque también se ha podido observar el cambio de volumen en algunos pacientes desde el primer episodio (Bremner *et al.*, 2000; Roddy *et al.*, 2019).

El deterioro de las funciones de la corteza prefrontal provoca varios síntomas como humor depresivo, daño en la memoria del trabajo y retardo psicomotor,

porque la corteza prefrontal está neuralmente conectada con el hipocampo, los ganglios basales, el tálamo, el área tegmental ventral, el núcleo de rafe dorsal y el locus coeruleus, regiones que están asociadas con la fisiopatología de la depresión (Murray *et al.*, 2011). Mediante un estudio de tomografía por emisión de positrones se determinó que hay un número reducido de sinapsis en la corteza prefrontal de pacientes con depresión (Holmes *et al.*, 2019). Además, se ha reportado que el estrés crónico en ratones produce una disfunción en el circuito prefrontal, el cual se asocia a la pérdida específica de las espinas dendríticas postsinápticas y a un daño en la actividad del ensamblaje multicelular en neuronas de proyección de la corteza prefrontal (Moda-Sava *et al.*, 2019).

2.5 Mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos monoaminérgicos

Durante décadas, los síntomas depresivos se han tratado con medicamentos estabilizadores del estado de ánimo que se dirigen a sistemas monoaminérgicos como la serotonina, la noradrenalina y dopamina. Estos fármacos incluyen inhibidores de la monoamino oxidasa y antidepresivos tricíclicos, así como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y los inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (ISRS, IRSN) (Thompson *et al.*, 2015).

La primera generación de fármacos antidepresivos fueron los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), como tranilcipromina y los antidepresivos tricíclicos (ATC's) (imipramina y amitriptilina), estos aumentan los niveles de monoaminas en la hendidura sináptica al inhibir la degradación de monoaminas o al inhibir la recaptación de serotonina, noradrenalina y en menor medida dopamina (NICE, 2004; Pérez-Caballero *et al.*, 2019). La segunda generación de antidepresivos incluye inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, como fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina o citalopram, así como los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina como desipramina o reboxetina e inhibidores duales de la recaptación de serotonina y noradrenalina como duloxetina, venlafaxina y milnacipram los cuales aumentan de los niveles sinápticos de serotonina y / o norepinefrina (NICE, 2004; Pérez-Caballero *et al.*, 2019).

Aunque los ATC's, ISRS y los IRSN elevan rápidamente los niveles de monoaminas, las mejoras sintomáticas son evidentes solo después de semanas de tratamiento sostenido y, por lo tanto, el bloqueo o la activación de los receptores o transportadores monoaminérgicos es sólo el primer paso en la cascada de eventos moleculares (figura 3) que después conllevan a cambios graduales, como la desensibilización de receptores monoaminérgicos específicos y la remodelación de las conexiones sinápticas (Pavlovicova *et al.*, 2015).

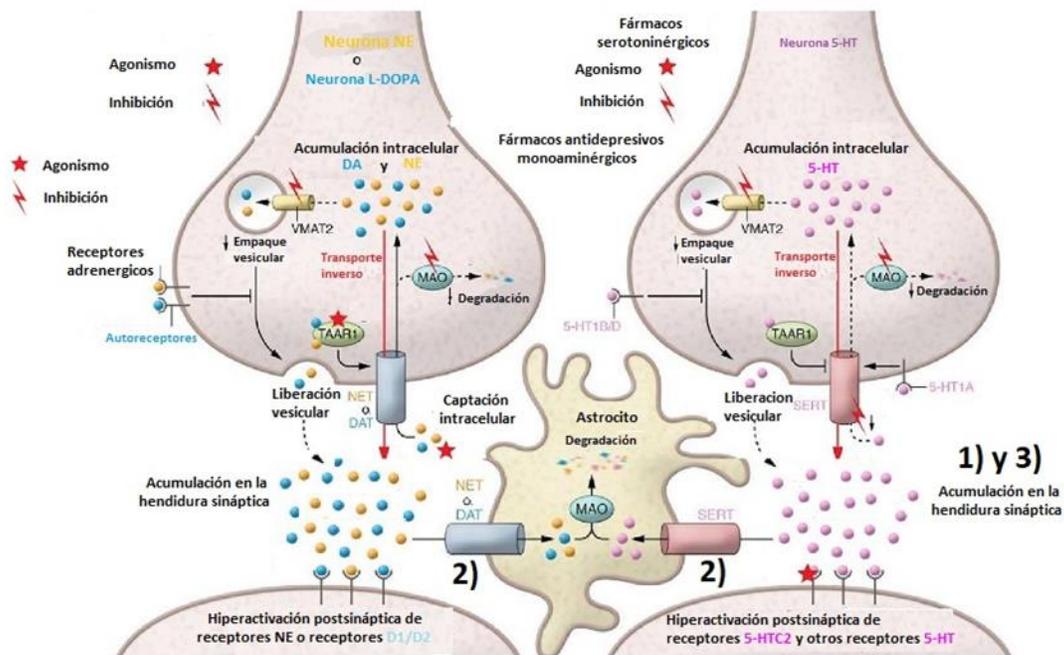


Figura 3. Mecanismo de acción de fármacos antidepresivos monoaminérgicos. Los fármacos monoaminérgicos actúan en las neuronas presinápticas y postsinápticas, inhibiendo la recaptación de serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) / noradrenalina (NA) y dopamina (DA) o inhibiendo la degradación de estos neurotransmisores mediante la enzima monoamino oxidasa (MAO), 1) ATC's: aumentan las monoaminas en la hendidura sináptica 2) ISRS: inhiben el transportador de monoamina SERT e IRSN: inhiben el transportador de monoamina NET 3) IMAO: inhiben la enzima monoamino oxidasa y se aumentan las monoaminas en la hendidura sináptica (Modificado de Stemmer *et al.*, 2019).

Aunque los antidepresivos monoaminérgicos revolucionaron el tratamiento del trastorno depresivo mayor (TDM) hace más de medio siglo, aproximadamente un tercio de los pacientes deprimidos experimentan depresión resistente al tratamiento (TRD), definida como la imposibilidad de tener una respuesta o remisión al menos a un antidepresivo probado con una dosis y duración adecuada (Pérez-Caballero *et al.*, 2019). Por lo tanto, es urgente buscar alternativas más seguras y efectivas contra esta enfermedad (Dai *et al.*, 2022).

2.6 Factor neurotrófico derivado del cerebro

El factor neurotrófico derivado del cerebro, es una proteína que pertenece a la familia de las neurotrofinas (Marosi y Mattson, 2014; Gökçe *et al.*, 2019), se expresa en estructuras límbicas en el cerebro, en mayor abundancia en la corteza y el hipocampo (Sasi *et al.*, 2017), donde se ha demostrado que está involucrado en la plasticidad, la supervivencia neuronal, la formación de nuevas sinapsis y la ramificación dendrítica (Edelmann *et al.*, 2014; Panja y Bramham, 2014; Lu *et al.*, 2014; Vilar y Mira, 2016; Numakawa *et al.*, 2018).

El BDNF se traduce a partir de una pro-neurotrofina (pro-BDNF) de 32 kDa, que se puede escindir en BDNF maduro de 14 kDa en el citoplasma, mediante endoproteasas o en la matriz extracelular mediante plasmina o metaloproteinasas de matriz (MMP) (Deinhardt y Chao, 2014; Giacobbo *et al.*, 2019). Los efectos biológicos tanto de pro-BDNF y BDNF maduro, dependen de la activación de dos tipos de receptores: 1) p75^{NTR} receptor de baja afinidad para las neurotrofinas maduras y de alta afinidad para las pro-neurotrofinas y 2) Receptor de Tropomiosina quinasa (TrkB) (Gökçe *et al.*, 2019). La importancia funcional de la unión diferencial a los receptores p75 o TrkB se destaca por sus efectos opuestos. La unión de pro-BDNF a p75 promueve la muerte celular neuronal (Cao *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2018). Mientras que, BDNF unido al receptor TrkB de alta afinidad, induce mecanismos de señalización relacionados con la supervivencia, diferenciación celular, complejidad de las arborizaciones dendríticas, plasticidad sináptica y reconstrucción de redes neuronales (Numakawa *et al.*, 2018; Vilar y Mira, 2016; Wei *et al.*, 2015b; Wang *et al.*, 2015). Estos procesos ocurren mediante la activación de varias cascadas de señalización, como, la proteína

quinasa activada por mitógeno-Ras (MAPK), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), y la vía de la fosfolipasa C γ (PLC- γ) (Numakawa *et al.*, 2013; Mitre *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018).

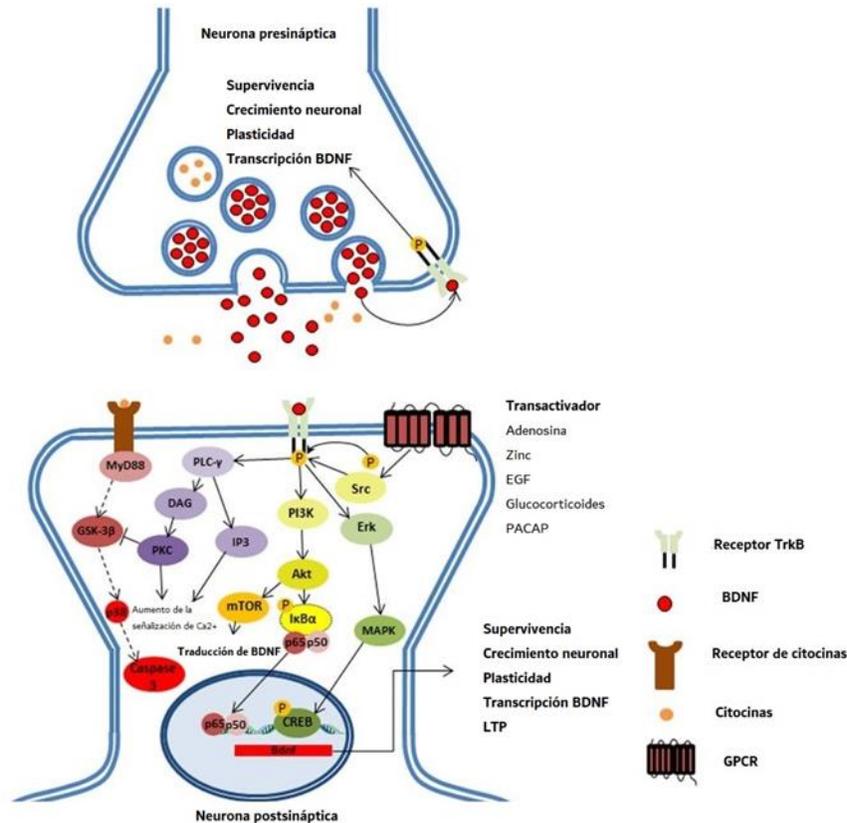


Figura 4. La proteína BDNF induce mecanismos de señalización relacionados con la supervivencia. La unión de BDNF al receptor TrkB provoca tres vías (río abajo) distintas. 1) La fosfolipasa C-gamma dependiente de BDNF (PLC- γ) que induce el aumento de Ca^{2+} e inhibir la cascada de apoptosis dependiente de inflamación (líneas discontinuas) mediante la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3-beta (GSK-3 β). 2) La inducción de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3K) induce la transcripción de ARNm de BDNF activando la traducción dependiente de mTOR de BDNF 3) Además, BDNF puede modular la regulación génica activando los factores de transcripción NF- κ B y CREB induciendo las rutas de Akt y Erk, respectivamente (Modificado de Giacobbo *et al.*, 2019).

2.7 Evidencia preclínica de la participación de BDNF en el desarrollo de la depresión

Las patologías cerebrales, como la depresión, se asocian con una regulación negativa de la expresión de BDNF, lo que resulta en niveles reducidos de esta proteína en el cerebro y en la sangre (Giacobbo *et al.*, 2019). Este factor neurotrófico se puede detectar en estructuras del sistema límbico, particularmente

en la corteza cerebral y el hipocampo, áreas cerebrales cruciales para controlar la cognición, el estado de ánimo y las emociones (Tripp *et al.*, 2012; Numakawa *et al.*, 2018).

Existe una hipótesis, que establece que la exposición a factores estresantes, reducen la señalización mediada por BDNF, mientras que los tratamientos antidepressivos conducen un aumento en la expresión de neurotrofinas, particularmente BDNF (Duman y Monteggia *et al.*, 2006; Krishnan y Nestler, 2008; Aydemir *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2013a; Nagahara y Tuszynski, 2011; Levy *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

El apoyo a esta hipótesis está respaldado por estudios realizados en animales donde se ha demostrado que los niveles de BDNF en la corteza prefrontal y en áreas del hipocampo como CA3 y el giro dentado fueron significativamente más bajos en las ratas deprimidas en comparación con las ratas del grupo control, en el modelo de impotencia aprendida (Yang *et al.*, 2015). Otro estudio en ratas, mostró que el tratamiento de 3 semanas con agomelatina, un antidepresivo novedoso que actúa como agonista de los receptores de melatonina (MT1 y MT2) y antagonista de los receptores serotoninérgicos, causó un aumento de los niveles de BDNF del hipocampo, en ratas sometidas a estrés leve impredecible crónico, (CUMS por sus siglas en inglés), además de una reducción sobre el comportamiento de los animales y los cambios en las neuronas del hipocampo producidos por los estresores (Lu *et al.*, 2018). También se ha demostrado que la microinyección de BDNF directo en el hipocampo en diversos modelos animales causa una disminución del comportamiento depresivo en la prueba de natación forzada, mayor consumo de sacarosa, menor latencia en la prueba de hipofagia inducida y mayor tiempo en los brazos abiertos de un laberinto elevado (Schmidt y Duman, 2010; Géral *et al.*, 2013; Giacobbo *et al.*, 2019).

2.8 Evidencia clínica de la participación de BDNF en el desarrollo de la depresión

Respecto a los estudios clínicos, en pacientes con depresión mayor, se ha reportado que los factores neurotróficos como BDNF, el factor de crecimiento vascular y el factor de crecimiento similar a la insulina-1, disminuyen tanto en la expresión génica como en los niveles periféricos, mientras que los antidepresivos tienen un efecto normalizador de estos factores (Schmidt y Duman, 2007; Lu *et al.*, 2014).

Los estudios *post mortem* revelaron que los pacientes resistentes al tratamiento antidepresivo monoaminérgico tenían niveles de BDNF significativamente más bajos, especialmente en estructuras cerebrales ricas en BDNF como el hipocampo y, que el tratamiento con la ketamina, un fármaco anestésico antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) utilizado como antidepresivo a dosis sub-anestésicas, fue capaz de aumentar los niveles plasmáticos de BDNF al nivel de los controles sanos (Allen *et al.*, 2015; Brunoni *et al.*, 2014; Kim y Na, 2016).

Estos hallazgos sugieren que la expresión alterada de BDNF y la desregulación de la neurogénesis en el hipocampo pueden efectuar cambios en las redes neuronales que están implicados en la fisiopatología de la depresión. Sin embargo, tampoco hay evidencia concluyente que pueda discriminar si los cambios en los niveles de BDNF son causales o la consecuencia del inicio de la enfermedad (Phillips, 2017).

Existen algunas pruebas circunstanciales que sugieren un papel causal para BDNF, por ejemplo; las poblaciones humanas con una variante genética que disminuye la concentración de BDNF parecen ser más susceptibles a los trastornos psiquiátricos, pero todavía hay una brecha en nuestra comprensión de los mecanismos fisiológicos que conducen a cambios en los niveles de BDNF en condiciones patológicas (Giacobbo *et al.*, 2019). Por esta razón, comprender, manipular e interferir las vías de señalización de BDNF nos puede conducir al descubrimiento de blancos farmacológicos para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, así como el descubrimiento de los mecanismos subyacentes del efecto terapéutico de los antidepresivos (Lu *et al.*, 2014; Sasi *et al.*, 2017).

2.9 Anestésico utilizado como antidepresivo

La ketamina es un fármaco antagonista del receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) sensible al neurotransmisor glutamato, utilizado clínicamente como anestésico. Recientemente, estudios clínicos han demostrado su efecto antidepresivo con dosis sub-anestésicas (Newport *et al.*, 2015; Dutta *et al.*, 2015; Kishimoto *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016; Wilkinson *et al.*, 2018; Hashimoto, 2019).

La FDA (2019) aprobó el aerosol nasal de (S) ketamina para tratar pacientes con trastorno depresivo mayor resistente al tratamiento con antidepresivos convencionales, también se ha demostrado actividad antidepresiva de la ketamina en modelos conductuales con animales (Pham *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Kordjazy *et al.*, 2016; Holz *et al.*, 2019). Por lo que este fármaco es una pista para descubrir nuevas terapias antidepresivas, centradas en receptores distintos a los monoaminérgicos (Kim y Na, 2016). También muchos investigadores han puesto énfasis en la ketamina, para determinar el mecanismo molecular por el cual un anestésico puede usarse como antidepresivo (Yang *et al.*, 2018; Yuan y Hou, 2015; Gerhard *et al.*, 2016).

En el 2011, Autry y cols. demostraron el efecto antidepresivo de la ketamina en ratones, el cual está mediado por el antagonismo de NMDAR a nivel postsináptico, lo que induce una mayor activación de AMPAR (receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y la señalización intracelular iniciada por BDNF, como la activación de TrkB. Esto sucede porque la activación de los receptores AMPAR mediado por glicina y glutamato, aumenta la liberación de BDNF a través de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (L-VDCC) (Lepack *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014) (Figura 5).

En otros estudios se ha reportado que el tratamiento con ketamina en ratones fue capaz de aumentar los niveles de BDNF en la corteza prefrontal, y en las áreas GD y CA3 del hipocampo (Dong *et al.*, 2017; Zanos *et al.*, 2016). También, se determinó un aumento de BDNF en el hipocampo después de la administración aguda de ketamina en ratas durante la prueba de nado forzado, lo que sugiere que

los efectos antidepressivos de la ketamina pueden estar asociados con un aumento de los niveles de esta proteína (Yang *et al.*, 2013).

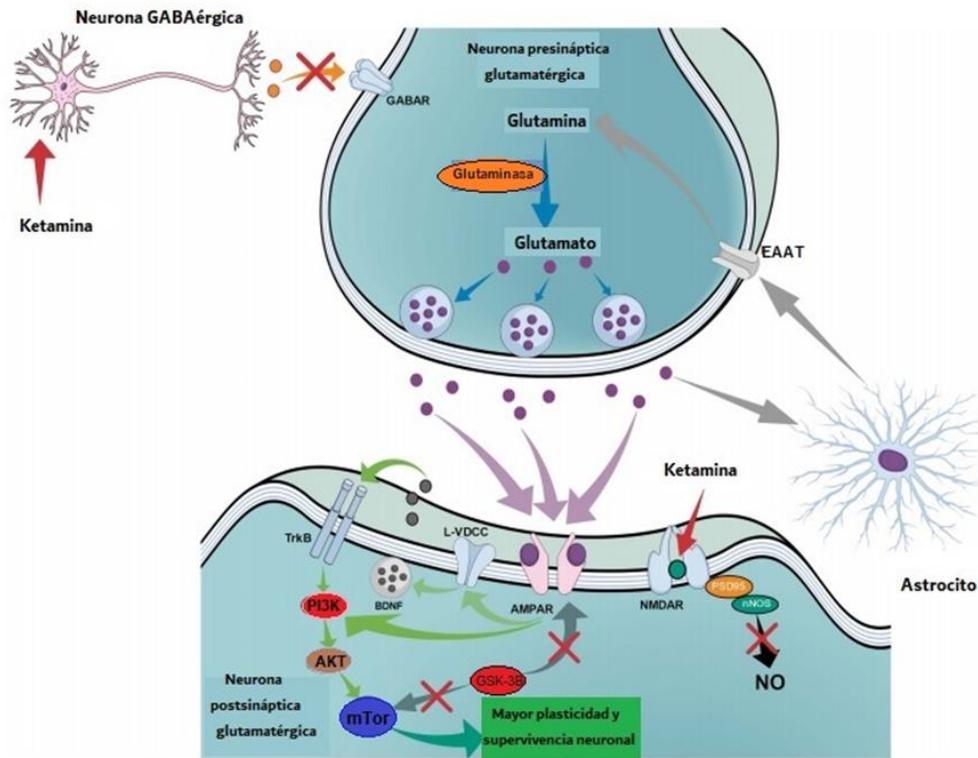


Figura 5. Mecanismo de acción propuesto del efecto antidepressivo de la ketamina. Las flechas rojas muestran el comienzo de la acción de la ketamina al bloquear los receptores NMDAR en las neuronas postsinápticas, lo que conduce a dos efectos simultáneos principales. 1) La flecha negra muestra que el bloqueo de NMDAR en las terminales glutamatergicas postsinápticas conduce a una producción reducida de óxido nítrico (NO). 2) La flecha naranja muestra la liberación reducida de GABA por las neuronas gabaérgicas, lo que conduce a una inhibición reducida de las terminales glutamatergicas presinápticas y una mayor liberación de glutamato. 3) El aumento de la liberación de glutamato (*puntos morados*) conduce a un impulso aumentado de activación a través de los receptores AMPA (AMPA) como se muestra con las flechas moradas. 4) Las flechas verdes muestran que la activación de AMPAR puede conducir: a) estimulación directa de PI3K – AKT – de la vía de rapamicina (mTOR) o b) activación indirecta de la misma vía a través de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (L-VDCC), que aumenta la liberación de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que luego puede activar los receptores de tirosina quinasa B (TrkB). 5) Las flechas de color gris oscuro muestran la reducción de los efectos de la glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β) sobre mTOR y AMPAR. 6) Flechas gris claro muestran el reciclaje de glutamato que ocurre a través de los astrocitos, que liberan glutamina que será transportada a la terminal presináptica por los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT). 7) Las flechas azules muestran la síntesis de glutamato a partir de glutamina a través de la acción de la glutaminasa hasta el almacenamiento en las vesículas (Modificado de Pereira *et al.*, 2018).

Otra proteína objetivo de la ketamina es el elemento de respuesta AMPc (CREB, por sus siglas en inglés), los trabajos indican que CREB es un punto de intersección para múltiples vías de transducción de señales antidepresivas (Pittenger y Duman, 2008; Xue *et al.*, 2016). La activación de CREB, regula más de 100 genes identificados, incluido el gen que codifica a BDNF que contribuyen a la regulación de la neuroplasticidad y la neurogénesis (Racagni y Popoli, 2008).

2.10 Alteración del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA)

El eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), es uno de los principales sistemas endocrinos que mantienen la homeostasis cuando el organismo está estresado (Belvederi *et al.*, 2014; Sandi y Haller, 2015; Füzési *et al.*, 2016). Cuando se presenta un estímulo estresante, la amígdala estimula el eje simpático autónomo y el eje HPA (Phelps y LeDoux, 2005; Gold, 2015). El eje simpático autónomo es responsable de la respuesta rápida, actuando a través de la secreción de epinefrina mediante las glándulas suprarrenales, por consiguiente, al eje HPA se activa por la liberación de epinefrina, desencadenando la secreción del factor liberador de corticotropina (CRH) por el núcleo paraventricular del hipotálamo. El CRH estimula la glándula pituitaria y provoca la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH), que a su vez estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) de la corteza suprarrenal (Juruena, 2014; Henckens *et al.*, 2016), completando un circuito de retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis anterior y el hipotálamo (Slominski *et al.*, 2013) (figura 6).

Se ha reportado en animales de experimentación que en condiciones de estrés crónico, la activación del eje HPA puede provocar la sobreproducción de cortisol, activando los receptores de glucocorticoides (GR) que, a su vez, pueden dañar las neuronas dentro del hipocampo (Anacker *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2015). Estos efectos se deben a la expresión generalizada de GR en el cerebro y a la estimulación crónica por corticosteroides que pueden inducir la muerte neuronal, suprimir los mediadores proinflamatorios y causar cambios estructurales en el hipocampo, que podrían ser la causa de los efectos adversos observados en el SNC (Ciriaco *et al.*, 2013;Juruena, 2014).

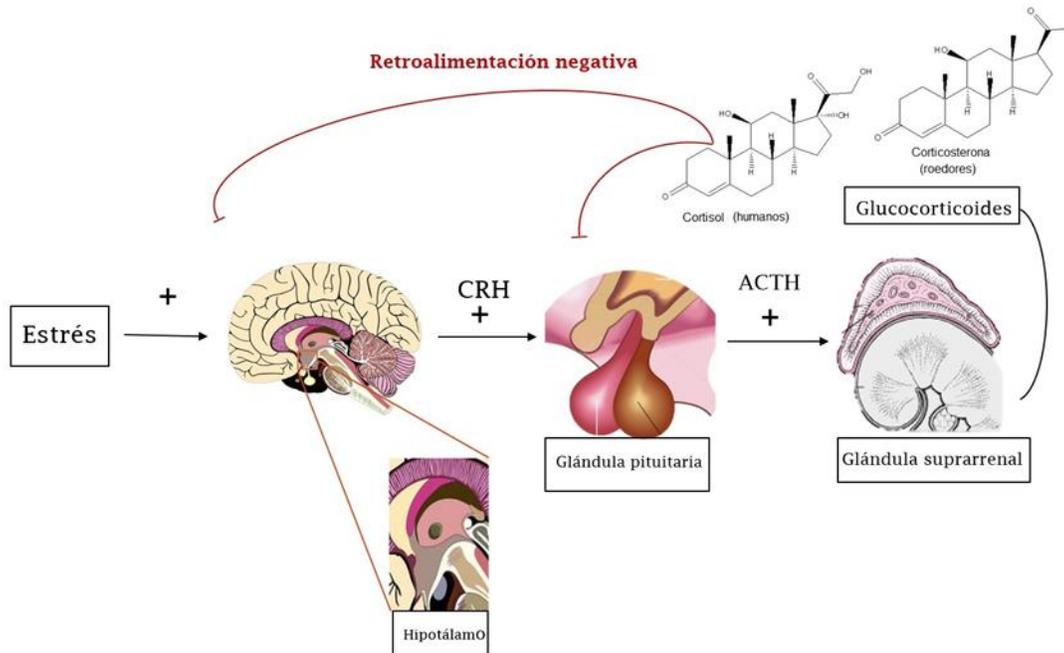


Figura 6. Mecanismo de retroalimentación negativa de glucocorticoides en el eje hipotálamico pituitario adrenal. En pacientes deprimidos, pueden presentar niveles elevados de cortisol circulante y ACTH debido a la hiperactividad del eje HPA (Modificado de O'Brien *et al.*, 2012).

2.11 Evidencia preclínica de la participación del eje HPA en la depresión

Se ha reportado que altos niveles de corticosterona causa daño patológico a las neuronas del hipocampo tanto *in vitro* como *in vivo*, induciendo un comportamiento similar a la depresión en animales (Pariante y Lightman, 2008; Pitta *et al.*, 2013). En roedores, varios hallazgos han indicado que la administración repetida de corticosterona induce cambios neuroquímicos similares a los de la depresión, incluidos los efectos adversos sobre la neurogénesis del hipocampo que podría ser revertido por un tratamiento con antidepresivos (Sternner y Kalynchuk, 2010; Mao *et al.*, 2012; Pitta *et al.*, 2013). En el 2014, Zhu y colaboradores, reportaron que la exposición crónica de glucocorticoides en el hipocampo de ratones condujo a la interrupción del mecanismo de retroalimentación del eje HPA desencadenando comportamiento depresivo en los animales. Otro grupo de investigadores, reportó que el tratamiento con corticosterona exógena durante el período posparto / lactancia en roedores induce comportamientos similares a la

depresión y déficits en la atención materna (Brummelte y Galea, 2010; Maguire y Mody, 2016).

2.12 Evidencia clínica de la participación del eje HPA en la depresión

Aproximadamente la mitad de las personas con depresión, tienen un aumento constante en la liberación de cortisol y estas anomalías se corrigen con el tratamiento antidepresivo (Malykhin *et al.*, 2010b; Huang *et al.*, 2013; Travis *et al.*, 2016), y esto se debe a que los fármacos que ejercen su efecto por la vía monoaminérgica tienen efectos neuroprotectores en los subcampos DG y CA del hipocampo de ratones y pacientes (Pittenger y Duman, 2008; Huang *et al.*, 2013).

El primer estudio realizado con una gran cohorte (n = 1293) de pacientes con depresión mayor, detectó una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de cortisol salival matutino y vespertino entre los pacientes deprimidos y los controles (Knorr *et al.*, 2010). En otro estudio que involucro a 18,454 pacientes con depresión se encontró que aproximadamente el 73% de las personas deprimidas tenían valores de cortisol mayores que las personas no deprimidas.

Además, las reducciones volumétricas en el hipocampo y la corteza prefrontal (PFC) se encuentran entre las anomalías neuronales mejor documentadas en el trastorno depresivo mayor (Belleau *et al.*, 2019). Por esta razón, se buscó encontrar una relación entre la alteración del eje HPA (aumento de cortisol sérico) y el volumen reducido de estas estructuras cerebrales. De este modo, en un estudio de imagen con resonancia magnética funcional en mujeres con trastornos depresivos, reportaron que la hiperactividad en respuesta al estrés en la amígdala y el hipocampo estaba relacionada con las alteraciones del eje HPA (Holsen *et al.*, 2013; Malykhin y Coupland, 2015).

Estos hallazgos preclínicos y clínicos sugieren una asociación entre el estrés, la disfunción del eje HPA y la depresión, sugiriendo que estas anomalías hormonales contribuyen al desarrollo de este trastorno mental (Maguire, 2019).

2.13 Medicina complementaria

Los fármacos antidepresivos disponibles actualmente ejercen su efecto aumentando la serotonina, dopamina y noradrenalina, como la fluoxetina, imipramina, citalopram, amitriptilina por mencionar algunos, y estos han resultado ser poco eficaces en muchas personas porque se requiere tomarlos al menos 3 meses para observar la disminución de los síntomas depresivos. También, producen efectos secundarios preocupantes como dolor de cabeza, náuseas, mareos, somnolencia y pérdida de la libido (Chávez-Castillo, 2019). Por lo que, las alternativas para el tratamiento del trastorno depresivo siguen siendo insuficientes. Alternativamente, se ha demostrado que los fármacos antidepresivos disponibles alcanzan tasas de remisión de alrededor del 56% después de cuatro etapas de tratamiento sucesivas (Dale *et al.*, 2015). Además, la mayoría de los antidepresivos disponibles en la actualidad muestran perfiles problemáticos de efectos secundarios y un inicio de acción retrasado, lo que complica aún más el tratamiento de este trastorno (Mathew *et al.*, 2008), lo que lleva a los pacientes a buscar medicinas complementarias y alternativas (CAM) (Costanian *et al.*, 2017; Henson *et al.*, 2017). El Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés), define CAM como enfoques terapéuticos que generalmente no se incluyen en los sistemas convencionales de medicina occidental, refiriéndose a medicina complementaria aquella que es utilizada en combinación con la atención convencional, mientras que la terapia alternativa es aquella que se utilizan en lugar de la atención convencional (NCCIH, 2018).

Las prácticas de los curanderos tradicionales de Europa (naturopatía y homeopatía), Asia (Ayurveda y medicina tradicional china) y otros continentes se clasifican como CAM. Actualmente, algunas terapias complementarias se han convertido en un complemento prometedor en el tratamiento estándar de la depresión (Luberto *et al.*, 2013; Ravindran y da Silva, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2015).

2.14 Aromaterapia

La aromaterapia se utiliza como un método eficaz en medicina complementaria y alternativa, debido a su operación no invasiva, fácil administración y resultados rápidos (Yim *et al.*, 2009; Chenxia *et al.*, 2018). Esta práctica implica el uso terapéutico de aceites esenciales para tratar diversas afecciones físicas o psicológicas (De Sousa *et al.*, 2017; Chenxia *et al.*, 2018). Se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar los efectos farmacológicos de los aceites esenciales y extractos de diversas especies vegetales aromáticas en el sistema nervioso central (McLean *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha evaluado su efecto sobre el dolor crónico, la depresión, la ansiedad, el insomnio, mejorar la eficiencia cognitiva, aliviar el estrés y otros trastornos psicológicos y fisiológicos relacionados, entre otros (Malcolm y Tallian, 2017; Park *et al.*, 2012; Lillehei y Halcon, 2014; López *et al.*, 2017).

El mecanismo principal de la aromaterapia está relacionado con el sistema límbico del cerebro, estimulado las células olfativas, que transmiten señales al cerebro y afectan el sistema nervioso autónomo, el sistema nervioso central y la secreción hormonal (Kagawa *et al.*, 2003; Dobetsberger y Buchbauer, 2011; Nagai *et al.*, 2014).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios provenientes de plantas aromáticas, que se caracterizan por ser lipofílicos, volátiles y con pesos moleculares pequeños (<30 Da). Estos metabolitos generalmente son biosintetizados por las rutas metabólicas del ácido shikímico y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP, por sus siglas en inglés), y son agrupados químicamente en el grupo de los fenilpropanoides y terpenos (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

Estudios clínicos recientes muestran que los aceites esenciales, inhalados, ingresan al torrente sanguíneo después del intercambio de gases en los pulmones (De Sousa *et al.*, 2017; Chenxia *et al.*, 2018). La aplicación clínica de los aceites esenciales en aromaterapia ha recibido cada vez más atención, debido a que hay evidencia preclínica y clínica de que la aromaterapia puede usarse como

tratamiento en pacientes con depresión y síntomas depresivos secundarios (Yim *et al.*, 2009; De Sousa *et al.*, 2017). Sin embargo, se necesita una investigación más detallada sobre las propiedades farmacológicas de los aceites esenciales inhalados (Caputo *et al.*, 2018).

2.15 Evidencia preclínica del uso de aceites esenciales para el tratamiento de la depresión o algunos de sus síntomas

A continuación, se en lista una serie de estudios que dan evidencia de la actividad antidepressiva de diversos aceites esenciales.

El aceite esencial de *Ocimum basilicum* (Linneo) reduce el deterioro de la memoria, la neurodegeneración del hipocampo y la sintomatología depresiva, causada por el modelo de estrés crónico impredecible en ratones (Ayuob *et al.*, 2017; Ayuob *et al.*, 2018).

Los aceites esenciales de naranja dulce [*Citrus sinensis*, (Osbeck)] (Hocayen *et al.*, 2019) y de rosa [*Rosaxdamascena*, (Mill)] (Nazıroğlu *et al.*, 2013) tienen efectos antidepressivos en modelos de ratón y rata, respectivamente.

El aceite esencial de *Asarum heterotropoides* (Linneo) administrado de manera inhalada a ratones inhibió eficazmente las respuestas conductuales similares a la depresión en ratones sometidos a la prueba de nado forzado (Park *et al.*, 2015).

Se descubrió que el aceite de lavanda [*Lavandula angustifolia* (Mill y Moench)] es más potente que el ibuprofeno para aliviar los trastornos relacionados con el estrés en ratas sometidas a estrés de restricción (Qadeer *et al.*, 2018).

Se ha evaluado la actividad ansiolítica del aceite esencial de la fruta fresca de bergamota [*Citrus bergamia* (Risso y Poit)]. Esta fruta es utilizada en varios países en aromaterapia para reducir el dolor, facilitar la inducción del sueño y/o minimizar los efectos de la tensión inducida por el estrés y ansiedad. Los resultados de este estudio confirman un efecto relajante-ansiolítico en las pruebas conductuales nado forzado, prueba de laberinto elevado y prueba Rotarod (McDonnell y Newcomb, 2019; Rombolà *et al.*, 2020).

2.16 Evidencia clínica del uso de aceites esenciales para el tratamiento de la depresión o algunos de sus síntomas

Varios estudios clínicos han reportado que el tratamiento con aceites esenciales inhalados reduce los síntomas depresivos y la ansiedad (Malcolm y Tallian, 2018).

El aceite esencial más estudiado sobre su efecto en diferentes estados de ánimo es el de la lavanda, posiblemente debido a sus efectos ansiolíticos previamente demostrados (Kasper *et al.*, 2015). Por ejemplo, pacientes diagnosticados con depresión mayor, que presentan ansiedad, insomnio y agitación psicomotora, fueron tratados con aceite esencial de lavanda durante tres semanas, los resultados demostraron que los síntomas se redujeron, en comparación con lorazepam, fármaco que pertenece al grupo de las benzodiazepinas con efectos sedantes y ansiolíticos (Fibler y Quante, 2014).

Hwang y Shin en el 2015, realizaron un meta-análisis sobre el efecto de la inhalación de mezclas de aceites esenciales en voluntarios sanos, pacientes con enfermedades crónicas y pacientes hospitalizados. Los resultados indican que los tratamientos de aromaterapia con lavanda, geranio, limón, bergamota, mejorana, eucalipto y otras mezclas, parecen ser efectivos contra la ansiedad y el estrés, además, de que promueven el sueño.

En un estudio piloto observacional en mujeres con ansiedad posparto, se logró reducir sus niveles de ansiedad administrando una mezcla de aceite de rosa/lavanda, durante 15 minutos, dos veces por semana durante 4 semanas (Conrad y Adams, 2012).

En un estudio donde participaron mujeres menopáusicas con depresión y mujeres menopáusicas sin depresión, las cuales inhalaron aceite esencial de salvia (*Salvia sclarea*) en una sola ocasión, se evaluaron las conductas normales, depresivas y la cantidad de cortisol en sangre antes y después de la exposición. Tanto la pre-inhalación como la post-inhalación del aceite de salvia aumentaron significativamente las concentraciones plasmáticas de serotonina; mientras que, los niveles plasmáticos de cortisol disminuyeron significativamente en ambos grupos (Lee *et al.*, 2014).

Ensayos realizados en Alemania con pacientes con ansiedad moderada a severa demostraron que la administración oral de una preparación estandarizada de aceite de lavanda (*Lavanda angustifolia*) redujo las puntuaciones de la Escala de Calificación de Ansiedad de Hamilton (HAMA) siendo bien tolerado y reportando efectos secundarios gastrointestinales leves (Kasper *et al.*, 2015).

2.17 Biología y usos populares de *Litsea glaucescens*

Litsea glaucescens (Kunth), comúnmente conocida como laurel, es un arbusto dioico que pertenece a la familia Lauraceae, se distribuye en México en climas templados con bosques tropicales perennifolios, bosques de encino, bosques mixtos de pino-encino (Valdés y Flores, 1985; Argueta-Villamar *et al.*, 1994; Jiménez-Pérez *et al.*, 2011). Sus hojas se utilizan tradicionalmente como remedio en medicina popular contra enfermedades como la depresión, el cólico, el dolor, el vómito y la diarrea (Jiménez-Pérez *et al.*, 2011). Ya desde 1959, Hernández reportó que los nativos utilizaban el “ecapatli”, al que describió como una especie de laurel parecido al europeo, pero con las hojas más pequeñas, para tratar la epilepsia y la parálisis, padecimientos relacionados con el sistema nervioso central (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

En la actualidad la etnia Mazahua de Atlacomulco prepara una decocción de hojas de laurel junto con otras plantas medicinales para tratar enfermedades de filiación cultural relacionadas con el sistema nervioso central, como: nerviosismo, susto, y estados de ánimo como la tristeza (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

De acuerdo con el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (1994), de *Litsea glaucescens* se utilizan las hojas, ya sea para preparar una infusión o un extracto alcohólico que se agrega en baños. También, sus compuestos volátiles se pueden inhalar en un baño temazcal o del vapor de las hojas hervidas o quemadas. Se utiliza para el tratamiento de trastornos estomacales, tales como diarrea, calambres e indigestión; así como problemas ginecológicos, como dolores posnatales, facilitar el nacimiento, tratar la dismenorrea, la esterilidad. Además, se usa para curar dolor, infecciones, fiebres y reumatismo.

2.18 Aceite de *Litsea glaucescens* como potencial terapia complementaria

El aceite esencial foliar de *Litsea glaucescens* está compuesto por alrededor 206 compuestos de los cuales solo la cuarta parte alcanzan el 1% de abundancia relativa, y siete de estos son los mayoritarios: eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, α -terpineol, α -pineno, β -pineno y o-cimeno (Jiménez-Pérez *et al.*, 2011). También, se determinó que la composición del aceite esencial es variable de acuerdo con la época del año y si se trata de un ejemplar masculino o femenino, por lo tanto se concluyó que es relevante conocer estos datos de la muestra de trabajo en estudios preclínicos o clínicos (Díaz-Cantón, 2018).

En un estudio realizado por Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012, determinaron el efecto antidepresivo del aceite esencial de *L. glaucescens* (i.p.) en ratones, utilizando el modelo de nado forzado en ratón. En este estudio se observó una disminución en el tiempo de inmovilidad con respecto al grupo control y esta disminución no estaba relacionada con un efecto en la actividad motora general de los ratones, evaluada en una prueba de campo abierto.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La depresión es la principal causa de discapacidad laboral en el mundo. Cabe destacar que en muchos casos va acompañada de ansiedad. La pandemia de COVID-19 incrementó la incidencia y gravedad de este trastorno mental debido a la disminución en la movilidad y la socialización.

Los tratamientos que se ofrecen a los pacientes con depresión pueden ser farmacológicos y no farmacológicos. Si bien, los primeros son de gran ayuda, tienen desventajas como la generación de tolerancia, largos periodos para el inicio del efecto, disfunción sexual, entre otros. Por lo anterior, los pacientes buscan terapias complementarias. Entre estas, se encuentra la aromaterapia, que implica el uso terapéutico de aceites esenciales.

Los antecedentes etnomédicos históricos y contemporáneos, así como los resultados de los estudios farmacológicos de *Litsea glaucescens* obtenidos por nuestro grupo de investigación, indican que el aceite esencial del “laurel mexicano” (*Litsea glaucescens*) posee actividad antidepresiva por vía intraperitoneal e inhalatoria en ratones; sin embargo, se desconoce si presenta actividad ansiolítica por esta vía, así como, si en su mecanismo de acción, participa la vía no monoaminérgica, en especial la proteína BDNF y el eje HPA.

IV. HIPÓTESIS

El efecto antidepresivo y ansiolítico del aceite esencial de *Litsea glaucescens* administrado por vía inhalatoria, simulando la aromaterapia, involucrará también una vía no monoaminérgica, estimulando la síntesis de BDNF y disminuyendo la actividad de HPA.

V. OBJETIVOS GENERALES

Determinar si el aceite esencial de *Litsea glaucescens*, administrado por vía inhalatoria, posee actividad ansiolítica.

Explorar la participación de vías no monoaminérgicas (BDNF y HPA) en el mecanismo de acción del efecto antidepresivo del aceite esencial de *Litsea glaucescens*, administrado por vía inhalatoria.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto ansiolítico del aceite esencial de *Litsea glaucescens*.
- Determinar si el aceite esencial administrado vía inhalatoria modifica los niveles de BDNF en la corteza prefrontal e hipocampo de cerebro de ratón.
- Determinar si se modifica el nivel de corticosterona en plasma de ratón administrado con aceite esencial por vía inhalatoria.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Análisis químico y actividad biológica del aceite esencial de *Litsea glaucescens*

6.1.1 Sustancias. Se utilizaron como controles positivos por sus efectos ansiolíticos/ antidepresivos: diazepam (1 mg/kg, Roche) como fármaco ansiolítico-sedante, clorhidrato de imipramina (30 mg/kg, Sigma Aldrich) y ketamina (10 mg/kg, PISA). Como control negativo se utilizó el aceite de maíz (20 μ L).

Para el análisis químico y las pruebas conductuales se utilizó linalol (20 μ L, Sigma Aldrich) y β -pineno (20 μ L, Sigma aldrich).

6.1.2 Material vegetal y extracción del aceite esencial. Se colectaron hojas de *Litsea glaucescens* de un ejemplar masculino en julio de 2017 y febrero de 2020 en la localidad de Huitzila en el estado de Veracruz. Los ejemplares de herbario se localizan en la Facultad de Ciencias de la UNAM con los siguientes números de voucher: 161832 y 161833.

El material vegetal se dejó secar durante 15 días a temperatura ambiente, en la sombra. Las hojas de cada la colecta se trozaron, se pesaron 126.49 g y 119.11 g respectivamente y se colocaron en el equipo de destilación por arrastre de vapor. La destilación de cada muestra duro 2 horas. Los aceites esenciales obtenidos (0.94 g y 0.85 g) se almacenaron a 4°C en un vial ámbar sellado con parafilm hasta su uso. Para las pruebas biológicas, se utilizó el aceite colectado en el 2020.

6.1.3 Análisis químico y cuantificación de los compuestos. Los aceites esenciales se cuantificaron de acuerdo con el método estandarizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas descrito por Díaz-Cantón 2018. Brevemente, se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent technologies 7890B GC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent technologies 5977 MSD, utilizando las siguientes condiciones: columna HP-5ms, fenilo al 5%, dimetilpolisiloxano al 95%, 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m; gas acarreador helio (He); flujo 1mL/min, velocidad media 36.262 cm/sec. Se inició el análisis con una temperatura de 40°C durante 1 minuto. Pasado ese tiempo se inició una rampa de calentamiento de 15°C/minuto hasta alcanzar los 300°C, manteniendo

esta temperatura 2 minutos. Las curvas de calibración se realizaron por triplicado con estándares certificados de eucaliptol (3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), linalol (3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y β -pineno (7.8, 15.62, 31.25, 62.5 y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los aceites se analizaron en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC-IQ), con la asesoría de la M.C. Mayra León Santiago.

6.1.4 Animales de experimentación. Se utilizaron ratones CD1 machos de 25 a 30 g de peso adquiridos del bioterio general de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. Los ratones permanecieron en un cuarto de alojamiento de animales en el Instituto de Química de la UNAM, con temperatura constante (22 ± 1 °C) en un ciclo de 12 horas luz versus 12 horas oscuridad, separados en grupos de máximo 10 animales por caja con libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos que involucran el uso de animales de experimentación se llevaron a cabo conforme la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Además, del protocolo experimental aprobado por el comité de ética del Instituto de Química (CICUAL-IQ-002-17). Todos los experimentos fueron video grabados y posteriormente se colectaron los datos de las grabaciones.

6.1.5 Administración del aceite esencial, linalol y β -pineno por inhalación. Se realizó el protocolo experimental establecido por Díaz-Cantón 2018. Brevemente, se colocaron 20 μL de aceite de laurel, linalol o β -pineno en una tapa de vidrio dentro de la cámara de inhalación (26 x 22 x 20 cm), se saturó la caja durante cinco minutos con los volátiles del aceite, posteriormente se colocaron los ratones en grupos de 2 dentro de la caja exponiéndolos al tratamiento respectivo (6 animales por tratamiento) durante 30 minutos (figura 7). Pasado este tiempo se evaluaron los animales en las pruebas conductuales.



Figura 7. Administración del aceite esencial por vía inhalatoria.

6.1.6 Pruebas conductuales

Las pruebas de cilindro de exploración, campo abierto, tablero con orificios y cruz elevada se realizaron de manera consecutiva con los mismos grupos integrados por 6 ratones cada uno. Se utilizó como control positivo diazepam a una dosis de 1 mg/kg (p.o.).

6.1.6.1 Cilindro exploratorio. Para esta prueba se utilizó un cilindro de vidrio (30 cm de altura, 11 cm de diámetro y 3 mm de espesor) que se encuentra sobre un papel. El ratón se colocó dentro del cilindro y se registró el número de levantamientos que realizó sobre sus extremidades posteriores durante un período de cinco minutos. Al concluir el tiempo se retiró el ratón y se limpió el lado interior del cilindro con una solución de etanol (30% v/v) y se cambió el papel. Una disminución en la actividad exploratoria (número de levantamientos) en un entorno desconocido revela un efecto sedante (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

6.1.6.2 Tablero de orificios. Para esta prueba se utilizó un tablero (40 x 40 cm) que tiene 16 orificios con distribución homogénea (6 cm entre ellos) y 3 cm de diámetro. La conducta cuantificable es el número de exploraciones dentro de los

orificios. Cada animal se colocaba en el centro del tablero y posteriormente se contó el número de exploraciones a los orificios durante dos minutos en las videograbaciones. Después de retirar cada ratón el aparato se limpió con solución de etanol (30% v/v). Si el grupo de prueba realiza más exploraciones que el grupo control, se considera que la sustancia evaluada tiene efecto ansiolítico (Himanshu *et al.*, 2020).

6.1.6.3 Laberinto de cruz elevado. El laberinto en cruz utilizado está a 50 cm por encima del nivel del suelo y consta de dos brazos abiertos (largo 30 cm ancho 5 cm) y dos brazos cerrados (largo 30 cm, ancho 5 cm, alto 15 cm) y una plataforma central (5 x 5 cm). Cada animal se colocó en el centro del laberinto frente a un brazo abierto y permaneció en el laberinto por 5 minutos. Posteriormente se registró el tiempo de permanencia en los brazos abiertos después del experimento. Se consideró que el animal se encontraba en los brazos abiertos si las cuatro patas estaban en el brazo. Después de cada prueba, se limpió el laberinto con una solución de etanol (30% v/ v). Un mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos del grupo de prueba con respecto al control, sugiere actividad ansiolítica (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

6.1.7 Pruebas conductuales para la determinación de la actividad antidepresiva

6.1.7.1 Campo abierto. Se utilizó para evaluar la actividad motora espontanea de los ratones. Consiste en una caja de acrílico transparente (18 x 28 cm) dividida en 12 cuadrantes. Cada animal se colocó suavemente en el centro del aparato. El parámetro observado fue el número de cuadrados cruzados (con las cuatro patas en un cuadrado) en un período de dos minutos. Una disminución o un aumento del número de cuadrantes recorridos del grupo de prueba con respecto al grupo control, indica un efecto sobre la actividad motora de los roedores (Archer, 1973).

6.1.7.2 Nado forzado. El modelo utilizado fue similar a lo descrito por Guzmán-Gutiérrez *et al.*, (2012) y Díaz-Cantón, (2018) basado en lo establecido por Porsolt *et al.*, (1977). Para esta prueba se utilizó un cilindro de vidrio (25 cm de alto x 12 cm de diámetro) con agua ($24 \pm 1^\circ$ C) hasta 15 cm de altura. Cada ratón permaneció durante seis minutos dentro del cilindro. Posteriormente se registró el

tiempo de inmovilidad (segundos) de cada ratón durante los últimos cuatro minutos de la prueba. Se determinó que el animal estaba inmóvil cuando solo se observaban los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote. Una disminución del tiempo de inmovilidad del grupo de prueba con respecto al grupo control sugiere una actividad antidepresiva.

6.2. Neurofarmacología de la inhalación del aceite esencial de *Litsea glaucescens*

6.2.1 Preparación de muestras de cerebro. Inmediatamente después de la prueba de nado forzado los ratones se sacrificaron por decapitación y se disectaron los cerebros sobre hielo en dos secciones corteza prefrontal (PFC) e hipocampo (HIP). Los tejidos se depositaron en tubos Eppendorf con buffer RIPA 1X, enriquecido con inhibidores de proteasas (Roche, 4693159001) e inhibidores de fosfatasas (NaF 0.05M, Sigma Aldrich - $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.0084M, Meyer – Glicerol 2-fosfato, 0.0084M, Sigma Aldrich), se homogenizaron durante 2 minutos, se sonicaron durante 1 minuto y se centrifugaron durante 10 minutos a 14 500 rpm. Se colectó el sobrenadante en tubos Eppendorf y se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

6.2.2 Cuantificación de proteínas. En una placa de 96 pozos se realizó una curva de calibración por triplicado con albumina de suero bovino (BSA, 1mg/ml). Para esta técnica se agregaron las siguientes cantidades de BSA: 1.0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μL . De las muestras de corteza prefrontal e hipocampo homogenizadas se prepararon diluciones 1:10 y se agregaron por triplicado 5 μL de la dilución. Posteriormente, a todos los pozos se les agregó 5 μl de agua milli-Q y 250 μL de solución Bradford (BIO-RAD, #5000006), se incubó la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente y se analizó en un espectrofotómetro (VERSA max, Molecular Devices) a una longitud de onda de 595 nm. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes utilizando la ecuación de la recta para determinar la cantidad de proteína a cargar en los geles.

6.2.3 Identificación de la proteína BDNF involucrada en el trastorno depresivo mediante la técnica de western blot

Electroforesis. Se utilizaron geles precast 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ de la marca BIO-RAD (#4561093). Para su montaje se usó el paquete de Bio-Rad, mini-PROTEAN®Tetra Handcast Systems, que incluye la cámara de electroforesis vertical para mini geles de 1mm.

Se agregó a cada muestra el volumen necesario de amortiguador de corrida o buffer laemmli de la marca BIO-RAD cuya composición es glicerol 75%, TRIS-HCL 0.5 M, SDS 10%, azul de bromofenol 0.02% y agua. En cada pozo se corrieron 50 µg de proteína, en el primer carril se colocó el marcador de peso molecular (Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder, LI-COR). Se aplicó un voltaje de 100 volts y se mantuvo constante durante 90 minutos o hasta que el frente de corrida saliera del gel.

Transferencia de proteínas. La transferencia se realizó utilizando un sistema húmedo. Se utilizaron membranas de PVDF (0.45 µm), se activaron durante 1 minuto con metanol y se enjuagaron con buffer de transferencia (Tris-Base (25 mM), glicina (190 mM), metanol (20%), durante 5 minutos. Posteriormente se formó un “sándwich” donde el gel y la membrana se colocaron entre la esponja y el papel (figura 8), todos los elementos se sujetaron firmemente para evitar la formación de burbujas de aire, después se montó a la cámara y se sumergió en el buffer de transferencia. Se aplicó un voltaje de 100 volts durante 90 minutos.



Figura 8. Transferencia húmeda de proteínas.

Bloqueo de membrana. Inmediatamente después de la transferencia se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante utilizando una solución de bloqueo al 5% a base de leche en polvo descremada. Después se lavó 3 veces con PBS [Tris-Base (20mM), NaCl (150mM)], cada lavado tuvo una duración de 5 min.

Incubación de anticuerpos. Se incubó la membrana durante 24 horas a 4 °C con la dilución del anticuerpo primario correspondiente BDNF (abcam, mouse 1:1000, ab108319) y GAPDH (santa-cruz, mouse 1:1000 sc166545) en TBST (Tris-Base (20mM), NaCl (150mM), Tween 20 (0.1%). Posteriormente, se lavaron las membranas tres veces con TBS durante 5 minutos.

Después las membranas se incubaron con la dilución de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (PHR), anti-mouse (Thermo Fisher, 1:4000, 626520) y anti-rabbit (Cell signaling, 1:2000, 7074) en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h. Pasado este tiempo, se lavaron tres veces las membranas con TBS durante 5 minutos.

Revelado de membranas. Para el desarrollo de la señal de BDNF se utilizó el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, 34095) y para las demás proteínas el kit SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, 34579). Se colocaron las membranas con una envoltura de plástico transparente, se agregaron 800 µL de los reactivos y se incubaron durante 5 minutos, pasado este tiempo se retiró el exceso de reactivo y se cubrieron las membranas con el plástico transparente.

Después en un cuarto oscuro, se colocó una película fotográfica sobre la membrana haciendo presión durante 2 a 5 minutos dependiendo de la intensidad de las bandas que se requieran.

Finalmente, cada una de las películas se retiró y se sumergió durante 5 minutos en líquido revelador, después se lavaron abundantemente con agua corriente. A continuación, se colocaron durante 5 minutos en el líquido fijador, y finalmente se lavaron con agua corriente. Posteriormente del secado fueron escaneadas.

Análisis de datos. Con ayuda del programa ImageJ se analizaron las imágenes obtenidas en cada uno de los experimentos independientes. Con del software GraphPad Prism 5 se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes y se graficaron los datos.

6.3 Activación del eje HPA asociado a comportamientos relacionados con el estrés

6.3.1 Colecta de sangre. Después de la prueba de nado forzado, cuando los animales se sacrificaron por decapitación, se colectó una muestra de sangre en tubos de plástico de 4 mL de la marca vacutainer (EDTA-K2). Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 rpm, se recuperó el sobrenadante (plasma) y se almacenaron en tubos Eppendorf a -80 °C hasta su uso.

6.3.2 Cuantificación de corticosterona. Se utilizó el kit de inmunoensayo enzimático de corticosterona DetectX® de la marca Arbor Assays (K014-H1), el cual mide la corticosterona presente en suero o plasma. Las muestras se diluyeron con el reactivo de disociación suministrado en el kit para producir la concentración total del glucocorticoide, se agregaron 50 µL de las muestras o estándares por triplicado, se agregaron 25 µL de DetectX® Corticosterone Conjugate y 25 µL de DetectX® Corticosterone Antibody a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se retiraron los reactivos y los pozos se lavaron con solución de lavado suministrada en el kit, se retiró la solución de lavado y se repitió cuatro veces. Finalmente, se agregaron 100 µL de TMB sustrato a cada pozo, se incubó durante 30 minutos sin agitar y se agregaron 50 µL de Stop solution a cada pozo. Posteriormente se leyó la densidad óptica en un lector de placas a 450 nm.

6.3.3 Análisis estadístico. Los datos se expresaron como media \pm EEM. La prueba de Tukey o Dunnet seguida de ANOVA unidireccional se utilizó para el análisis estadístico utilizando el software GraphPad prism 5. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis químico y actividad biológica del aceite esencial de *Litsea glaucescens*

7.1.1 Análisis químico

Se identificaron 31 compuestos totales presentes en el aceite esencial de *Litsea glaucescens* (laurel) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). El compuesto mayoritario fue eucaliptol (31.06%), seguido de α -pineno (10.96 %), β -pineno (9.05%), γ -terpineno (8.78%), o-cimeno (6.85%), D-limoneno (6.40%), terpinen-4-ol (6.34%), (+)-4-careno (4.08%), α -tujeno (2.37%), β -mirceno (2.25%), linalol (2.39%), acetato de trans-carveilo (2.36%) y δ -terpineol (1.0%) (Cuadro 2). Estos componentes fueron identificados y su porcentaje de abundancia relativa fue determinado de acuerdo con el método descrito por Díaz-Cantón, 2018.

Cuadro 2. Composición del aceite esencial de *Litsea glaucescens* por análisis de CG / EM.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)
α - tujeno	4.97	2.37
α - pineno	5.06	10.96
canfeno	5.24	0.24
β - tujeno	5.51	0.37
β - pineno	5.56	9.05
β - mirceno	5.67	2.25
α - felandreno	5.85	0.16
(+)-4-Careno	5.99	4.08
o-cimeno	6.08	6.85
D-limoneno	6.13	6.40
1, 8-cineol (eucaliptol)	6.17	31.06
β -ocimeno	6.30	0.74
γ -terpineno	6.45	8.78
hidrato de cis-sabineno	6.55	0.21
óxido de cis-linalol (furano)	6.60	0.75
linalol	6.86	2.39
piperitol	7.14	0.08
δ -terpineol	7.61	1.0
terpinen-4-ol	7.72	6.34

Cuadro 2. Continuación

α -terpineol	7.85	0.28
2-metiltetrahidrofurano	8.25	0.14
acetato de óxido de linalol (piranoide)	8.74	0.03
ácido pentanodioico	8.87	0.24
2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimetil-, acetate	9.27	0.06
Acetato de trans-carveilo	9.44	2.36
1,2-benzenediol, o-(4-butylbenzoyl)-o'-(2-metil benzoil)-	9.64	0.05
cariofileno	10.06	0.77
bergamoteno	10.12	0.14
D-amorfeno	10.88	0.20
α -bisaboleno	10.98	0.46

En el cuadro 3, se comparó la cantidad de los tres compuestos de interés obtenidos del aceite esencial de *Litsea glaucescens*: eucaliptol, β -pineno y linalol de la muestra almacenada y de la muestra reciente. Los resultados indican que el aceite almacenado en frío pierde cantidades importantes de compuestos si se mantiene en estas condiciones por más de un año.

Cuadro 3. Modificación de la composición del aceite esencial de *Litsea glaucescens* en función del tiempo.

Compuesto	Ae-2017 ($\mu\text{g/mL}$)	Ae- 2020 ($\mu\text{g/mL}$)
Eucaliptol	428.61	939.53
β -pineno	16.35	47.90
Linalol	27.86	53.73

Ae-2017: Aceite esencial almacenado 2 años a 4°C en un vial ámbar.

Ae-2020: Aceite esencial destilado de hojas recién colectadas y destilado en el mismo año.

7.1.2 Actividad biológica

El aceite esencial de *Litsea glaucescens* presentó actividad ansiolítica. Cuando los ratones fueron sometidos a la prueba de cruz elevada, se observó que los grupos administrados con el aceite esencial, el compuesto β -pineno y el diazepam (1mg/kg p.o), aumentaron significativamente el tiempo en los brazos abiertos en comparación con el control, lo que indica un efecto ansiolítico para ambos tratamientos (figura 9). Con relación a la prueba de campo abierto, ninguno de los tratamientos afectó la actividad motora espontánea de los animales (figura 10) de manera significativa.

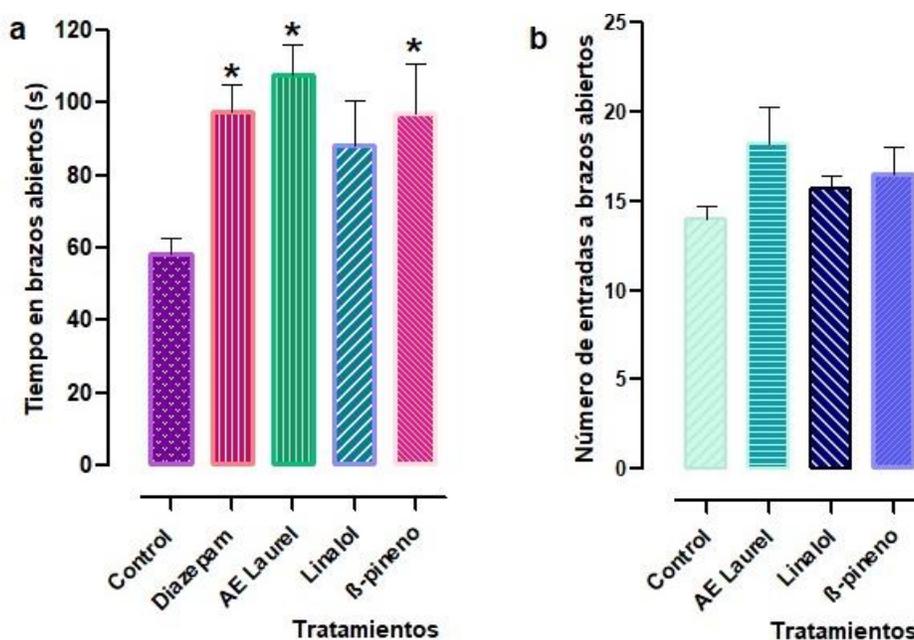


Figura 9. Efecto ansiolítico del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (AE) en ratones sometidos a la prueba de cruz elevada. a) Tiempo en brazos abiertos b) Número de entradas a brazos abiertos. Diazepam 1mg/kg p.o, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y β -pineno 20 μ L. Cada barra representa la $\bar{x} \pm$ EEM con n=5. La diferencia significativa se determinó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

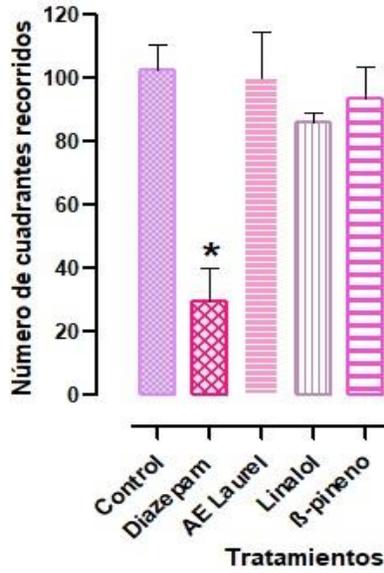


Figura 10. Efecto del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (AE) en ratones sometidos a la prueba de campo abierto. Cada barra representa la $\bar{x} \pm$ EEM con n=5. Diazepam 1mg/kg i.p, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y β -pineno 20 μ L. La diferencia significativa se determinó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

En la prueba de cilindro exploratorio, ninguno de los grupos de prueba evaluados a la misma dosis que en las pruebas anteriores, modificó el número de levantamientos con respecto al control, lo que indica que no muestran efecto sedante (figura 11).

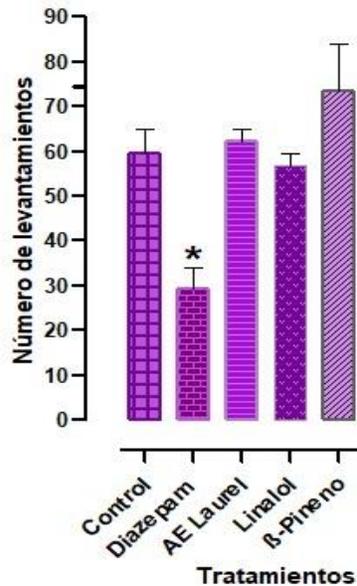


Figura 11. Efecto del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (AE) en ratones sometidos a la prueba de cilindro exploratorio. Cada barra representa la $\bar{x} \pm$ EEM con n=5. Diazepam 1mg/kg p.o, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y β -pineno 20 μ L. La diferencia significativa se terminó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Por último, en la prueba de tablero de orificios ninguna de las sustancias evaluadas modificó el número de exploraciones de los ratones. Si bien el resultado en este modelo determina que no hay efecto ansiolítico (figura 12), tampoco hay una disminución de actividad exploratoria con respecto al control.

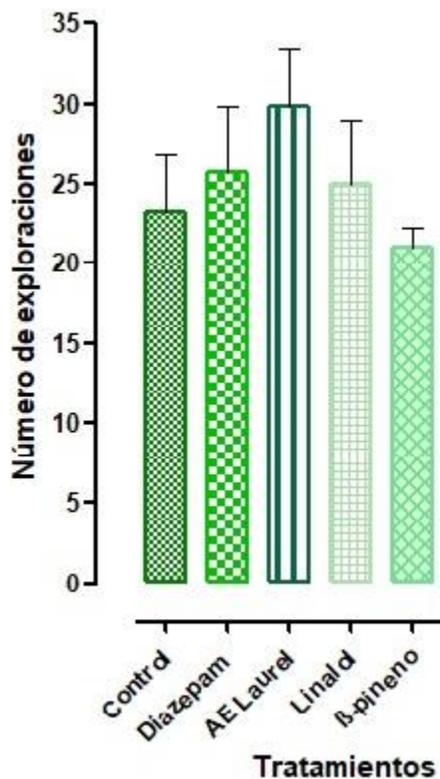


Figura 12. Efecto del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (AE) administrado por vía inhalatoria en ratones sometidos a la prueba de tablero de orificios. Cada barra representa la $\bar{x} \pm EEM$ con $n=5$. Diazepam 1mg/kg p.o, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y β -pineno 20 μ L. La diferencia significativa se terminó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Con respecto a la actividad antidepresiva, en la figura 13, se observó que el aceite esencial (20 μ l) administrado por vía inhalatoria y la imipramina administrada por vía i.p una dosis de 30 mg/kg redujeron el tiempo de inmovilidad de los roedores en el nado forzado comparado con el control inhalatorio. También se observó que el linalol (20 μ l) y la ketamina (3 mg/kg) no presentan efecto antidepresivo en esta prueba con el esquema de administración propuesto. En la prueba de campo abierto que se realizó de manera conjunta con el nado forzado, se observó que el aceite esencial no modifica la actividad motora general de los ratones, lo que

aporta mayor evidencia de que la disminución en el tiempo de inmovilidad producido por el aceite esencial, en la prueba de nado forzado (figura 14), se debe a un efecto antidepresivo.

Por otra parte, el grupo linalol (20 μ l) y ketamina (3 mg/kg) disminuyen significativamente el número de cuadrantes recorridos respecto al grupo control (figura 14). Esto puede indicar que se observa un efecto sedante, que se encuentra reportado para ambas sustancias en la literatura (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012; Matveychuk *et al.*, 2020).

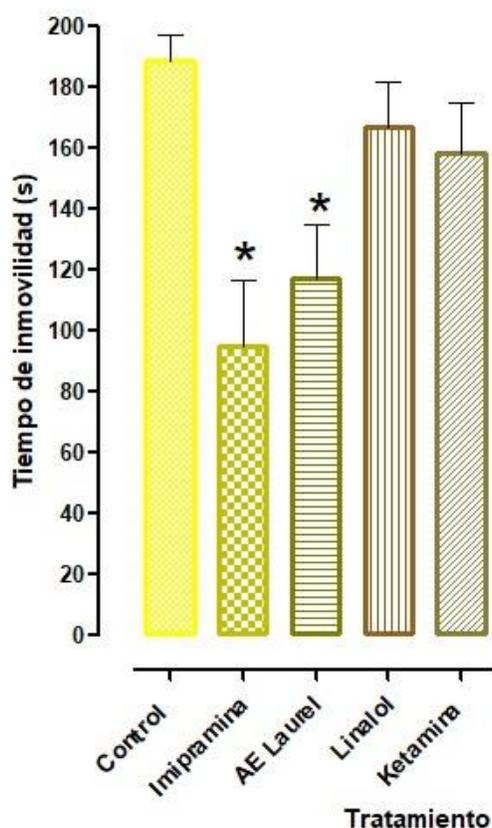


Figura 13. Efecto del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (AE) en ratones sometidos a la prueba de nado forzado. La imipramina control positivo. Imipramina 30 mg/kg, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y ketamina 10 mg/kg. Cada columna representa la $\bar{x} \pm$ EEM (n=10). * La diferencia significativa fue determinada por una prueba ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

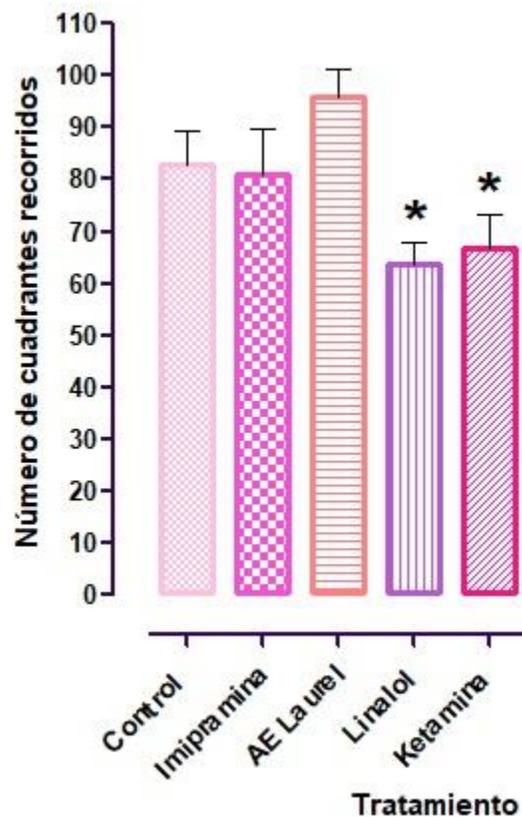


Figura 14. Efecto del aceite esencial de *Litsea glaucescens* en ratones sometidos a la prueba de campo abierto. Imipramina 30 mg/kg, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y ketamina 10 mg/kg. Cada columna representa la $\bar{x} \pm$ EEM (n=10). * La diferencia significativa fue determinada por una prueba ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

7.2 Neurofarmacología de la inhalación del aceite esencial de *Litsea glaucescens*

Los niveles de expresión de BDNF en la corteza prefrontal [figura 15 (A)] e hipocampo [figura 15 (B)], de los ratones administrados con el aceite esencial, linalol, imipramina o ketamina, fueron determinados mediante transferencia de Western blot. Para los tratamientos antes mencionados se realizó una comparación de los niveles de BDNF en ratones que pasaron por la prueba de nado forzado y ratones que no lo hicieron.

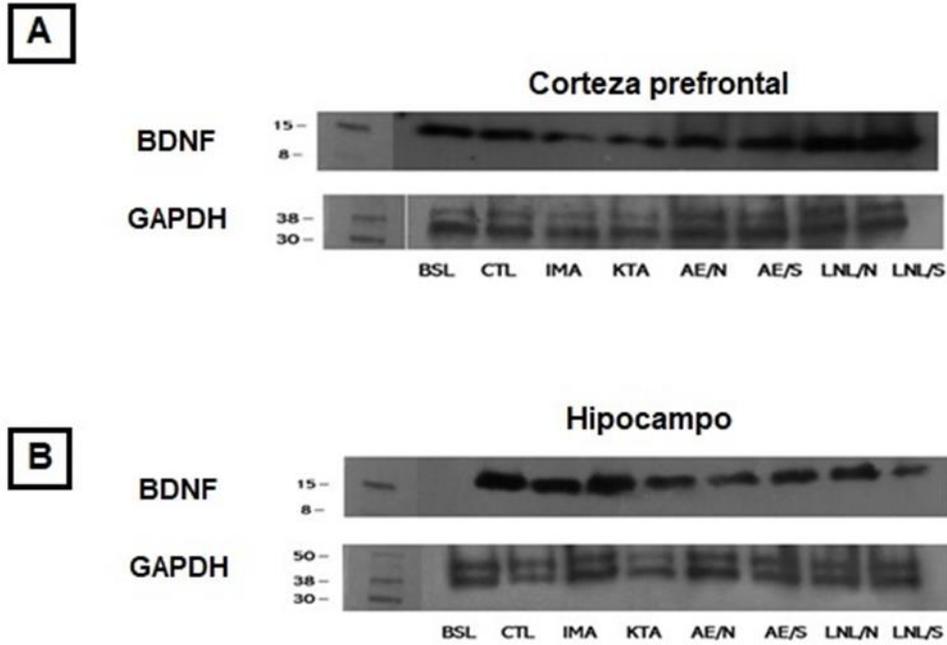


Figura 15. Western blot representativo del factor neurotrófico derivado del cerebro A) corteza prefrontal e B) hipocampo tratado con aceite de *Litsea glaucescens*. GAPDH es la proteína control de carga. BSL: basal, CTL: control, IMA: imipramina, KTA: ketamina, AE/N: aceite de laurel con nado, AE/S: aceite de laurel sin nado, LNL/N: linalol con nado, LNL/S: linalol sin nado.

Nuestros resultados mostraron que en el caso de los ratones que pasaron por el nado forzado, el aceite de laurel mexicano aumenta la expresión de la proteína BDNF significativamente, en la corteza prefrontal [figura 16 (a)] y en el hipocampo [figura 17 (a)]. En ratones que no pasaron por el nado forzado, la expresión de BDNF tiende a aumentar, pero comparado con su control esta diferencia no es estadísticamente significativa [figura 16 (b)] y [figura 17 (b)].

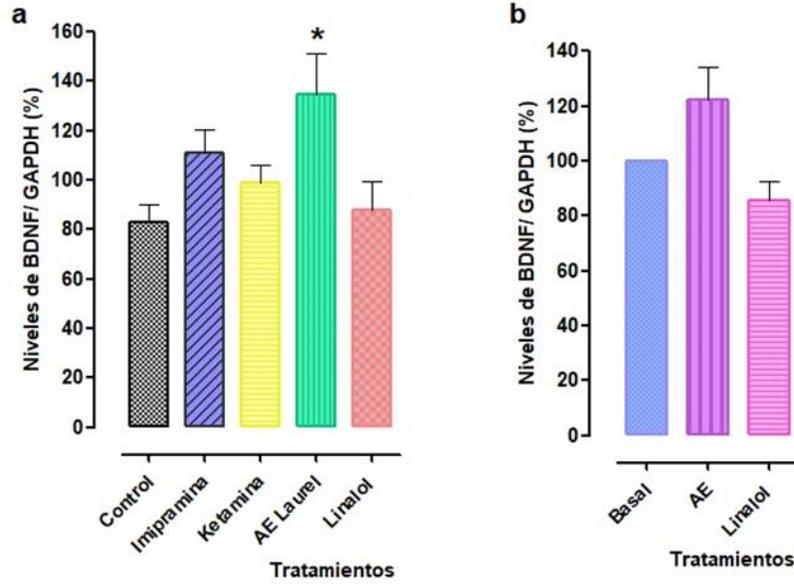


Figura 16. Variación de la expresión de la proteína BDNF en corteza prefrontal de a) ratones sometidos a la prueba de nado forzado b) ratones sin nado forzado. Imipramina 30 mg/kg, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y ketamina 3 mg/kg. La imipramina y la ketamina fueron fármacos controles positivos. Cada columna representa la $\bar{x} \pm$ EEM (n=5). La diferencia significativa se terminó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

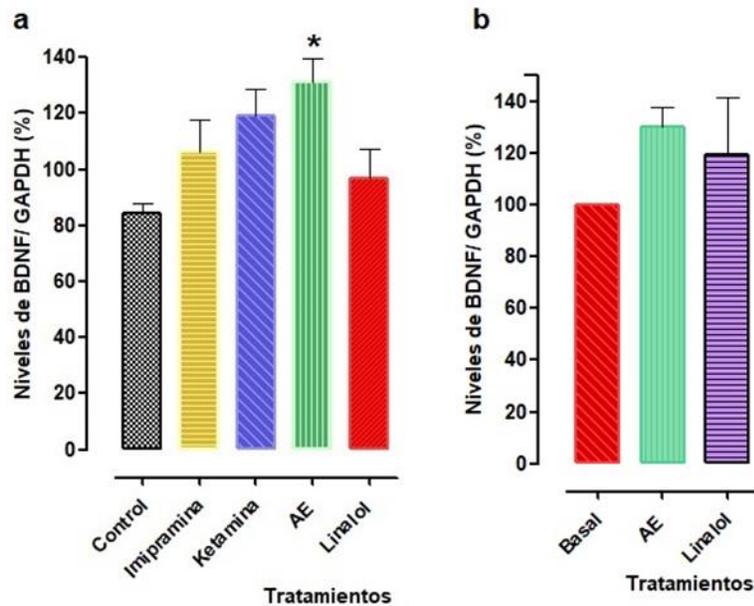


Figura 17. Variación de la expresión de la proteína BDNF en hipocampo de a) ratones sometidos a la prueba de nado forzado b) ratones sin nado forzado. Imipramina 30 mg/kg, AE laurel 20 μ L, linalol 20 μ L y ketamina 3 mg/kg. La imipramina y la ketamina fueron fármacos controles positivos. Cada columna representa la $\bar{x} \pm$ EEM (n=5). La diferencia significativa se terminó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

7.3 Activación del eje HPA asociado a comportamientos relacionados con el estrés

Los niveles de la hormona del estrés, corticosterona aumentaron significativamente en los ratones control sometidos a la prueba de nado forzado, por otro lado, los ratones tratados con imipramina (fármaco control positivo), mostraron niveles reducidos de esta hormona comparado con el grupo control (figura 18).

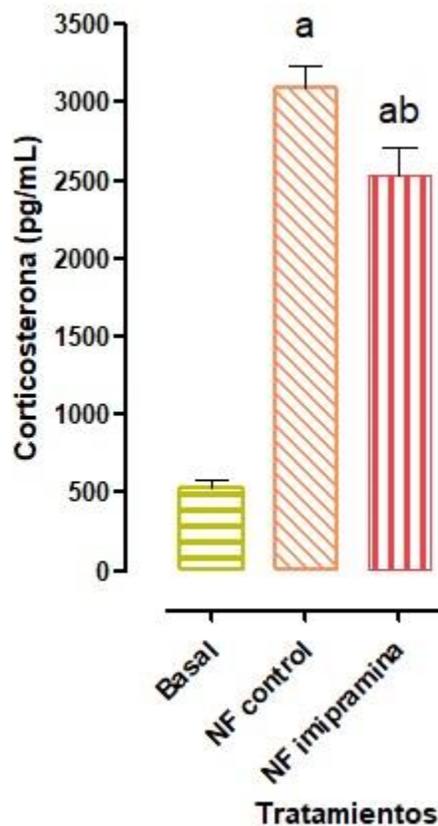


Figura 18. Elevación de los niveles de corticosterona en plasma sanguíneo de ratones sometidos a la prueba de nado forzado. Basal (sin nado forzado), NF control (con nado forzado) e imipramina 30 mg/kg (con nado forzado). La imipramina fue el fármaco control positivo. Cada columna representa la $\bar{x} \pm EEM$ (n=5). **a.** diferencia significativa respecto al basal. **b.** diferencia significativa respecto al NF control. La diferencia significativa se terminó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

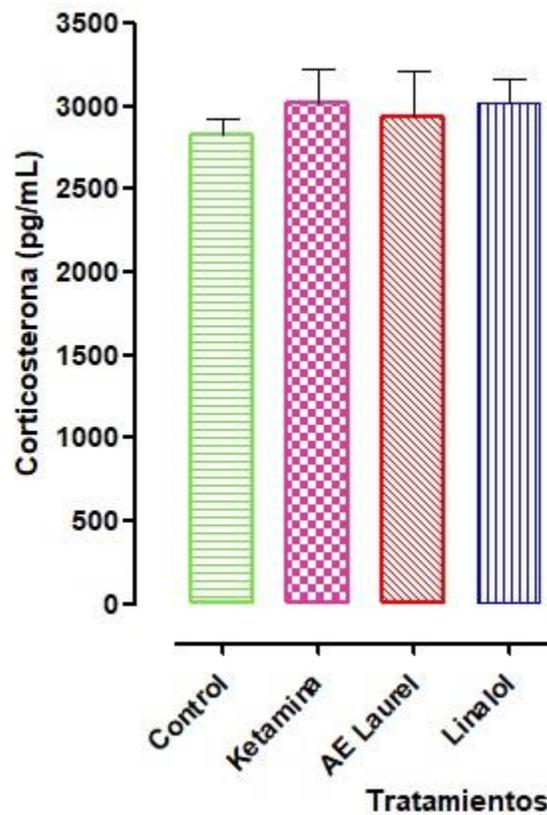


Figura 19. Elevación de los niveles de corticosterona en plasma sanguíneo de ratones sometidos a la prueba de nado forzado. Ketamina 3 mg/kg, AE laurel 20 μ L y linalol 20 μ L. NF; nado forzado, AE; aceite esencial, S/N; sin nado forzado. Cada columna representa la $\bar{x} \pm$ EEM (n=5). La diferencia significativa se terminó con una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En la figura 19, se observa que el fármaco ketamina administrado a una dosis de 3 mg/kg, el aceite esencial de *Litsea glaucescens* y el linalol no redujeron la cantidad de corticosterona presente en el plasma sanguíneo de ratón respecto al control.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Análisis químico y actividad biológica del aceite esencial de *Litsea glaucescens*

8.1.1 Análisis químico

Los aceites esenciales son mezclas complejas, que contienen en su mayoría compuestos orgánicos volátiles biosintetizados por las plantas para su supervivencia. (Loreto *et al.*, 2014; Stevanovic *et al.*, 2020). Estos compuestos en su mayoría son terpenos, específicamente monoterpenos biosintetizados por la vía DOXP (Bergman *et al.*, 2019).

El análisis químico del aceite esencial de *Litsea glaucescens* mostró que el componente mayoritario es el eucaliptol, como se ha reportado en varios estudios realizados por nuestro grupo de investigación. Del mismo modo, se identificó la presencia de β -pineno y linalol, previamente identificados como principios activos.

El aceite esencial después de ser almacenado en un vial ámbar en el refrigerador a 8°C por un tiempo se ve modificada su composición y la cantidad de sus componentes en la mezcla. Por lo tanto, se sugiere que el aceite esencial de laurel se mantenga en un contenedor sellado con nitrógeno para evitar la degradación de los compuestos. Pero, es necesario realizar los experimentos con la finalidad de comprobar que la cantidad de compuestos volátiles no ha sido modificada.

8.1.2 Actividad biológica

Los aceites esenciales, durante siglos se han utilizado por diferentes culturas en el mundo como tratamientos tradicionales para el alivio de diversos padecimientos (Kumari *et al.*, 2019). Recientemente, la demanda de terapias para la recuperación y prevención de enfermedades mentales y neurológicas ha aumentado, entre ellas la depresión y la ansiedad patológica (Villareal *et al.*, 2017).

Una terapia alternativa podría ser la inhalación del aceite esencial de *Litsea glaucescens* (laurel mexicano), del cual se ha demostrado su efecto antidepresivo en ratones sometidos a la prueba de nado forzado por vía i.p. (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012) y por vía inhalatoria (Díaz-Cantón *et al.*, 2018). Además, es importante resaltar que *L. glaucescens* es una especie utilizada en la medicina tradicional en México desde antes de la llegada de los españoles, para el

tratamiento de padecimientos relacionados con el sistema nervioso central. Por lo tanto, el uso de aceite esencial de *L. glaucescens* tiene un sustento científico y tradicional. Por otra parte, actualmente las hojas de laurel principalmente tienen un uso culinario.

En este trabajo se demostró que además de la actividad antidepresiva, el aceite de *Litsea glaucescens* tiene efecto ansiolítico, ya que en la prueba de laberinto de cruz elevada se observó un aumento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos para el grupo que inhaló el aceite (figura 9). También para otras especies de plantas aromáticas, existen estudios preclínicos similares, sobre inhalación de sus aceites esenciales, donde se demuestra su efecto antidepresivo. Por ejemplo, en el 2017 Villareal y colaboradores reportan el efecto antidepresivo del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero), donde se observa la disminución del tiempo de inmovilidad de los ratones sometidos a la prueba de suspensión de cola, pero con cantidades mayores de aceite esencial comparado con el aceite de laurel. Cabe resaltar, que el aceite esencial de romero tiene dentro de sus compuestos mayoritarios β -pineno y linalol (Mohammed *et al.*, 2020), los cuales también están contenidos en el aceite de laurel mexicano. En humanos se ha reportado que el aceite esencial inhalado de *Lavandula angustifolia* (Mill), que tiene entre sus componentes al linalol, es eficaz para disminuir el estado de ánimo deprimido en sujetos sanos (Ogata *et al.*, 2020). Además, en el 2017 se reporta que el masaje con aromaterapia de lavanda reduce significativamente el estrés en mujeres embarazadas (Chen *et al.*, 2017). Otros estudios también han demostrado el efecto ansiolítico de aceites esenciales inhalados en animales de experimentación. Por ejemplo, la inhalación del aceite esencial de *Gardenia jasminoides* (Ellis) aumentó el tiempo que los ratones pasaron en los brazos abiertos respecto al control (Zhang *et al.* 2020). Con respecto a la actividad ansiolítica de aceites esenciales en humanos, se informó que la inhalación durante 20 minutos del aceite esencial de geranio durante 2 días consecutivos disminuyó la ansiedad (Estado-Trait Anxiety Inventory, STAI) en 40 pacientes que sufrieron recientemente infarto agudo de miocardio (Shirzadegan *et al.*, 2017).

En el estudio realizado por Guzmán-Gutiérrez y colaboradores en el 2012, se reporta la falta de actividad ansiolítica en roedores sometidos a la prueba de laberinto de cruz elevado del aceite esencial de *Litsea glaucescens*, sin embargo, la vía de administración utilizada fue la intraperitoneal. Una posible explicación de la diferencia entre los resultados obtenidos entre la vía inhalatoria y la vía intraperitoneal es la siguiente: tras la inhalación en la cavidad nasal, los aceites ingresan al cuerpo y al cerebro a través dos vías paralelas para generar efectos sobre las emociones, la cognición y el comportamiento. La primera vía es a través del sistema olfativo, que detecta los compuestos volátiles y estos llegan al epitelio nasal para unirse a receptores de odorantes acoplados a proteínas G en los cilios de las neuronas olfativas. La activación de estos receptores media la señalización a varios tipos de células lo que resulta en estímulos químicos directos al sistema límbico del cerebro (Chioca *et al.*, 2013; Harvey y Heinbockel, 2018; Aponso *et al.*, 2020). La segunda vía es a través del sistema circulatorio con acceso al cerebro a través de la Barrera Hematoencefálica (BHE). El 80% del aire inhalado entra en el sistema circulatorio a través de una extensa red de capilares sanguíneos localizados en el tejido del revestimiento nasal, así como en la tráquea, los bronquios y los pulmones. De esta manera los compuestos volátiles llegan al sistema circulatorio y tienen la oportunidad de ser absorbidos por el cerebro a través de la BHE, que es permeable a los compuestos volátiles de baja masa molecular como los que se encuentran en los aceites esenciales. De esta manera, los compuestos involucrados en producir el efecto ansiolítico no se ven afectados de la misma manera por los ciclos de absorción y eliminación que con la administración sistémica. Por otra parte, utilizando la vía de administración inhalatoria se elimina el peligro de intoxicación aguda y las consecuencias patológicas en órganos y tejidos que los terpenos y cetonas pudieran generar (Bardal *et al.*, 2011; Epriliati y Ginjom, 2012; Takahashi *et al.*, 2012; Sileniesks *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2015a; Aponso *et al.*, 2020).

Finalmente, es preferible la administración inhalada de aceites esenciales por la seguridad y los beneficios que ofrece esta administración, además de la ventaja

que ofrece la rapidez con que se pueden obtener sus efectos farmacológicos (Manion y Widder, 2017).

Adicionalmente, en este trabajo se demostró que el aceite esencial bajo el esquema de administración utilizado por vía inhalatoria no provoca actividad sedante, no afectan la actividad motora en los ratones y no afecta la actividad exploratoria, utilizando los modelos de campo abierto, cilindro exploratorio y tablero de orificios, respectivamente.

La prueba de laberinto de cruz elevado, se considera el estándar de oro para evaluar los comportamientos de tipo ansiogénico (Bourin, 2020), pero hay otros modelos de comportamiento en animales para generar y medir la ansiedad y con el tiempo han aumentado. Asimismo, existen pruebas basadas en la capacidad de una rata para explorar un nuevo territorio, por ejemplo, el campo abierto, cilindro de exploración y el tablero de orificios, sin embargo, estas pruebas se consideran que no son lo suficientemente específicas para medir un comportamiento ansioso, ya que dentro del comportamiento de exploración hay otros factores involucrados como los cambios en la actividad general y/o motivación exploratoria, no obstante, pueden utilizarse como pruebas complementarias para eliminar la conducta relacionada con la psico-estimulación (Labots *et al.*, 2015; Bourin, 2020).

Sin embargo, el linalol puro no presentó efecto antidepresivo por vía inhalatoria lo cual podría deberse a tres razones: a) con el tiempo de exposición utilizado se saturaron los receptores, b) el linalol tiene efecto en forma sinérgica, pues en el aceite esencial se encuentra mezclado con otros compuestos como el β -pineno y/o, c) la cantidad de linalol no fue la adecuada.

Por otra parte, hay otros grupos de investigación que han corroborado la actividad antidepresiva del linalol administrado por vía intraperitoneal (Coelho *et al.*, 2013; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2015).

Por otra parte, la ketamina a la dosis administrada de 10 mg/kg no presentó efecto antidepresivo bajo el esquema de administración propuesto al ser administrada en tres ocasiones previas a la prueba de nado forzado, pero si disminuyó la actividad motora espontánea. En comparación, otros autores reportan el efecto antidepresivo con una sola inyección del fármaco (Fitzgerald *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2021). Asimismo, se ha descrito que las propiedades farmacológicas de la ketamina podrían estar mediadas por factores neuroendocrinos ya que se ha demostrado que los ratones hembra responden mejor a la ketamina, lo que sugiere que las hormonas sexuales como el estrógeno y la progesterona afectan el efecto de este fármaco (Carrier y Kabbaj, 2013; Fitzgerald *et al.*, 2021). Por otra parte, hay otro estudio en donde se reporta que a la dosis de 10 mg/kg la ketamina no presenta actividad antidepresiva y que este efecto puede estar relacionado con el estrés que genera el manejo y administración de los animales antes de la prueba de nado forzado (Fitzgerald *et al.*, 2019).

8.2 Neurofarmacología de la inhalación del aceite esencial de *Litsea glaucescens*

El desarrollo de la terapia farmacológica para la depresión se ha basado en la teoría de la desregulación monoaminérgica (Bétry *et al.*, 2015), pero con el paso de los años se han propuesto otras teorías centradas en la deficiencia de los factores neurotróficos, como el BDNF (Capibaribe *et al.*, 2019) en áreas específicas de la red límbica prefrontal, incluida la corteza orbitofrontal, la corteza cingulada anterior y posterior, la ínsula, la amígdala, el hipocampo y el tálamo (Zhang *et al.*, 2019a).

El BDNF es uno de los factores neurotróficos mejor estudiados del SNC, se une al receptor TrkB dimerizándolo provocando que los residuos de tirosina se autofosforilen. El complejo BDNF/TrkB desencadena vías de señalización asociadas con la activación del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la fosfolipasa C gamma (PLC- γ) y Ras GTP-asa (González *et al.*, 2016; Colucci-D'Amato *et al.*, 2020). Por lo que, si existe un cambio en la eficiencia de la secreción o en el transporte de esta proteína, afecta la activación de estas vías de señalización que son importantes en los mecanismos de diferenciación neuronal, el crecimiento

dendrítico, la reparación, la supervivencia y la plasticidad sináptica (Liu *et al.*, 2019; Colucci-D'Amato *et al.*, 2020). Sin embargo, la expresión de BDNF podría reestablecerse mediante la administración de sustancias antidepresivas (Zhang *et al.*, 2019c).

En este estudio, se determinó que en ratones CD1 machos sometidos a nado forzado, los niveles de BDNF en corteza prefrontal e hipocampo no se modificaron de manera significativa en comparación con los niveles de proteína de ratones que no pasaron por la prueba. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Schulte-Herbrüggen y colaboradores (2012), quienes demostraron que los niveles de BDNF en la corteza prefrontal, hipocampo y estriado no se alteran en ratones después del estrés del nado.

Con respecto a los resultados con imipramina, antidepresivo tricíclico, este fármaco no aumentó los niveles de BDNF de manera significativa respecto al control. En otros estudios, utilizando diferentes modelos de depresión (prueba de suspensión de cola y estrés libre impredecible, CUMS) en ratones, observaron el mismo resultado (Shieh *et al.*, 2008; Schulte-Herbrüggen *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2016; Rafalo-Ulińska *et al.*, 2020), sin embargo, hay otros estudios que reportan que, si bien no aumentan los niveles de BDNF, ayuda a que no disminuyan debido al estrés producido por las pruebas conductuales de depresión (Su *et al.*, 2016). En este trabajo, debido a que el nado forzado *per se* no produjo una disminución significativa del BDNF, no podemos referirnos a un efecto protector.

Por otro lado, los informes de cambios en la proteína BDNF en el cerebro después de la administración de la ketamina aguda son mixtos, algunos muestran aumentos (Duncan *et al.*, 2013; Haile *et al.*, 2014), mientras que otros no presentan cambios (Machado-Vieira *et al.*, 2009; Rybakowski *et al.*, 2013; Le-Nedelec *et al.*, 2018) o bien, el efecto es dependiente de la dosis como informó Reus y colaboradores en el 2011, donde 5 mg/kg de ketamina aumentó BDNF en la corteza prefrontal y en el hipocampo, pero la dosis de 10 mg/kg no mostró cambios en las mismas regiones cerebrales.

Nuestros resultados no muestran un cambio significativo en los niveles de BDNF en la corteza prefrontal y en el hipocampo después de la administración de ketamina i.p. (3 mg/kg) y son consistentes con los hallazgos donde no muestran un cambio en el factor neurotrófico del cerebro; por lo tanto, varios factores como las dosis de ketamina, la vía de administración, la región cerebral y el momento del ensayo de BDNF después de la administración del fármaco, pueden contribuir a los efectos variables de la ketamina sobre los niveles de BDNF en el cerebro (Le-Nedelec *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019c). Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de la administración de la ketamina en diferentes regiones del cerebro nos permitirá contribuir a mejorar la práctica clínica y la investigación sobre nuevas aplicaciones para el tratamiento con ketamina (Zhang *et al.*, 2019c).

Recientemente ha surgido el interés por evaluar los efectos terapéuticos de los productos naturales, principalmente derivados de plantas, en trastornos mentales como la depresión (Vasconcelos *et al.*, 2015; Capibaribe *et al.*, 2019). En el presente estudio, se observa que el grupo tratado con aceite esencial aumentó la liberación y expresión de la proteína BDNF en la corteza prefrontal e hipocampo de los ratones sometidos a nado forzado, una prueba estresante. Estos resultados concuerdan con otros hallazgos que muestran que productos derivados de plantas pueden regular al alza los niveles de BDNF en cerebro de ratones estresados. Por ejemplo, la inhalación de limoneno (Zhang *et al.*, 2019b), la ingesta del timol (Capibaribe *et al.*, 2019) y la administración i.p. de piperina [*Piper nigrum* (Linneo)] y *Piper longum* (Linneo)] (Mao *et al.*, 2014). Estos hallazgos sugieren que el efecto positivo sobre la expresión de BDNF puede ser parte de los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos de los aceites esenciales (Caputo *et al.*, 2016). Por lo tanto, el aceite de laurel mexicano podría considerarse una herramienta terapéutica para el tratamiento de la depresión en aromaterapia en el futuro, sin embargo, se necesitan aún más estudios para corroborar estos hallazgos.

Los datos generados en esta investigación son importantes en el escenario actual donde la depresión, desafortunadamente, es una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo y el trastorno psiquiátrico con más frecuente, comparado con otros padecimientos relacionados al sistema nervioso central (Marcinkiewicz y Devine, 2015; OMS, 2017).

8.2.1 Proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB)

La proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB) de 43 kDa, se localiza en el núcleo, y actúa como un factor de transcripción (Steven y Seliger, 2016). Se ha establecido que CREB, participa en la plasticidad sináptica, el desarrollo neurológico (Fujino *et al.*, 2009), la supervivencia neuronal (Alberini, 2009) y la neurogénesis (Landeira *et al.*, 2016; Kitagawa *et al.*, 2017).

Los estudios de estructura primaria muestran que la secuencia de longitud completa de CREB podría dividirse en cuatro dominios funcionales: (1) dominio de actividad transcripcional basal Q1, que interactúa con la proteína de unión TATA y promueve la transcripción genética, (2) dominio inducible por quinasa (KID) compuesto por tres regiones, Ser¹²⁹, Ser¹³³ y Ser¹⁴², donde la fosforilación de cualquier región activa a CREB, (3) un dominio Q2 rico en glutamina para la activación constitutiva; y 4) una región básica / dominio de cremallera de leucina (bZIP) que forma un homodímero y es responsable de la unión al ADN (Xu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017) (Figura 20).

CREB es un sustrato de varias quinasas, y aunque la fosforilación de CREB puede ocurrir en diferentes residuos de serina, la fosforilación en Ser¹³³ es esencial para reclutar los coactivadores (CBP y p300) y formar el complejo de transcripción activo (Sakamoto *et al.*, 2011; Steven y Seliger, 2016). Las quinasas que participan en la fosforilación del residuo SER¹³³ incluyen a PKA, Akt, proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa dependiente de calcio / calmodulina II (CaMKII), p90 ribosomal S6 quinasa (p90RSK), (Lonze y Ginty, 2002), proteína quinasa activada por mitógeno (ERK) y glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK3) (Wen *et al.*, 2010; Trinh *et al.*, 2013). Después de la fosforilación en Ser¹³³ y el reclutamiento de cofactores, CREB puede unirse a una secuencia de CRE en la

región promotora de genes aguas abajo implicados en la plasticidad sináptica, incluidos genes como BDNF (figura 21).

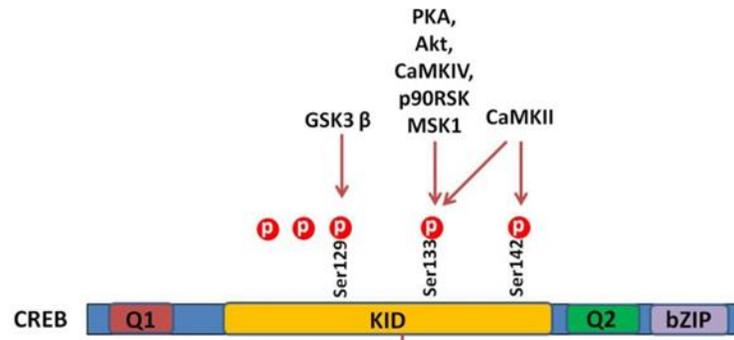


Figura 20. Estructura primaria de CREB (Tomado de Wang *et al.*, 2018).

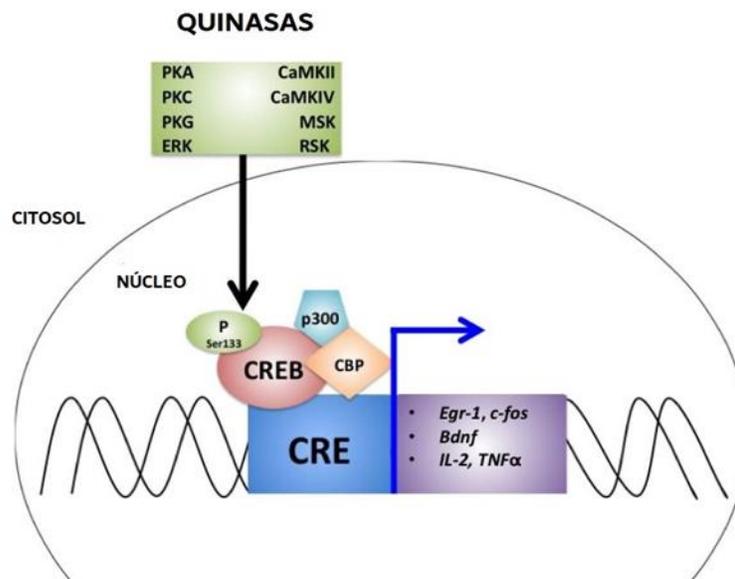


Figura 21. Unión de CREB a la secuencia de DNA (CRE) que promueve la transcripción de genes implicados en la plasticidad sináptica. Un proceso que da como resultado la expresión de genes impulsados por CRE que se consideran importantes para la formación de la memoria y la plasticidad sináptica. Egr-1, c-fos, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Tomado y editado de Bartolotti y Lazarov, 2019).

8.2.2 Estudios preclínicos de CREB en el desarrollo de la depresión

Se ha demostrado que la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) es uno de los factores de transcripción mejor estudiados implicados en la depresión (Jiang *et al.*, 2017). En el 2016, Zeng y colaboradores informaron que la fluoxetina podría activar la vía de señalización de la proteína quinasa A (PKA)-CREB y regular al alza los niveles de CREB fosforilada (pCREB), ya que observaron en un modelo celular de “depresión” inducido con corticosterona, que la fluoxetina promovía la fosforilación de CREB.

Los estudios que utilizan modelos de estrés crónico en roedores muestran actividad reducida de CREB (Gronli *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2013b), sin embargo, se ha demostrado que la administración crónica pero no aguda de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), aumenta la actividad de CREB y su activador río arriba PKA (Pinnock *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2012). También, se demostró en ratas que la expresión de ARNm de CREB se redujo en el grupo de estrés crónico impredecible (CUS) en comparación con el grupo control, y que el tratamiento crónico con sertralina a 10 mg/kg aumentó significativamente en el ARNm de CREB en comparación con el grupo CUS (Wang *et al.*, 2017).

La vía de señalización CREB / BDNF juega un papel importante en el desarrollo de trastornos nerviosos y emocionales, siendo estos descubrimientos evidencia de que CREB ejerce un efecto protector y de supervivencia neuronal contra la depresión (Zeng *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017).

8.2.3 Estudios clínicos de la participación de CREB en el desarrollo de la depresión

Se ha encontrado que los sistemas de transducción de señal intracelular cerebral están alterados en pacientes con diferentes enfermedades psiquiátricas, incluidos los trastornos del estado de ánimo (Ren *et al.*, 2011; Rafa-zablocka *et al.*, 2018). En un estudio *post mortem*, se demostró que la vía ERK está alterada en cerebros de personas con depresión, ya que encontraron niveles significativamente reducidos de varias proteínas involucradas en la vía ERK, como CREB, resultados comparados respecto al grupo de pacientes control sanos (Yuan *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2017). En otro estudio se reportó la disminución de la expresión de la

proteína CREB en neutrófilos de pacientes con depresión libre de tratamientos antidepresivos (Ren *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que en los pacientes que usan antidepresivos, los niveles de expresión de CREB en el hipocampo se encuentran elevados en comparación con pacientes sin tratamiento (Dowlatshahi *et al.*, 1998; Dwivedi *et al.*, 2003; Ortega-Martínez, 2015).

8.2.4 Plantas medicinales con actividad antidepresiva que regulan CREB

El azafrán, una especia que se ha utilizado durante más de 2500 años, es una hierba eficaz para el tratamiento de la depresión en China e Irán. De acuerdo con varios estudios recientes, se ha demostrado que el extracto acuoso de azafrán (*Crocus spp.*) aumenta los niveles de ARNm de CREB, así como la fosforilación en el hipocampo de rata (Behravanfar *et al.*, 2017; Razavi *et al.*, 2017; Asrari *et al.*, 2018).

En otro estudio, Ruan y colaboradores en el 2019, reportaron que el aceite esencial de *Gardenia jasminoides* administrado por vía intragástrica, aumenta en el hipocampo la expresión de CREB, p-CREB y PKA totales.

El extracto etanólico de las hojas de *Dipterocarpus alatus* (p.o.) inhibió la disminución de la expresión de ARNm de CREB y p-CREB en la corteza prefrontal e hipocampo, en ratones, producido en el modelo de estrés leve crónico impredecible (CUMS) (Daodee *et al.*, 2019).

Las evidencias descritas anteriormente, sugieren que los productos naturales pueden incidir en la regulación de las vías de señalización de PKA / CREB / BDNF logrando efectos antidepresivos (Yi *et al.*, 2014).

8.3 Activación del eje HPA asociado a comportamientos relacionados con el estrés

La disfunción del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), es un factor de riesgo en el desarrollo de trastornos relacionados con el estrés, como la depresión o la ansiedad, y es considerado un objetivo de estudio importante para la prevención y el tratamiento de la depresión (Wang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018).

A su vez, se ha demostrado que varios antidepresivos clásicos, disminuyen los niveles de corticosterona en roedores (Li *et al.*, 2014; Ramírez y Sheridan, 2016; Berk *et al.*, 2020) y humanos (Antonili *et al.*, 2012; Schatzberg, 2015; Leistner y Menke, 2018), en particular, el antidepresivo tricíclico, imipramina revierte la respuesta anormal de estrés conductual y neuroendocrino (aumento de corticosterona) en experimentos *in vivo* (Solomon *et al.*, 2014; Ramírez y Sheridan, 2016; Berk *et al.*, 2020). En este sentido, los resultados de este estudio demuestran que la prueba de nado forzado aumenta significativamente los niveles de corticosterona en el plasma sanguíneo de roedores, y que el antidepresivo imipramina, disminuye la cantidad de este glucocorticoide significativamente comparado con su control.

Un mecanismo putativo por el cual los antidepresivos, como la imipramina modulan la secreción aberrante de glucocorticoides es mediante la acción de dos tipos de receptores: el receptor de mineralocorticoides (MR) y el de glucocorticoides (GR) (Solomon *et al.*, 2014). Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, que unidos a sus ligandos actúan como factores de transcripción (Gulyaeva *et al.*, 2019). Tanto los MR como los GR tienen un papel importante en el control inhibitorio y regulador del eje HPA. La expresión de MR depende de las fluctuaciones circadianas de los receptores plasmáticos de glucocorticoides en el estado fisiológico normal, mientras que el aumento asociado al estrés en los niveles de corticosterona plasmática se asocia con una mayor ocupación de los GR (Anacker *et al.*, 2011). Por tanto, se cree que los GR son más importante en la regulación de la respuesta al estrés cuando los niveles endógenos de glucocorticoides son elevados (Pariante y Miller, 2001). Mientras que los MR juegan un papel importante en el mantenimiento de los niveles basales de corticosterona (Gupta y Morley, 2014).

En este contexto, los tratamientos antidepresivos podrían aumentar el ARNm y la función de los GR, así como de los MR, lo que puede mejorar la retroalimentación negativa del eje HPA, y por lo tanto disminuir los niveles de corticosterona en el organismo (Calfa *et al.*, 2003; Anacker *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta la fecha no hay ningún fármaco específico dirigido a los

componentes del eje HPA que esté aprobado, ni ninguna prueba que se utilice habitualmente en el entorno clínico para identificar a los pacientes para un tratamiento tan específico (Menke, 2019).

En la literatura existen múltiples estudios donde extractos (Gao *et al.*, 2019; Upadhyay *et al.*, 2016; Berk *et al.*, 2020) y aceites esenciales (Villareal *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021) derivados de plantas disminuyen los niveles plasmáticos de corticosterona en roedores, en el presente estudio bajo nuestras condiciones experimentales, la inhalación del aceite esencial de *Litsea glaucescens* no disminuye los niveles plasmáticos de esta hormona. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los compuestos presentes en el aceite no tienen efecto sobre la expresión y función de los GR y los MR, por lo que la actividad del eje HPA incrementada por el estrés inducido por la prueba de nado forzado no se disminuyó.

IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye que:

1. El aceite esencial de *Litsea glaucescens* inhalado tiene actividad antidepresiva en roedores sometidos a la prueba de nado forzado.
2. El aceite esencial de *Litsea glaucescens* inhalado tiene actividad ansiolítica en roedores sometidos a la prueba de laberinto de cruz elevado.
3. El aceite esencial no afecta la actividad motora espontánea ni produce sedación.
4. El aceite esencial de *Litsea glaucescens* ejerce un efecto positivo sobre la liberación y expresión de BDNF en la corteza prefrontal e hipocampo de cerebro de ratón.
5. El aceite esencial de *Litsea glaucescens* no disminuye los niveles de corticosterona en suero sanguíneo de ratón inducidos por el estrés de la prueba de nado forzado.

9.1 Conclusión general

Los resultados de este trabajo sugieren que los efectos antidepresivo y ansiolítico que induce el aceite esencial de *Litsea glaucescens* inhalado en roedores, están relacionados a la cascada de señalización que desencadena la liberación y expresión de BDNF.

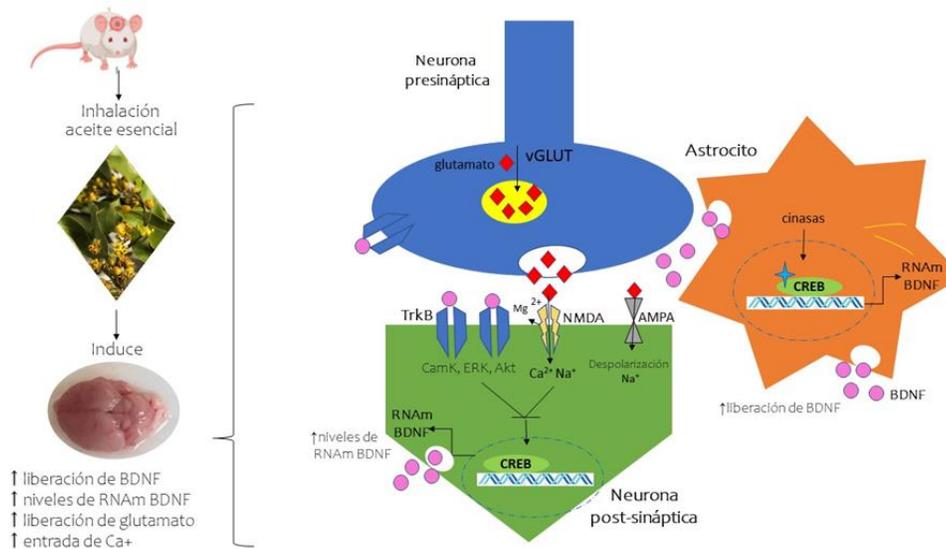


Figura 22. Hipótesis de la cascada de señalización que desencadena la inhalación del aceite esencial en roedores. 1) El BDNF se une y activa el receptor TrkB tanto en la célula presináptica como en la postsináptica. 2) En la célula presináptica la unión de BDNF a TrkB aumentará la liberación del neurotransmisor glutamato, que, al unirse a los receptores AMPA, permiten la entrada de sodio y la apertura de los receptores NMDA por el cambio en la concentración interna de sodio en la célula, esto provoca una entrada masiva de calcio que activa la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (CaMK), que posteriormente en el núcleo activará a CREB. 3) En la célula postsináptica, cuando el BDNF se acopla a su receptor activará cascadas moleculares (PI3K, MAPK, PLCr) que a su vez activarán proteínas cinasas como AKT, ERK y CaMK, las cuales serán las encargadas de fosforilar en el núcleo a CREB y así aumentar la expresión de RNAm de BDNF y otras proteínas encargadas de la supervivencia neuronal, neurogénesis, ramificación dendrítica y mejoramiento de la sinapsis.

X. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la actividad ansiolítica del compuesto β -pineno presente en el aceite esencial de *Litsea glaucescens*.
2. Realizar experimentos de detección de proteínas (western blot) CREB y pCREB para confirmar que son parte del mecanismo de acción del efecto antidepresivo del aceite esencial de *Litsea glaucescens* administrado por vía inhalatoria.
3. Realizar estudios de ELISA que confirmen que el aceite esencial de *Litsea glaucescens* no reduce la hiperactividad del eje HPA en suero de ratones.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberini, C.M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89(1), 121–145.
- Allen, A.P., Naughton, M., Dowling, J., Walsh, A., Ismail, F., Shorten, G., Scott, L., McLoughlin, D.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G. (2015). Serum BDNF as a peripheral biomarker of treatment-resistant depression and the rapid antidepressant response: a comparison of ketamine and ECT. *Journal Affective Disorders*, 186, 306–311.
- Anacker, C., Zunszain, P.A., Carvalho, L.A., Pariante, C.M. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 415–425.
- Antonioli, M., Rybka, J., Carvalho, L.A. (2012). Neuroimmune endocrine effects of antidepressants. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 8, 65-83.
- Aponso, M., Patti, A., Bennett, L.E. (2020). Dose-related effects of inhaled essential oils on behavioural measures of anxiety and depression and biomarkers of oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 250, 112469.
- Archer, J. (1973). Test for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behaviour*, 21(2), 205-235.
- Argueta-Villamar, A., Cano-Asseleih, L.M., Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Asrari, N., Yazdian-Robati, R., Abnous, K., Razavi, B.M., Rashednia, M., Hasani, F. V., Hosseinzadeh, H. (2018). Antidepressant effects of aqueous extract of saffron and its effects on CREB, P-CREB, BDNF, and VGF proteins in rat cerebellum. *Journal of Pharmacopuncture*, 21(1), 35.
- Autry, A.E., Adachi M., Nosyreva, E., Na, Los, M.F., Cheng, P., Kavalali, E.T., Lisa Monteggia, M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475, 91–95.

- Aydemir, O., Deveci, A., Taneli, F. (2005). The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(2), 261-265.
- Ayuob, N.N., El Wahab, M.G.A., Ali, S.S., Abdel-Tawab, H.S. (2018). Ocimum basilicum improve chronic stress-induced neurodegenerative changes in mice hippocampus. *Metabolic Brain Disease*, 33(3), 795–804
- Ayuob, N.N., Firgany, A.E.L., El-Mansy, A.A., Ali, S. (2017). Can Ocimum basilicum relieve chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice?. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(2), 153–161.
- Bardal, S.K., Waechter, J.E., Martin, D.S. (2011). Chapter 2 Pharmacokinetics. *Applied pharmacology. Philadelphia, Content Repository Only*, 17-34.
- Bartolotti, N., Lazarov, O. (2019). CREB signals as PBMC-based biomarkers of cognitive dysfunction: a novel perspective of the brain-immune. *Axis. Brain, Behavior, and Immunity*, 78, 9-20.
- Behravanfar, N., Abnous, K., Razavi, B.M., Hosseinzadeh, H. (2017). Effects of crocin on spatial memory impairment induced by hyoscine and its effects on BDNF, CREB, and p-CREB protein and mRNA levels in rat hippocampus. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12, e64315.
- Belleau, E.L., Treadway, M.T., Pizzagalli, D.A. (2019). The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology. *Biological psychiatry*, 85(6), 443-453.
- Belvederi M.B., Pariante, C, Mondelli, V., Masotti, M., Atti, A.R., Mellacqua, Z., Antonioli, M., Ghio, L., Menchetti, M., Zanetidou, S., Innamorati, M., Amore, M. (2014). HPA axis and aging in depression: systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 41 46–62
- Bergman, M.E., Davis, B., Phillips, M.A. (2019). Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. *Molecules*, 24(21), 3961.

- Berk, A., Yılmaz, İ., Abacıoğlu, N., Kaymaz, M.B., Karaaslan, M.G., Kuyumcu-Savan, E. (2020). Antidepressant effect of *Gentiana olivieri* Griseb. in male rats exposed to chronic mild stress. *Libyan Journal of Medicine*, 15(1), 1725991.
- Bétry, C., Overstreet, D., Haddjeri, N., Pehrson, A.L., Bundgaard, C., Sanchez, C., Mørk, A. (2015). A 5-HT₃ receptor antagonist potentiates the behavioral, neurochemical and electrophysiological actions of an SSRI antidepressant. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 131, 136-142.
- Blackburn, TP. (2019). Depressive disorders: Treatment failures and poor prognosis over the last 50 years. *Pharmacology research and perspectives*, 7(3), 472
- Bourin, M. (2020). Experimental anxiety model for anxiety disorders: Relevance to drug discovery. *Anxiety Disorders*, 169-184.
- Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Miller, H.L., Charney, D.S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *American Journal of Psychiatry*, 157(1), 115–118.
- Brummelte, S., Galea, L.A. (2010). Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. *Hormones and Behavior*, 58(5), 769–779.
- Brunoni, A.R., Machado-Vieira, R., Zarate, C.A. Jr., Vieira, E.L., Vanderhasselt, M.A., Nitsche, M.A., Valiengo, L. Benseñor, I.M., Lotufo, P.A., Gattaz, W.F., Teixeira, A.L. (2014). BDNF plasma levels after antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation: results from a factorial, randomized, sham-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, 24(7), 1144–1151
- Calfa, G., Kademian, S., Ceschin, D., Vega, G., Rabinovich, G.A., Volosin, M. (2003). Characterization and functional significance of glucocorticoid receptors in patients with major depression: modulation by antidepressant treatment. *Psychoneuroendocrinology*, 28(5), 687-701.

- Cao, W., Duan, J., Wang, X., Zhong X., Hu, Z., Huang, F., Wang, H., Zhang, J., Li, F., Zhang, J., Luo, X., Li, C. (2014). Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 265, 76–83
- Capibaribe, V.C.C., Vasconcelos Mallmann, A.S., Lopes, I.S., Oliveira, I.C.M., de Oliveira, N.F., Chaves, R.D.C., de Sousa, F.C.F. (2019). Thymol reverses depression-like behaviour and upregulates hippocampal BDNF levels in chronic corticosterone-induced depression model in female mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(12), 1774-1783.
- Caputo, L., Reguilon, M.D., Miñarro, J., De Feo, V., Rodriguez-Arias, M. (2018). Lavandula angustifolia essential oil and linalool counteract social aversion induced by social defeat. *Molecules*, 23(10), 2694.
- Caputo, L., Souza, L.F., Alloisio, S., Cornara, L., De Feo, V. (2016). Coriandrum sativum and Lavandula angustifolia essential oils: Chemical composition and activity on central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1999.
- Caraci, F., Leggio, G.M., Salomone, S., y Drago F. (2017) . New drugs in psychiatry: focus on new pharmacological targets. *F1000Research*, 6, 397.
- Carrier, N., Kabbaj, M. (2013). Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology*, 70, 27-34.
- Chávez-Castillo, M., Nuñez, V., Nava, M., Ortega, A., Rojas, M., Bermúdez, V. y Rojas-Quintero, J. (2019). Depression as a neuroendocrine disorder: emerging neuropsychopharmacological approaches beyond monoamines. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, vol. 2019, 20.
- Chen, P.J., Chou, C.C., Yang, L., Tsai, Y.L., Chang, Y.C., Liaw, J.J. (2017). Effects of aromatherapy massage on pregnant women's stress and immune function: A longitudinal, prospective, randomized controlled trial. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 23(10), 778-786.

- Chenxia, H., Feng, L., Simin, T., Yan, L. Huai, X., Xiumei, W., Weiyue, Z., Wei Z. Meng, M. (2018). Beneficial effect of compound essential oil inhalation on central fatigue. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 18(1), 309–318.
- Chioca, L.R., Antunes, V.D., Ferro, M.M., Losso, E.M., Andreatini, R. (2013). Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. *Life Sciences*, 92(20-21), 971-975.
- CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades (2018, septiembre). Estandarización mundial de la información de diagnóstico en el ámbito de la salud. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
- Ciriaco, M., Ventrice, P., Russo, G., Scicchitano, M., Mazzitello, G., Scicchitano, F., Russo, E. (2013). Corticosteroid-related central nervous system side effects. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4(1), S94–S98.
- Coelho, V., Mazzardo-Martins, L., Martins, D.F., Santos, A.R.S., da Silva Brum, L. F., Picada, J. N., Pereira, P. (2013). Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. *Journal of Natural Medicines*, 67(4), 876-880.
- Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7777.
- Conrad, P., Adams, C. (2012). The effects of clinical aromatherapy for anxiety and depression in the high-risk postpartum woman--a pilot study. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18(3), 164- 168.
- Costanian, C., Christensen, R.A.G., Edgell, H., Ardern, C.I., Tamim, H. (2017). Factors associated with complementary and alternative medicine use among women at midlife. *Climacteric*, 20, 421–426.
- Dai, W., Feng, K., Sun, X., Xu, L., Wu, S., Rahmand, K., Jia D. Han, T. (2022). Natural products for the treatment of stress-induced depression: Pharmacology, mechanism and traditional use. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114692.

- Dale, E., Bang-Andersen, B. y Sánchez, C. (2015). Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. *Biochemical Pharmacology*, 95(2), 81–97.
- Daodee, S., Monthakantirat, O., Ruengwinitwong, K., Gatenakorn, K., Maneenet, J., Khamphukdee, C., Kijjoa, A. (2019). Effects of the ethanol extract of *Dipterocarpus alatus* leaf on the unpredictable chronic mild stress-induced depression in ICR mice and its possible mechanism of action. *Molecules*, 24(18), 3396.
- De Sousa, D.P., Silva, R.H.N., Da Silva, E.F. y Gavioli, E.C. (2017). Essential oils and their constituents: an alternative source for novel antidepressants. *Molecules*, 22(8), 1290.
- Deinhardt, K., Chao, M.V. (2014). Shaping neurons: long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. *Neuropharmacology*, 76(Part C), 603–609.
- Díaz-Cantón J.K. 2018. Estudio temporal de la composición química de *Litsea glaucescens* y evaluación de la actividad biológica de sus volátiles. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Dobetsberger, C., Buchbauer, G. (2011). Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(5), 300–316.
- Dong, C., Zhang, J.C., Yao, W., Ren, Q., Ma, M., Yang, C., Chaki, S., Hashimoto, K. (2017). Rapid and Sustained Antidepressant Action of the mGlu2/3 Receptor Antagonist MGS0039 in the Social Defeat Stress Model: Comparison with Ketamine. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(3), 228–236.
- Dowlathshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T. (1998). Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *The Lancet*, 352(9142), 1754-1754.
- Dwivedi, Y., Rao, J.S., Rizavi, H.S., Kotowski, J., Conley, R.R., Roberts, R.C., Pandey, G.N. (2003). Abnormal expression and functional characteristics of cyclic

adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Archives of General Psychiatry*, 60(3), 273-282.

Duman, R.S., Monteggia, L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1116–1127.

Duncan, Jr., W.C., Sarasso, S., Ferrarelli, F., Selter, J., Riedner, B.A., Hejazi, N.S., Zarate Jr, C.A. (2013). Concomitant BDNF and sleep slow wave changes indicate ketamine-induced plasticity in major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(2), 301-311.

Dutta, A., McKie, S., Deakin, J.W. (2015). Ketamine and other potential glutamate antidepressants. *Psychiatry research*, 225(1-2), 1-13.

Edelmann, E., Lessmann, V., Brigadski, T. (2014). Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 76(Pt C), 610–627.

Epriliati, I., Ginjom, I.R. (2012). Bioavailability of phytochemicals. *Phytochemicals-a global perspective of their role in nutrition and health*, Rao V, ed., InTech, Rijeka, Croatia, 401-428.

Esteyneffer, J. (1978). *Florilegio Medicinal*. M.C. Anzures y Bolaños, ed. 6. México City: Academia Nacional de Medicina.

Fibler, M., Quante, A.A. (2014). Case series on the use of lavender oil capsules in patients suffering from major depressive disorder and symptoms of psychomotor agitation, insomnia and anxiety. *Complementary Therapies in Medicine*, 22, 63–69.

Fitzgerald, P.J., Yen, J.Y., Watson, B.O. (2019). Stress-sensitive antidepressant-like effects of ketamine in the mouse forced swim test. *PLoS One*, 14(4), e0215554.

Fitzgerald, P.J., Kounelis-Wuillaume, S.K., Gheidi, A., Morrow, J.D., Spencer-Segal, J.L., Watson, B.O. (2021). Sex-and stress-dependent effects of a single injection of ketamine on open field and forced swim behavior. *The International Journal on the Biology of Stress*, 1-9.

- FDA. Food and Drug Administration (2019, mayo) approves new nasal spray medication for treatment-resistant depression; available only at a certified doctor's office or clinic. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm632761.htm>
- Freitas, A.E., Egea, J., Buendia, I., Navarro, E., Rada, P., Cuadrado, A., Rodrigues, A.L., Lopez, M.G. (2015). Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. *Molecular Neurobiology*, 51, 1504–1519.
- Fujino, H., Kitaoka, Y., Hayashi, Y., Munemasa, Y., Takeda, H., Kumai, T., Kobayashi, S, Ueno, S. (2009). Axonal protection by brain-derived neurotrophic factor associated with CREB phosphorylation in tumor necrosis factor- α -induced optic nerve degeneration. *Acta Neuropathologica*, 117(1), 75–84.
- Füzesi, T., Daviu, N., Cusulin, J.I.W., Bonin, R.P., Bains, J.S. (2016). Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nature Communications*, 7, 11937.
- Gao, C., Kong, S., Guo, B., Liang, X., Duan, H., Li, D. (2019). Antidepressive Effects of Taraxacum officinale in a Mouse Model of Depression Are Due to Inhibition of Corticosterone Levels and Modulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 (Mkp-1) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) Expression. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 389.
- Géral, C, Angelova, A, Lesieur, S. (2013). From molecular to nanotechnology strategies for delivery of neurotrophins: emphasis on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmaceutics*, 5(1), 127–167.
- Gerhard, D.M., Wohleb, E.S., Duman, R.S. (2016). Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discovery Today*, 21(3), 454–464.
- Giacobbo, B.L., Doorduyn, J., Klein, H.C., Dierckx, R.A., Bromberg, E., y de Vries, E.F. (2019). Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation. *Molecular neurobiology*, 56(5), 3295-3312.

- Gökçe, E., Güneş, E., y Nalçacı, E. (2019). Effect of Exercise on Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A BDNF Focused Approach. *Archives of Neuropsychiatry*, 56(4), 302-310.
- Gold, P.W. (2015). The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 32-47.
- González, A., Moya-Alvarado, G., Gonzalez-Billaut, C., Bronfman, F. C. (2016). Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton*, 73(10), 612-628.
- Gonzalez, D. y Alvarez, M. (2017). Depression in Mexico: Stigma and its Policy Implications. *Yale Global Health Review*, 4(1), 13-16.
- Gronli, J., Bramham, C., Murison, R., Kanhema, T., Fiske, E., Bjorvatn, B., Portas, C.M. (2006). Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(4), 842-849.
- Gulyaeva, N. V. (2019). Biochemical mechanisms and translational relevance of Hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response. *Biochemistry (Moscow)*, 84(11), 1306-1328.
- Guo, H., Cheng, Y., Wang, C., Wu, J., Zou, Z., Niu, B., Yu, H, Wang, H, Xu, J. (2017). FFPM a PDE4 inhibitor, reverses learning and memory deficits in APP/PS1 transgenic mice via cAMP/PKA/CREB signaling and anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology*, 116, 260–269.
- Guo, W., Nagappan, G., Lu, B. (2018). Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling. *Developmental Neurobiology*, 78, 647–659.
- Gupta, D., Morley, J.E. (2014). Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Comprehensive Physiology*, 4(4), 1495-1510.
- Guzmán-Gutiérrez, S.L., Gómez-Cansino, R., García-Zebadúa, J.C., Jiménez-Pérez, N.C. y Reyes-Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of Litsea glaucescens essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 673-679.

- Guzmán-Gutiérrez, S.L., Bonilla-Jaime, H., Gómez-Cansino, R. y Reyes-Chilpa, R. (2015). Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life sciences*, 128, 24-29.
- Haile, C.N., Murrough, J.W., Losifescu, D.V., Chang, L.C., Al Jurdi, R.K., Foulkes, A., Mathew, S.J. (2014). Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(2), 331-336.
- Harvey, J.D., Heinbockel, T. (2018). Neuromodulation of synaptic transmission in the main olfactory bulb. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2194.
- Hashimoto, K. (2019). Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A historical overview and future perspective. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(10), 613-627.
- Henckens, M.J., Deussing, J.M., Chen, A. (2016). Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 17, 636–651.
- Henson, J.B., Brown, C.L., Chow, S.C., Muir, A.J. (2017). Complementary and alternative medicine use in united states adults with liver disease. *Journal of clinical gastroenterology*, 51(6), 564–570.
- Hernández, F. (1959). Historia de las plantas de la Nueva España. Obras completas, 2. Universidad Autónoma de México. Imprenta Universitaria.
- Himanshu, Dharmila, Sarkar D., Nutan. (2020). A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 18(3), 341-351.
- Hinz, M., Stein, A., Uncini, T. (2012). The discrediting of the monoamine hypothesis. *International Journal of General Medicine*. 5, 135–142.
- Hocayen, P.A.S., Wendler, E., Vecchia, D.D., Kanazawa, L.K.S., Issy, A.C., Del Bel, E., Andreatini, R. (2019). The nitrenergic neurotransmission contributes to the anxiolytic-

like effect of Citrus sinensis essential oil in animal models. *Phytotherapy Research*, 33(4), 901–909.

Holmes, S.E., Scheinost, D., Finnema, S.J., Naganawa, M., Davis, M.T., DellaGioia N, Nabulsi, N., Matuskey, D., Angarita, G.A., Pietrzak, R.H., Duman R.S., Sanacora, G., Krystal, J.H., Carson, R.E., y Esterlis I. (2019). Lower synaptic density is associated with depression severity and network alterations. *Nature Communication*, 10:1529.

Holsen, L.M., Lancaster, K., Klibanski, A., Whitfield-Gabrieli, S., Cherkerzian, S., Buka, S., Goldstein, J.M. (2013). HPA-axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression. *Neuroscience*, 250, 733-742.

Holz, A., Mülsch, F., Schwarz, M.K., Hollmann, M., Döbrössy, M.D., Coenen, V.A., Serchov, T. (2019). Enhanced mGlu5 signaling in excitatory neurons promotes rapid antidepressant effects via AMPA receptor activation. *Neuron*, 104(2), 338-352.

Hu, Y., Wu, D.L., Luo, C.X., Zhu, L.J., Zhang, J., Wu, H.Y., Zhu, D.Y. (2012). Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), 14224–14229.

Huang, X., Luo, Y.L., Mao, Y.S., Ji, J.L. (2017). The link between long noncoding RNAs and depression. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 73, 73-78.

Huang, Y., Coupland, N.J., Lebel, R.M., Carter, R., Seres, P., Wilman, A.H., Malykhin, N.V. (2013). Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*, 74(1), 62-68.

Hwang, E., Shin, S. (2015). The effects of aromatherapy on sleep improvement: a systematic literature review and meta-analysis. *Journal of Alternative Complementary Medicine*, 21(2):61–68.

- Jeon, S.W., y Kim, Y.K. (2016). Molecular Neurobiology and Promising New Treatment in Depression. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 381.
- Jiang, H., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, H., Li, J., Yang, X., Yu, Q., Liang X, Li X, Shi, P, Bao, T. (2017). Mechanisms underlying the antidepressant response of acupuncture via PKA/CREB signaling pathway. *Neural Plasticity*, 2017, 4135164.
- Jiménez-Pérez, N., Lorea-Hernández, F.G., Jankowski, C.K., Reyes-Chilpa, R. (2011). Essential Oils in Mexican Bays (*Litsea* spp., Lauraceae): Taxonomic Assortment and Ethnobotanical Implications. *Economic Botany*, 65(2), 178-189.
- Juruena, M.F. (2014). Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy and Behavior*, 38, 148-59.
- Kagawa, D., Jokura, H., Ochiai, R., Tokimitsu, I., Tsubone, H. (2003). The sedative effects and mechanism of action of cedrol inhalation with behavioral pharmacological evaluation. *Planta Medica*, 69, 637–641.
- Kasper, S., Volz H.P., Dienel, A., Schläfke, S., (2015). Efficacy of Silexan in mixed anxiety depression a randomized, placebo-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, 26(2), 331- 40.
- Kim, Y.K., Na, K.S. (2016). Role of glutamate receptors and glial cells in the pathophysiology of treatment-resistant depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 70, 117-126.
- Kim, Y.H., Im, A., Park, B.K., Paek, S.H., Choi, G., Kim, Y.R., Lee, M.Y. (2018). Antidepressant-Like and Neuroprotective Effects of Ethanol Extract from the Root Bark of *Hibiscus syriacus* L. *BioMed Research International*, 2018.
- Kishimoto, T., Chawla, J.M., Hagi, K., Zarate, C.A., Kane, J.M., Bauer, M., Correll, C.U. (2016). Single-dose infusion ketamine and non-ketamine N-methyl-d-aspartate receptor antagonists for unipolar and bipolar depression: a meta-analysis of efficacy, safety and time trajectories. *Psychological medicine*, 46(7), 1459–1472.
- Kitagawa, H., Sugo, N., Morimatsu, M., Arai, Y., Yanagida, T., Yamamoto, N. (2017). Activity-dependent dynamics of the transcription factor of cAMP-response

element binding protein in cortical neurons revealed by single-molecule imaging. *Journal of Neuroscience*, 37(1), 1–10.

Knorr, U., Vinberg, M., Kessing, L. V., Wetterslev, J. (2010). Salivary cortisol in depressed patients versus control persons: a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 35(9), 1275-1286.

Kordjazy, N., Haj-Mirzaian, A., Amiri, S., Ostadhadi, S., Amini-Khoei, H., Dehpour, A.R. (2016). Involvement of N-methyl-d-aspartate receptors in the antidepressant-like effect of 5-hydroxytryptamine 3 antagonists in mouse forced swimming test and tail suspension test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 141, 1-9.

Krishnan, V., Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455, 894-902.

Kumari, P., Luqman, S., Meena, A. (2019). Application of the combinatorial approaches of medicinal and aromatic plants with nanotechnology and its impacts on healthcare. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1), 475-489.

Labots, M., Van Lith, H.A., Ohl, F., Arndt, S.S. (2015). The modified hole board-measuring behavior, cognition and social interaction in mice and rats. *Journal of Visualized Experiments: Journal of Visualized Experiments*, (98), e52529.

Landeira, B.S., Santana T.T., Araujo J.A., Tabet E.I., Tannous B.A., Schroeder T., Costa, M.R. (2016). Activity-independent effects of CREB on neuronal survival and differentiation during mouse cerebral cortex development. *Cereb. Cortex*, 28(2), 537–548.

Lang, U.E., Borgwardt, S. (2013). Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 31(6), 761–777

Lee, K.B., Cho, E., Kang, Y.S. (2014). Changes in 5-hydroxytryptamine and cortisol plasma levels in menopausal women after inhalation of clary sage oil. *Phytotherapy Research*, 28, 1599–1605.

Leistner, C., Menke, A. (2018). How to measure glucocorticoid receptor's sensitivity in patients with stress-related psychiatric disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 91, 235-260.

- Le-Nedelec, M., Glue, P., Winter, H., Goulton, C., Broughton, L., Medicott, N. (2018). Acute low-dose ketamine produces a rapid and robust increase in plasma BDNF without altering brain BDNF concentrations. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(3), 780-786.
- Lepack, A.E., Fuchikami, M., Dwyer, J.M., Banasr, M., Duman, R.S. (2014). BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. *The international Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1), pyu033.
- Levy, M. J., Boulle, F., Steinbusch, H.W., van den Hove, D.L., Kenis, G., Lanfumey, L. (2018). Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression. *Psychopharmacology*, 235(8), 2195-2220.
- Li, B., Zhao, J., Lv, J., Tang, F., Sun, Z., Wang, L., Cui, R. (2014). Additive antidepressant-like effects of fasting with imipramine via modulation of 5-HT₂ receptors in the mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 199-206.
- Li, H., Li, Y., Zhang, X., Ren, G., Wang, L., Li, J., Huang, X. (2021). The combination of Aquilaria sinensis (Lour.) Gilg and Aucklandia costus Falc. volatile oils exerts antidepressant effects in a CUMS-induced rat model by regulating the HPA Axis and levels of neurotransmitters. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2523.
- Lillehei, A.S., Halcon, L.L. (2014). A systematic review of the effect of inhaled essential oils on sleep. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 20(6), 441-451.
- Liu, B., Liu, J., Wang, M., Zhang, Y., y Li, L. (2017). From serotonin to neuroplasticity: evolution of theories for major depressive disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(305), 1-9.
- Liu, J., Zhu, H.X., Fu, W.L., Xu, X.W., Yang, J.Z., Dai, D., Li, Y. (2019). Downregulated hippocampal expression of brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B in a rat model of comorbid epilepsy and depression. *Neurological Research*, 41(5), 437-445.

- Lonze, B.E., Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of transcription factors of the CREB family in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605–623.
- López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M.J., Jäger, A.K. (2017). Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 280.
- Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J.P., Turlings, T.C. (2014). Plant volatiles and the environment. *Plant, Cell and Environment*, 37(8), 1905-1908.
- Lu, B., Nagappan, G., Guan X., Nathan, P.J., Wren, P. (2013a). BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 14, 401–416.
- Lu, B., Nagappan, G., y Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. Neurotrophic Factors. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 220. Springer, Berlin, Heidelberg. 223-250.
- Lu, J., Liang, J., Wang, J.R., Hu, L., Tu, Y., Guo, J.Y. (2013b). Acupuncture activates ERK-CREB pathway in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 469765.
- Lu, Y., Ho, C.S., McIntyre, R.S., Wang, W., Ho, R.C. (2018). Agomelatine-induced modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat hippocampus. *Life sciences*, 210, 177-184.
- Luberto, C.M., White, C., Sears, R.W., Cotton, S. (2013). Integrative medicine for treating depression: an update on the latest evidence. *Current Psychiatry Reports*, 15, 391.
- Machado-Vieira, R., Yuan, P., Brutsche, N., Diaz-Granados, N., Luckenbaugh, D., Manji, H.K., Zarate Jr, C.A. (2009). Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 70(12), 1662-1666.
- Maguire J., Mody I. (2016). Behavioral deficits in juveniles mediated by maternal stress hormones in mice. *Neural Plasticity*, 2016, 2762518.

- Maguire, J. (2019). Neuroactive steroids and GABAergic involvement in the neuroendocrine dysfunction associated with major depressive disorder and postpartum depression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 83.
- Malcolm, B.J., Tallian K. (2018). Essential oil of lavender in anxiety disorders: Ready for prime time? *The Mental Health Clinician*, 7(4), 147–155.
- Malcolm, B. J., Tallian, K. (2017). Essential oil of lavender in anxiety disorders: Ready for prime time?. *Mental Health Clinician*, 7(4), 147-155.
- Malykhin, N.V., Carter, R., Seres, P., Coupland, N.J. (2010). Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: contributions of disease and treatment. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 35(5), 337-343.
- Malykhin, N.V., Coupland N.J. (2015). Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder. *Neuroscience*, 309, 200-213.
- Manion, C.R., Widder, R.M. (2017). Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 74(9), e153-e162.
- Mao, Q.Q., Huang, Z., Ip, S.P., Xian, Y.F., Che, C.T. (2012). Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats. *Behavioural Brain Research*, 227(1), 305-309.
- Mao, Q.Q., Huang, Z., Zhong, X.M., Xian, Y.F., Ip, S.P. (2014). Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. *Neurochemistry international*, 74, 36-41.
- Marcinkiewicz, C.A., y Devine, D.P. (2015). Modulation of OCT3 expression by stress, and antidepressant-like activity of decynium-22 in an animal model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 131, 33-41.
- Marosi, K., Mattson, M.P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 25(2), 89–98.
- Mathew, S. J., Manji, H. K. y Charney, D. S. (2008). Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 33(9). 2080–2092.

- Matveychuk, D., Thomas, R.K., Swainson, J., Khullar, A., MacKay, M.A., Baker, G. B., Dursun, S.M. (2020). Ketamine as an antidepressant: overview of its mechanisms of action and potential predictive biomarkers. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 10, 2045125320916657.
- McDonnell, B., Newcomb, P.J. (2019). Trial of Essential Oils to Improve Sleep for Patients in Cardiac Rehabilitation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 25(12), 1193-1199.
- McLean, C.P., Asnaani, A., Litz, B.T., Hofmann, S.G., (2011). Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *Journal of Psychiatric Research*, 45(8), 1027- 1035.
- Medina-Mora, M.E., Borges, G., Lara, C., Benjet, C., Blanco, J., Fleiz, C., Villatoro, J., Rojas, E. y Zambrano, J. (2005). Prevalence, service use, and demographic correlates of 12-month DSM-IV psychiatric disorders in Mexico: results from the Mexican National Comorbidity Survey. *Psychological Medicine*, 35(12), 1773-1783.
- Menke, A. (2019). Is the HPA axis as target for depression outdated, or is there a new hope?. *Frontiers in psychiatry*, 10, 101.
- Mitre, M., Mariga, A., Chao, M.V. (2017). Neurotrophin signalling: Novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical Science*, 31, 13–23.
- Moda-Sava, R.N., Murdock, M.H., Parekh, P.K., Fetcho, R.N., Huang, B.S., Huynh, T.N., Witztum, J., Shaver, D.C., Rosenthal, D.L., Alway, E.J., Lopez, K., Meng, Y., Nellissen, L., Grosenick, L., Milner, T.A., Deisseroth, K., Bito, H., Kasai, H., Liston, C. (2019). Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science*, 364(6436)
- Moghaddam, M., Mehdizadeh, L., (2017). Chapter 13 - chemistry of essential oils and factors influencing their constituents, *Soft Chemistry and Food Fermentation*, Academic Press, 379–419.
- Mohammed, H.A., Al-Omar, M.S., Mohammed, S.A., Aly, M.S., Alsuqub, A.N., Khan, R.A. (2020). Drying Induced Impact on Composition and Oil Quality of Rosemary Herb, Rosmarinus Officinalis Linn. *Molecules*, 25(12), 2830.

- Murray, E.A., Wise, S.P., Drevets, W.C. (2011). Localization of dysfunction in major depressive disorder: Prefrontalcortex and amygdala. *Biological Psychiatry*, 69(12), 43–54.
- Nagahara, A.H., Tuszynski, M.H. (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 209–219.
- Nagai, K., Nijima A., Horii, Y., Shen, J., Tanida, M. (2014). Olfactory stimulatory with grapefruit and lavender oils change autonomic nerve activity and physiological function. *Autonomic Neuroscience*, 185, 29- 35.
- NCCIH. National Center for Complementary and Integrative Health (2018, mayo). Complementary, Alternative, or Integrative Health: What's In a Name? <https://nccih.nih.gov/health/integrative-health>
- Naziroğlu, M., Kozlu, S., Yorgancıgil, E., Uğuz, A.C., Karakuş, K. (2013). Rose oil (from *Rosa x damascena* mill.) vapor attenuates depression-induced oxidative toxicity in rat brain. *Journal of Natural Medicines*, 67(1), 152–158.
- Newport, D.J., Carpenter, L.L., McDonald, W.M. (2015). Ketamine and other NMDA antagonists: Early clinical trials and possible mechanisms in depression. *The American Journal Psychiatry*, 172, 950–966.
- NICE. National Institute for Clinical Excellence (2004) Depression: management of depression in primary and secondary care (National Clinical Practice Guideline No 23). NICE, London
- Nguyen, L., Lucke-Wold, B.P., Logsdon, A.F., Scandinaro, A.L., Huber, J.D., Matsumoto, R.R. (2016). Behavioral and biochemical effects of ketamine and dextromethorphan relative to its antidepressant-like effects in Swiss Webster mice. *NeuroReport*, 27(14), 1004.
- Numakawa, T., Adachi, N., Richards, M., Chiba, S., Kunugi, H. (2013). Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system. *Neuroscience*, 239, 157–172.

- Numakawa, T., Odaka, H., y Adachi, N. (2018). Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3650.
- O'Brien, F.E., Dinan, T.G., Griffin, B.T., y Cryan, J.F. (2012). Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood–brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 289-312.
- Ogata, K., Ataka, K., Suzuki, H., Yagi, T., Okawa, A., Fukumoto, T., Asakawa, A. (2020). Lavender Oil Reduces Depressive Mood in Healthy Individuals and Enhances the Activity of Single Oxytocin Neurons of the Hypothalamus Isolated from Mice: A Preliminary Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5418586.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2017, marzo). Depression. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2013, mayo). 66 Asamblea Mundial de la Salud. Ginebra, 20-27 de mayo de 2013. Resoluciones y decisiones. https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA66-REC1/A66_REC1-sp.pdf
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2017, abril). Depresión y otros trastornos mentales comunes. Estimaciones sanitarias mundiales. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34006/PAHONMH17005-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2018, abril). Salud mental: Fortalecer nuestra respuesta. Datos y cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mental-health-strengthening-our-response>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2020, abril). Depresión. Datos y cifras. Consultado 24 de abril de 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2020, abril). Los servicios de salud mental se están viendo perturbados por la COVID-19 en la mayoría de los países, según un

estudio de la OMS. <https://www.who.int/es/news/item/05-10-2020-covid-19-disrupting-mental-health-services-in-most-countries-who-survey>

- Ortega-Martínez, S. (2015). A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 46.
- Panja, D., Bramham, C.R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 76(Pt C), 664–676.
- Pariante, C.M., Lightman, S.L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 464-468.
- Pariante, C.M., Miller, A.H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry*, 49(5), 391-404.
- Park, S., Park, K.S., Ko, Y.J., Lee, B.Y., Yang, H.S., Park, H.J., Park, D.H. (2012). The effects of aroma inhalation therapy on fatigue and sleep in nurse shift workers. *Journal East-West Nursing Research*, 18(2), 66–73.
- Park, H.J., Lim, E.J., Zhao, R.J., Oh, S.R., Jung, J.W., Ahn, E.M., Lee, E.S., Koo, J.S., Kim, H.Y., Chang, S., Shim, H.S., Kim, K.J., Gwak, Y.S., Yang, C.H. (2015). Effect of the fragrance inhalation of essential oil from Asarum heterotropoides on depression-like behaviors in mice, *Complementary and Alternative Medicine*, 15, 43.
- Pavlovicova, M., Lacinova, L. y Dremencov, E. (2015). Cellular and molecular mechanisms underlying the treatment of depression: focusing on hippocampal G-protein-coupled receptors and voltage-dependent calcium channels. *General Physiology and Biophysics*, 34, 353-66.
- Pereira, V.S., Hiroaki-Sato, V.A. (2018). A brief history of antidepressant drug development: from tricyclics to beyond ketamine. *Acta Neuropsychiatrica*, 30(6), 307-322.
- Pérez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Romero-López-Alberca, C., González-Saiz, F., Mico, J. A. y Berrocoso, E. (2019). Monoaminergic system and depression. *Cell and Tissue Research*, 1-7.

- Pham, T.H., Mendez-David, I., Defaix, C., Guiard, B.P., Tritschler, L., David, D.J., Gardier, A.M. (2017). Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice. *Neuropharmacology*, 112(Pt A), 198-209.
- Phelps, E.A., LeDoux, J.E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, 48(2), 175-187.
- Phillips, C. (2017). Brain-derived neurotrophic factor, depression, and physical activity: making the neuroplastic connection. *Neural plasticity*, 2017, 7260130.
- Pinnock, S.B., Blake, A.M., Platt, N.J., Herbert, J. (2010). The roles of BDNF, pCREB and Wnt3a in the latent period preceding activation of progenitor cell mitosis in the adult dentate gyrus by fluoxetine. *Plos one*, 5(10), e13652.
- Pitta, S., Augustine, B.B., Kasala, E.R., Sulakhiya, K., Ravindranath, V., Lahkar, M. (2013). Honokiol reverses depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels induced by chronic corticosterone injections in mice. *Pharmacognosy Journal* 5, 211-215.
- Pittenger, C., Duman, R.S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1): 88-109.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 229(2), 327-336.
- Price, J.L., Drevets, W.C. (2012). Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. *Trends in Cognitive. Sciences*, 16(1), 61–71.
- Qadeer, S., Emad, S., Perveen, T., Yousuf, S., Sheikh, S., Sarfaraz, Y., Sadaf, S., Haider, S. (2018). Role of ibuprofen and lavender oil to alter the stress induced psychological disorders: A comparative study. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 1603–1608.
- Racagni, G., Popoli, M. (2008). Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 10(4), 385-400.

- Rafał-Ulińska, A., Poleszak, E., Szopa, A., Serefko, A., Rogowska, M., Sowa, I., Nowak, G. (2020). Imipramine influences body distribution of supplemental zinc which may enhance antidepressant action. *Nutrients*, 12(9), 2529.
- Rafa-Zabłocka, K., Kreiner, G., Bagińska, M., Nalepa, I. (2018). Selective Depletion of CREB in Serotonergic Neurons Affects the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Evoked by Chronic Fluoxetine Treatment. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 637.
- Ramirez, K., Sheridan, J.F. (2016). Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous system and related anxiety-and depressive-like behaviors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 293-303.
- Ravindran, A.V., da Silva, T.L. (2013). Complementary and alternative therapies as add-on to pharmacotherapy for mood and anxiety disorders: a systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 150, 707–719.
- Razavi, B.M., Sadeghi, M., Abnous, K., Hasani, F.V., Hosseinzadeh, H. (2017). Study of the role of CREB, BDNF, and VGF neuropeptide in long term antidepressant activity of crocin in the rat cerebellum. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16(4), 1452.
- Ren, X., Dwivedi, Y., Mondal, A.C., Pandey, G.N. (2011). Cyclic-AMP response element binding protein (CREB) in the neutrophils of depressed patients. *Psychiatry Research*, 185(1-2), 108-112.
- Reus, G.Z., Stringari, R.B., Ribeiro, K.F. (2011). Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. *Behavioural Brain Research*, 221(1), 166-171.
- Roddy, D.W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., O'Keane, V., O'Hanlon, E. (2019). The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biological Psychiatry*, 15;85(6), 487-497.

- Rombolà, L., Scuteri, D., Watanabe, C., Sakurada, S., Hamamura, K., Sakurada, T., y Morrone, L. A. (2020). Role of 5-HT_{1A} Receptor in the Anxiolytic-Relaxant Effects of Bergamot Essential Oil in Rodent. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2597.
- Ruan, J., Liu, L., Shan, X., Xia, B., Fu, Q. (2019). Anti-depressant effects of oil from fructus gardeniae via PKA-CREB-BDNF signaling. *Bioscience Reports*, 39(4), BSR20190141.
- Rybakowski, J. K., Permoda-Osip, A., Skibinska, M., Adamski, R., & Bartkowska-Sniatkowska, A. (2013). Single ketamine infusion in bipolar depression resistant to antidepressants: are neurotrophins involved?. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 28(1), 87-90.
- Sakamoto, K., Karelina, K., Obrietan, K. (2011). CREB: a multi-faceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of Neurochemistry*, 116(1),1–9.
- Sandi, C., Haller, J. (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 290–304.
- Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., y Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 469(5-6), 593-610.
- Schatzberg, A.F. (2015). Anna-Monika Award Lecture, DGPPN Kongress, 2013: the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis in the pathogenesis of psychotic major depression. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 16(1), 2-11.
- Schmidt, H.D., Duman, R.S. (2010). Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), 2378–2391.
- Schmidt, H.D., Duman, R.S. (2007). The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behavioural Pharmacology*, 18(5-6), 391–418.

- Schulte-Herbrüggen, O, Vogt, M.A., Hörtnagl, H., Gass, P., Hellweg, R. (2012). Pramipexole is active in depression tests and modulates monoaminergic transmission, but not brain levels of BDNF in mice. *European Journal of Pharmacology*, 29, 677(1-3), 77-86.
- Shieh CH, Hong CJ, Huang YH, Tsai SJ. (2008). Potential antidepressant properties of cysteamine on hippocampal BDNF levels and behavioral despair in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry*, 32(6), 1590-1594.
- Shirzadegan, R., Gholami, M., Hasanvand, S., Birjandi, M., Beiranvand, A. (2017). Effects of geranium aroma on anxiety among patients with acute myocardial infarction: A triple-blind randomized clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 29, 201-206.
- Silenieks, L.B., Koch, E., Higgins, G.A. (2013). Silexan, an essential oil from flowers of *Lavandula angustifolia*, is not recognized as benzodiazepine-like in rats trained to discriminate a diazepam cue. *Phytomedicine*, 20(2), 172–177.
- Singh, J.B., Fedgchin, M., Daly, E., Singh, J.B., Fedgchin, M., Daly, E., Xi, L., Melman, C., De Bruecker, G., Tadic, A., Sienaert, P., Wiegand, F., Manji, H., Drevets, W.C., Van Nueten, L. (2016). Intravenous esketamine in adult treatment-resistant depression: a double-blind, double-randomization, placebo-controlled study. *Biological Psychiatry*, 80(6), 424–431.
- Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Zbytek, B., Tobin, D.J., Theoharides, T.C., y Rivier, J. (2013). Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocrine Reviews*, 34(6), 827–884.
- Solomon, M.B., Wulsin, A.C., Rice, T., Wick, D., Myers, B., McKlveen, J., Herman, J.P. (2014). The selective glucocorticoid receptor antagonist CORT 108297 decreases neuroendocrine stress responses and immobility in the forced swim test. *Hormones and Behavior*, 65(4), 363-371.
- Stevanovic, Z.D., Sieniawska, E., Glowniak, K., Obradovic, N., Pajic-Lijakovic, I. (2020). Natural macromolecules as carriers for essential oils: from extraction to biomedical application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 563.

- Stemmer, K., Müller, T.D., DiMarchi, R.D., Pfluger, P.T. y Tschöp, M.H. (2019). CNS-targeting pharmacological interventions for the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4058-4071
- Sterner, E.Y., Kalynchuk, L.E. (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34, 777–790.
- Steven, A., Seliger, B. (2016). Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget*, 7(23), 35454.
- Su, C.L., Su, C.W., Hsiao, Y.H., Gean, P.W. (2016). Epigenetic regulation of BDNF in the learned helplessness-induced animal model of depression. *Journal of Psychiatric Research*, 76, 101-110.
- Sun, L., Zhao, R., Zhang, L., Zhang, W., He, G., Yang, S., Song, J., Du, G. (2016). Prevention of vascular smooth muscle cell proliferation and injury-induced neointimal hyperplasia by CREB-mediated p21 induction: an insight from a plant polyphenol. *Biochemical Pharmacology*, 103, 40–52
- Takahashi, M., Yoshino, A., Yamanaka, A., Asanuma, C., Satou, T., Hayashi, S., Masuo, Y., Sadamoto, K., Koike, K. (2012). Effects of inhaled lavender essential oil on stress-loaded animals: changes in anxiety-related behavior and expression levels of selected mRNAs and proteins. *Natural Product Communications*, 7, 1539–1544
- Thompson, S.M., Kallarackal, A.J., Kvarta, M.D., Van Dyke, A.M., LeGates, T.A. y Cai, X. (2015). An excitatory synapse hypothesis of depression. *Trends in neurosciences*, 38(5), 279-294.
- Travis, S.G., Coupland, N.J., Hegadoren, K., Silverstone, P.H., Huang, Y., Carter, R., Malykhin, N.V. (2016). Effects of cortisol on hippocampal subfields volumes and memory performance in healthy control subjects and patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 201, 34-41.

- Trinh, A.T., Kim, S.H., Chang, H.Y., Mastrocola, A.S., Tibbetts, R.S. (2013). Cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation of cAMP response element-binding protein decreases chromatin occupancy. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(33), 23765–23775.
- Tripp, A., Oh, H., Guilloux, J.P., Martinowich, K., Lewis, D.A., Sibille, E. (2012). Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 169, 1194–1202.
- Upadhyay, G., Khoshla, S., Kosuru, R., Singh, S. (2016). Anxiolytic, antidepressant, and antistress activities of the aqueous extract of Cinnamomum tamala Nees and Eberm in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(5), 555.
- Valdés, J., Flores H. (1985). Comentarios a la historia de las plantas de la Nueva España. In: Obras completas de Francisco Hernández, Tomo VII, 179. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Vasconcelos, A.S. (2015). Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 29, 394–403.
- Vasconcelos, A.S., Oliveira, I.C., Vidal, L.T., Rodrigues, G.C., Gutierrez, S.J., Barbosa-Filho, J.M., de Sousa, F.C. (2015). Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 29(4), 394-403.
- Viana, G.S.B., do Vale, E.M., de Araujo, A.R.A., Coelho, N.C., Andrade, S.M., da Costa, R.O., Neves, K.R.T. (2021). Rapid and long-lasting antidepressant-like effects of ketamine and their relationship with the expression of brain enzymes, BDNF, and astrocytes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(2), e10107.
- Vilar, M., Mira, H. (2016). Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Frontiers Neuroscience*, 10(26), 1-9

- Villareal, M.O., Ikeya, A., Sasaki, K., Arfa, A.B., Neffati, M., Isoda, H. (2017). Anti-stress and neuronal cell differentiation induction effects of Rosmarinus officinalis L. essential oil. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-10.
- Wang, M., Cui, G., Wang, Q. (2015). Myricetin attenuates depressant-like behavior in mice subjected to repeated restraint stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28377-28385.
- Wang, C., Guo, J., y Guo, R. (2017). Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 73.
- Wang, H., Xu, J., Lazarovici, P., Quirion, R., Zheng, W. (2018). cAMP response element-binding protein (CREB): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 255.
- Wang, W., Liu, L., Yang, X., Gao, H., Tang, Q.K., Yin, L.Y., Gao, C. (2019). Ketamine improved depressive-like behaviors via hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced-susceptible mice. *Behavioural Brain Research*, 364, 75-84.
- Wei, T., Sun, J., Han, L., Chen, K., Wang, Z., Ji, H. (2015a). Effects of the ornidazole enantiomers on the central nervous system: involvement of the GABAA receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 163e169.
- Wei, Z., Liao, J., Qi, F., Meng, Z., Pan, S. (2015b). Evidence for the contribution of BDNF-TrkB signal strength in neurogenesis: an organotypic study. *Neuroscience Letters*, 606, 48–52.
- Weller, S., Baer, R., Garcia de Alba, J., Salcedo, A. (2008). Susto and nervios: expressions for stress and depression. *Culture, Medicine, and Psychiatry*, 32(3), 406-420.
- Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., Miller, L.S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of Immunology*. 185(11), 6413–6419.

- Wilkinson, S.T., Ballard, E.D., Bloch, M.H., Mathew, S.J., Murrough, J.W., Feder, A., Sos, P., Wang, G., Zarate, C.A.Jr., Sanacora, G. (2018). The effect of a single dose of intravenous ketamine on suicidal ideation: A systematic review and individual participant data meta-analysis. *The American Journal Psychiatry*, 175(2), 150-158.
- Xiao, X., Zhang, C., Grigoriu-Serbanescu, M., Wang, L., Li, L., Zhou, D., Yuan, T.F., Wang, C., Chang, H., Wu, Y., Li, Y., Wu, D.D., Yao, Y.G., Li, M. (2017). The cAMP responsive element-binding (CREB)-1 gene increases risk of major psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 9, 1957-1967.
- Xue, W., Wang, W., Gong, T., Zhang, H., Tao, W., Xue, L., Sun Y., Wang F., Chen, G. (2016). PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Xu, W., Kasper, L.H., Lerach, S., Jeevan, T., Brindle, P.K. (2007). Individual CREB-target genes dictate usage of distinct cAMP-responsive coactivation mechanisms. *The EMBO Journal*, 26(12), 2890–2903.
- Yang C., Kobayashi, S., Nakao, K., Dong, C., Han, M., Qu, Y., Ren, Q., Zhang, J.C., Ma, M., Toki, H., Yamaguchi, J.I., Chaki, S., Shirayama, Y., Nakazawa, K., Manabe, T., Hashimoto, K. (2018). AMPA receptor activation-independent antidepressant actions of ketamine metabolite (S)-norketamine. *Biological Psychiatry*, 84(8), 591–600.
- Yang C., Shirayama Y., Zhang J.C., Ren Q., Hashimoto K. (2015). Regional differences in brain-derived neurotrophic factor levels and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress. *The international Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(7), pyu121.
- Yang, C., Hu, Y.M., Zhou, Z.Q., Zhang, G.F., Yang, J.J. (2013). Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 118(1), 3-8.
- Yi, L.T., Liu, B.B., Li, J., Luo, L., Liu, Q., Geng, D., Wu, D. (2014). BDNF signaling is necessary for the antidepressant-like effect of naringenin. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 135-141.

- Yim, V.W., Ng, A.K., Tsang, H.W., Leung, A.Y. (2009). A review on the effects of aromatherapy for patients with depressive symptoms. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15, 187–195.
- Yu, F., Liu, Y., Xu, J. (2018). Pro-BDNF contributes to hypoxia/reoxygenation injury in myocardial microvascular endothelial cells: roles of receptors p75NTR and sortilin and activation of JNK and caspase 3. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3091424.
- Yuan, T.F., Hou, G. (2015). The effects of stress on glutamatergic transmission in the brain. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 1139–43.
- Yuan, P., Zhou, R., Wang, Y., Li, X., Li, J., Chen, G., Manji, H.K. (2010). Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia. *Journal of Affective Disorders*, 124(1-2), 164-169.
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P.J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G.I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H.J., Singh, N.S., Dossou, K.S., Fang, Y., Huang, X.P., Mayo, C.L., Wainer, I.W., Albuquerque, E.X., Thompson, S.M., Thomas, C.J., Zarate, C.A., Jr., Gould, T.D. (2016). NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*. 26;533(7604), 481-486.
- Zeng, B., Li, Y., Niu, B., Wang, X., Cheng, Y., Zhou, Z., Xu, J. (2016). Involvement of PI3K/Akt/FoxO3a and PKA/CREB signaling pathways in the protective effect of fluoxetine against corticosterone-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 59(4), 567-578.
- Zhang, C., Zhang, Y.P., Li, Y.Y., Liu, B.P., Wang, H.Y., Li, K.W., Song, C. (2019a). Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat. *Behavioural Brain Research*, 356, 348-357.

- Zhang, L.L., Yang, Z.Y., Fan, G., Ren, J.N., Yin, K.J., Pan, S.Y. (2019b). Antidepressant-like effect of Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oil and its main component limonene on mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(50), 13817-13828.
- Zhang, M., Radford, K.D., Driscoll, M., Purnomo, S., Kim, J., Choi, K.H. (2019c). Effects of subanesthetic intravenous ketamine infusion on neuroplasticity-related proteins in the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus of Sprague-Dawley rats. *IBRO Neuroscience Reports*, 6, 87-94.
- Zhang, N., Luo, M., He, L., Yao, L. (2020). Chemical Composition of Essential Oil from Flower of 'Shanzhizi' (Gardenia jasminoides, Ellis) and Involvement of serotonergic system in Its anxiolytic effect. *Molecules*, 25(20), 4702.
- Zhou, W., Wang, N., Yang, C., Li, X.M., Zhou, Z.Q., Yang, J.J. (2014). Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *European Psychiatry*, 29(7), 419-423.
- Zhu, L.J., Liu, M.Y., Li, H., Liu, X., Chen, C., Han, Z., Zhu, D.Y. (2014). The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *Plos one*, 9(5), e97689.