

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Efecto de *Tagetes lucida* Cav sobre parámetros asociados con la esquizofrenia experimental en diferentes modelos de psicosis en ratón”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud**

**PRESENTA**

**M. en C. Sandra Liliana Porras Dávila  
2191800096**

**Comité tutorial:**

**Codirector Interno: Dr. Rubén Román Ramos  
Dr. Julio César Almanza Pérez  
Codirector Externo: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz**

**Asesor: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer**



El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93



La alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Sandra Liliana Porras Dávila, recibió beca CONACyT de febrero 2019 a enero 2023, con número de registro **735062**



El presente trabajo fue aprobado por el comité local de Investigación 1702 del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro:  
**R-2019-1702-005**

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis

### **Efecto de *Tagetes lucida* Cav sobre parámetros asociados con la esquizofrenia experimental en diferentes modelos de psicosis en ratón**

Que presentó:

**M. en C. Sandra Liliana Porras Dávila**

El día 31 de enero de 2023


#### JURADO

Presidente: Dr. Julio César Almanza Pérez



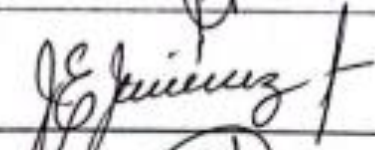
---

Secretario: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz



---

Vocal 1: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer




---

Vocal 2: Dr. Manases González Cortázar



---

Vocal 3: Dra. Herlinda Bonilla Jaime



---

## AGRADECIMIENTOS

*A la **Dra. Maribel Herrera Ruiz**, por brindarme todo su apoyo, confianza y cariño durante estos años trabajando juntas, porque a pesar de conocer mis debilidades siempre creyó en mí, y me brindó todos los consejos y el conocimiento necesario para el desarrollo de este trabajo, quiero que sepa que siempre estaré agradecida por haber tenido la oportunidad de conocer la gran mujer que es, no solo en el ámbito profesional como su alumna si no también en el personal.*

*Todo mi respeto y admiración.*

*Al **Dr. Rubén Román Ramos** por aceptarme como su alumna y apoyarme incondicionalmente gran parte de este camino. Al **Dr. Julio Cesar Almanza Pérez** por acogerme como una alumna más, al cual apoyo con todos los recursos que tenía a su alcance para poder ver este proyecto culminado.*

*Al **Dr. Manases González Cortázar** y el **Dr. Enrique Jiménez Ferrer** porque fueron parte importante y activa en el desarrollo de este proyecto.*

*Al **CIBIS-IMSS** y todas las personas que forman parte del grupo*

*A la **UAM-I** especialmente al laboratorio de farmacología y la **Dra. Ángeles Fortis Barrera***

*A **Jimmy Hernández Gómez**, Por brindarme su amor y apoyo, por compartir mis alegrías y tristezas por comprenderme, ayudarme y no dejarme desfallecer en los momentos difíciles.*

## DEDICATORIA

A DIOS

*Mi familia*

*Misael Porras y Deyanira Dávila, por ustedes hoy esto que comenzó como un sueño se convierte en una realidad, gracias por ser mi gran ejemplo. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios, empeño, y perseverancia para conseguir mis objetivos, no me va a alcanzar la vida para agradecer el tenerlos como padres.*

## RESUMEN

Dentro de los procesos fisiopatológicos que subyacen los trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, se encuentra la desregulación dopaminérgica y glutamatérgica, así como la inflamación y estrés oxidante. En la búsqueda de terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes que sufren esquizofrenia, las plantas medicinales representan un objeto de estudio. *Tagetes lucida* se ha utilizado en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de trastornos mentales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto producido por los extractos (TIHex, TIAEt, TIMet y TLAq) y dos cumarinas obtenidas de *T. lucida*, utilizando diferentes modelos de psicosis experimental, así como, el efecto modulador de dichos productos sobre la respuesta neuro-inflamatoria y oxidante en ratones. Se usaron métodos químicos de extracción y separación cromatográfica, así como, métodos de elucidación estructural obteniendo seis compuestos; tres cumarinas y tres flavonoides: dos conocidos y uno nuevo del tipo flavonol denominado quercetagetina 7-O- $\beta$ -(6'-protocatecoil) glucopiranosido. Los cuatro extractos fueron evaluados a 25 y 50 mg/kg y las dos cumarinas seleccionadas debido a sus antecedentes farmacológicos, herniarina y dimetilfraxetina a 1 y 5 mg/kg en la prueba de catalepsia inducida con haloperidol (HAL, antipsicótico típico, 0.5 mg/kg), y en el ensayo de psicosis inducida con ketamina (KET, 50 mg/kg, antagonista de receptores NMDA) de forma aguda en el que la medición del efecto se hizo a través del análisis de conductas psicóticas. Posteriormente, ambos compuestos (1 mg/kg) se evaluaron en un modelo de administración crónica de MK-801 (MK-801 0.5 mg/kg, antagonista de receptores NMDA) en ratones, que fueron expuestos a diferentes ensayos conductuales. La catalepsia, comportamiento adverso asociado al consumo del haloperidol, se evaluó usando la prueba de barra. Los síntomas (positivos, negativos y cognitivos) de la esquizofrenia de forma aguda y crónica, utilizando

como inductores de psicosis a los moduladores glutamatérgicos KET y MK-801, respectivamente; fueron analizados mediante pruebas conductuales de natación forzada (NF), evitación pasiva (EP), interacción social (IS) y campo abierto (CA). La inflamación asociada a la administración de MK-801, fue medida por la cuantificación de citocinas pro- y anti-inflamatorias por el método de ELISA y la oxidación por medición de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), óxido nítrico (ON) y malonaldehído (MDA), en cerebro e hígado. Los extractos TIAEt 50 y TIAq 25 mg/kg y las cumarinas a 1 mg/kg son capaces de potenciar el efecto cataléptico inducido con HAL, lo que indica una interacción farmacológica con receptores tipo D2 para dopamina. También, estos tratamientos son capaces de tener interacción con el sistema glutamatérgico, al bloquear o disminuir las conductas provocadas por la administración aguda de KET y crónica de MK-801. Se observó que estos tratamientos derivados de *T. lucida* tienen efecto sobre los síntomas psicóticos como antidepresivos (NF), nootrópicos (EP), mejorando la conducta de socialización (IS), disminuyendo el número de conductas psicóticas (CA). Las cumarinas aisladas, también incrementan significativamente la concentración local de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4) y disminuyen las pro-inflamatorias (IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). Pero, además, se observa su capacidad anti-oxidante en relación con el sistema redox GSH/GSSG y los niveles de ON y MDA respecto al grupo de daño MK-801. De acuerdo con los resultados, se puede concluir que parte del efecto de *T. lucida* se debe a la posible interacción de las cumarinas herniarina y dimetilfraxetina con los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico *in vivo*, ya que potencian el efecto cataléptico inducido con HAL y muestran un efecto protector inhibiendo los síntomas generados por KET y MK-801 en ratones. Además de generar un efecto modulador de la respuesta asociada a la inflamación y al daño oxidante *in vitro*.

## ABSTRACT

Among the pathophysiological that processes underlying psychiatric disorders such schizophrenia are dopaminergic and glutamatergic dysregulation, as well as inflammation and oxidative stress. In searching for therapies that improve the quality of life of patients with schizophrenia, medicinal plants represent an object of study. *Tagetes lucida* has been used in traditional Mexican medicine to treat mental disorders. The objective of the present work was to evaluate the effect produced by extracts (TIHex, TIAEt, TIMet, and TLAq) and two coumarins obtained from *T. lucida*, using different models of experimental psychosis, as well as the modulatory effect of these products on the neuro-inflammatory and oxidative response in mice. Chemical extraction and chromatographic separation methods were used, as well as structural elucidation methods obtaining six compounds, three of them coumarin-type and three flavonoids of the latter a new flavonol Quercetagetin 7-O- $\beta$ -(6''protocatechol) glucopyranoside. Both extracts (25 and 50 mg/kg) and two coumarins selected because of their pharmacological background, herniarin and dimethylfraxetin (1 and 5 mg/kg), were evaluated in the haloperidol-induced catalepsy test (HAL, typical antipsychotic, 0.5 mg/kg), and in the ketamine (KET, 50 mg/kg, NMDA receptor antagonist) acutely induced psychosis test in which the measurement of effect was done through the analysis of psychotic behaviors. Subsequently, both compounds (1 mg/kg) were evaluated in a chronic administration model of MK-801 (MK-801 0.5 mg/kg, NMDA receptor antagonist) in mice, which were exposed to different behavioral assays. Symptoms (positive, negative, and cognitive) of schizophrenia in acute and chronic form, using the glutamatergic modulators KET and MK-801, respectively, as inducers of psychosis, were analyzed using behavioral tests of forced swimming (FS), passive avoidance (PA), social interaction (SI) and open field (OF). Inflammation associated with MK-801 administration was



measured by quantification of pro- and anti-inflammatory cytokines by ELISA and oxidation by measurement of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), nitric oxide (NO) and malonylaldehyde (MDA) in brain and liver. The extracts TIAEt 50 and TIAq 25 mg/kg and coumarins at 1 mg/kg can potentiate the HAL-induced cataleptic effect, indicating a pharmacological interaction with D2-type receptors for dopamine. Also, these treatments can interact with the glutamatergic system by blocking or decreasing the behaviors elicited by acute KET and chronic MK-801 administration. Furthermore, it was observed that these treatments derived from *T. lucida* have an affect psychotic symptom such as antidepressants (FS) and nootropics (PA), improving socialization behavior (SI) and decreasing the number of psychotic behaviors (OF). Furthermore, the isolated coumarins also significantly increase the local concentration of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-4) and decrease the pro-inflammatory ones (IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). However, their antioxidant capacity is also observed in the GHS/GSSG redox system and the levels of ON and MDA with respect to the MK-801 damage group. According to the results, it can be concluded that part of the effect of *T. lucida* is due to the possible interaction of the coumarins herniarin and dimethylfraxetin with the dopaminergic and glutamatergic systems in vivo since they potentiate the cataleptic effect induced with HAL and show a protective effect inhibiting the symptoms generated by KET and MK-801 in mice. In addition to generating a modulating effect on the response associated with inflammation and oxidative damage in vitro.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
2.1	Trastornos mentales.....	5
2.2	Esquizofrenia.....	7
2.3	Epidemiología .....	11
2.4	Fisiopatología de la Esquizofrenia .....	13
2.4.1	Hipótesis Dopaminérgica .....	13
2.4.2	Hipótesis Glutamatérgica .....	19
2.4.3	Inflamación y estrés oxidante en la esquizofrenia.....	27
2.5	Fármacos antipsicóticos .....	30
2.6	Modelos biológicos .....	35
2.6.1	Catalepsia inducida con Haloperidol.....	36
2.6.2	Psicosis inducida con Ketamina y MK-801 de los receptores NMDA. ....	38
2.7	Pruebas conductuales .....	41
2.7.1	Natación forzada (NF).....	41
2.7.2	Evitación pasiva (EP).....	41
2.7.3	Interacción social (IS) .....	42
2.7.4	Campo abierto (CA).....	43
2.8	Plantas medicinales .....	44
2.8.1	Familia Asteraceae .....	44
2.8.2	Descripción botánica <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	44
2.8.3	Etnobotánica de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	46
2.8.4	Química y farmacología <i>Tagetes lucida</i> Cav .....	46
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
6.1	Objetivo general .....	50
6.2	Objetivos específicos.....	50
<b>7</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
7.1	Material vegetal y obtención de extractos .....	52
7.2	Animales y tratamientos.....	53
7.3	Ensayos farmacológicos agudos.....	54
7.3.1	Catalepsia inducida con haloperidol .....	54
7.3.2	Modelo de psicosis inducida con ketamina .....	55
7.4	Modelo de toxicidad aguda por clases y- neurotóxico mediante prueba de Irwin. ....	61
7.5	Caracterización química de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	62
7.5.1	Separación de TIAEt mediante CLC .....	62
7.5.2	Separación de TIAq mediante CLC.....	64
7.5.3	Análisis de la separación química de <i>T. lucida</i> por CCF. ....	67
7.5.4	Análisis de los extractos y compuestos de <i>T. lucida</i> mediante CLAR.....	67
7.5.5	Técnicas espectroscópicas y espectrométricas para elucidación química estructural .....	68
7.6	Modelo farmacológico de psicosis crónica inducida con MK-801 .....	69
7.6.1	Cuantificación de citocinas por ELISA.....	70
7.6.2	Evaluación de la actividad antioxidante mediante GSH, GSSH, ON y MDA. ....	70

7.7	Análisis estadístico.....	72
<b>8</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
8.1	Obtención de extractos de <i>Tagetes lucida</i> .....	73
8.2	Efecto de extractos de <i>T. lucida</i> en las pruebas agudas.....	73
8.2.1	Catalepsia inducida con HAL.....	73
8.2.2	Efecto de <i>Tagetes lucida</i> sobre diferentes parámetros de psicosis inducida con KET.....	76
8.3	Efecto neurotóxico de la administración aguda de extractos de <i>T lucida</i> mediante prueba de Irwin.....	81
8.4	Caracterización química de <i>Tagetes lucida</i> .....	86
8.4.1	Separación química y elucidación estructural de compuestos aislados de TIAEt y TIAq.....	86
8.5	Efecto de las cumarinas de <i>T. lucida</i> en los ensayos agudos.....	92
8.5.1	Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la catalepsia inducida con HAL.....	92
8.5.2	Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre parámetros de psicosis inducida con KET.....	93
8.6	Efecto de herniarina y dimetilfraxetina en un modelo crónico inducido con MK-801.....	97
8.6.1	Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre los niveles de citocinas en ratones con MK-801.....	102
8.6.2	Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la actividad antioxidante en ratones con MK-801.....	104
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>131</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>132</b>
<b>13</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>140</b>

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vías dopaminérgicas.....	16
<b>Figura 2.</b> Estructura de proteína G acoplada a receptores dopaminérgicos .....	16
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2 .....	18
<b>Figura 4.</b> Vías glutamatérgicas.....	22
<b>Figura 5.</b> Receptores ionotrópicos del glutamato. ....	24
<b>Figura 6.</b> Receptor NMDA subunidades NR1/NR2.....	26
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de la modulación de heteroreceptores D1-A1 y D2-A2 <sub>A</sub> y efecto de HAL.....	38
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de los antagonistas no competitivos (KET y MK-801) que bloquea a receptores NMDA.....	40
<b>Figura 9.</b> <i>Tagetes lucida</i> Cav .....	46
<b>Figura 10.</b> Diagrama experimental.....	53
<b>Figura 11.</b> Diagrama modelo de catalepsia inducida con HAL. ....	54
<b>Figura 12.</b> Fotografía de un ratón con catalepsia- inducida con HAL, en prueba en barra.....	55
<b>Figura 13.</b> Diagrama modelo de psicosis inducida con KET en ensayo de Natación Forzada .....	56
<b>Figura 14.</b> Prueba de Natación Forzada. ....	57
<b>Figura 15.</b> Diagrama modelo de psicosis inducida con KET en prueba de Evitación Pasiva. ....	57
<b>Figura 16.</b> Cámara usada en Evitación Pasiva. ....	58
<b>Figura 17.</b> Diagrama modelo de psicosis inducida con KET en prueba de Interacción Social.....	58
<b>Figura 18.</b> Cámara usada en la prueba de Interacción Social.....	59
<b>Figura 19.</b> Diagrama modelo de psicosis inducida con KET en ensayo de Campo Abierto.....	60
<b>Figura 20.</b> Cámara usada en prueba de Campo Abierto.....	61
<b>Figura 21.</b> Diagrama del modelo biológico de psicosis crónica.....	69
<b>Figura 22.</b> Efecto de los extractos de <i>T. lucida</i> sobre el estado cataléptico inducido con HAL en PB. . .....	75
<b>Figura 23.</b> Efecto de los extractos de <i>T. lucida</i> sobre el tiempo de inmovilidad inducido con KET en prueba de NF. ....	77
<b>Figura 24.</b> Efecto de los extractos de <i>T. lucida</i> sobre el deterioro cognitivo inducido con KET en prueba EP. ....	78
<b>Figura 25.</b> Efecto de los extractos de <i>T. lucida</i> sobre la disminución del tiempo de interacción inducido con KET en prueba de IS. ....	79
<b>Figura 26.</b> Imágenes representativas de hígados del efecto toxico de animales con diferentes tratamientos durante la prueba de Irwin.....	85
<b>Figura 27.</b> Perfil cromatográfico de cumarinas aisladas y reportadas de TLA <sub>Et</sub> y TIA <sub>q</sub> . ....	87
<b>Figura 28.</b> Estructuras de compuestos tipo flavonoide aislados del extracto TIA <sub>q</sub> de <i>T. lucida</i> .....	88
<b>Figura 29.</b> Efecto de los extractos de <i>T. lucida</i> sobre el estado cataléptico inducido con HAL en PB. ....	92
<b>Figura 30.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre el tiempo de inmovilidad inducido con KET en prueba de NF.....	94
<b>Figura 31.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre el deterioro cognitivo inducido con KET en prueba de EP.....	95
<b>Figura 32.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre la disminución del tiempo de interacción inducido con KET en prueba de IS. ....	96

<b>Figura 33.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre el tiempo de inmovilidad inducido con MK-801 en prueba de NF.....	98
<b>Figura 34.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre el deterioro cognitivo inducido con MK-801 en prueba de EP.....	99
<b>Figura 35.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre la función cognitiva inducida con MK-801 en prueba de IS.....	100

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efectos secundarios no-deseables de antipsicóticos de primera, segunda y tercera generación. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de la especie <i>Tagetes lucida</i> Cav .....	45
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos y dosis administradas en el modelo de catalepsia inducida con HAL.....	55
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos usados en el ensayo de psicosis aguda- inducida con KET.....	56
<b>Tabla 5.</b> Gradiente empleado en CLAR .....	68
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento de extractos provenientes de <i>T. lucida</i> .....	73
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los extractos de <i>T. lucida</i> sobre síntomas positivos de la esquizofrenia inducida KET en prueba de CA. ....	80
<b>Tabla 8.</b> Parámetros conductuales asociados a toxicidad durante las primeras 24 horas de observación. ....	83
<b>Tabla 9.</b> Parámetros conductuales asociados a toxicidad cada 24.....	84
<b>Tabla 10.</b> Valores de desplazamiento químico de protón de compuestos 3,4 y 5 .....	89
<b>Tabla 11.</b> Valores de desplazamiento químico de carbono de compuestos 3,4 y 5 .....	90
<b>Tabla 12.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i> sobre síntomas positivos de la esquizofrenia inducida KET en prueba de CA. ....	97
<b>Tabla 13.</b> Efecto de los compuestos aislados de <i>Tagetes lucida</i> sobre síntomas positivos de la esquizofrenia inducida MK-801 en prueba de CA.....	101
<b>Tabla 14.</b> Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre citocinas en tejido de cerebro e hígado obtenido de ratones con inflamación inducida por MK-801. ....	102
<b>Tabla 15.</b> Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre citocinas en tejido de cerebro e hígado obtenido de ratones con inflamación inducida por MK-801 .....	103
<b>Tabla 16.</b> Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la concentración GHS y GSSG en cerebro e hígado de ratones con estrés oxidante inducidos con MK-801. ....	105
<b>Tabla 17.</b> Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la concentración ON y MDA en cerebro e hígado de ratones con estrés oxidante inducidos con MK-801. ....	106

## ABREVIATURAS

<b>Ac:</b> Acicalamientos	<b>IS:</b> Interacción social
<b>AMPA:</b> Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolenpropionico	<b>K<sup>+</sup>:</b> Ion de potasio
<b>AMPc:</b> Monofosfato cíclico de adenosina	<b>KET:</b> Ketamina
<b>ANOVA:</b> Análisis de varianza	<b>kg:</b> kilogramos
<b>ATP:</b> trifosfato de adenosina	<b>Li:</b> Latencia inicial
<b>ATV:</b> Área tegmental ventral	<b>LPS:</b> Lipopolisacárido
<b>CA:</b> Prueba de Campo Abierto	<b>Lr:</b> Latencia de retención
<b>Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>:</b> Ion de calcio	<b>LTP:</b> por sus siglas en inglés (“ <i>long-term potentiation</i> ”)
<b>CAF:</b> Cafeína	<b>mA:</b> miliamperios
<b>CCF:</b> Cromatografía en capa fina	<b>MDA:</b> Malondialdehido
<b>CE:</b> Conductas Estereotipadas	<b>mg:</b> miligramos
<b>CLAR:</b> Cromatografía líquida en alta Resolución	<b>Mg<sub>2</sub><sup>+</sup>:</b> Ion de magnesio
<b>CLC:</b> Cromatografía líquida en columna	<b>Min:</b> minutos
<b>cm:</b> centímetros	<b>MK-801:</b> Dizocilpina
<b>CT:</b> Cruces totales	<b>Na<sub>2</sub><sup>+</sup>:</b> Ion de sodio
<b>COSY:</b> por sus siglas en inglés ( <i>correlated spectroscopy</i> )	<b>NF:</b> Prueba de Natación Forzada
<b>DA:</b> Dopamina	<b>NMDA:</b> N-metil-D-aspartato
<b>DSM-V:</b> Manual estadístico y diagnóstico de los trastornos mentales	<b>NMDAr:</b> receptor N-metil-D-aspartato
<b>EE:</b> Error estándar	<b>OLZ:</b> Olanzapina
<b>ELISA:</b> ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud
<b>EP:</b> Evitación Pasiva	<b>ON:</b> Óxido nítrico
<b>EV:</b> Estiramientos Verticales	<b>ON<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b> Nitrito
<b>EZQ:</b> Esquizofrenia	<b>PB:</b> Prueba en Barra
<b>GHS:</b> Glutación reducido	<b>PKA:</b> Cinasa de proteína activada por AMPc
<b>GLU:</b> Glutamato	<b>PKC:</b> Cinasa C de proteína
<b>GSSG:</b> Glutación Oxidado	<b>Rf:</b> Ratón familiar
<b>HAL:</b> Haloperidol	<b>Rn:</b> Ratón nuevo
<b>HMBC:</b> por sus siglas en ingles “ <i>heteronuclear multiple bond coherence</i> ”	<b>RMN:</b> Resonancia Magnética Nuclear
<b>HPLC:</b> Cromatografía líquida de alta resolución	<b>SNC:</b> Sistema Nervioso Central
<b>HSQC:</b> por sus siglas en ingles “ <i>heteronuclear simple quantum coherence</i> ”	<b>TAc:</b> Tiempo invertido en acicalarse
<b>hr:</b> hora	<b>TCE:</b> Tiempo invertido en conductas estereotipadas
<b>IL10:</b> Interleucina diez	<b>TIAEt:</b> Extracto de Acetato de Etilo
<b>IL1<math>\beta</math>:</b> interleucina uno beta	<b>TIAq:</b> Extracto Acuoso
<b>IL4:</b> Interleucina cuatro	<b>TIHex:</b> extracto Hexanico
<b>IL6:</b> Interleucina seis	<b>TIMet:</b> Extracto Metanolico
<b>IL-17:</b> Interleucina diecisiete	<b>TNF<math>\alpha</math>:</b> Factor de necrosis tumoral alfa
<b>IL-12:</b> Interleucina doce	<b>TR:</b> por sus siglas en inglés “ <i>retention time</i> ”.
<b>ip:</b> Vía intraperitoneal	<b>seg:</b> segundos
	<b>VEH:</b> Vehículo
	<b>vo:</b> Vía oral
	<b>UV:</b> Ultravioleta Visible
	<b>Zn<sub>2</sub><sup>+</sup>:</b> Ion zinc

## 1 INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica de origen genético y ambiental caracterizada por un conjunto variable de síntomas clásicos de la psicosis, los síntomas positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas positivos y negativos son términos que se suelen utilizar en los trastornos del espectro de la esquizofrenia. Por un lado, los positivos son aquellos que se consideran una exacerbación de las funciones normales y habituales de la persona, por ejemplo, el exceso en el deseo de la limpieza (síntomas por exceso). Por otro lado, los síntomas negativos son el conjunto de signos y síntomas que provocan una disminución de las capacidades habituales, y las cuales ya existían en el repertorio de la persona, como la interacción social (síntomas por defecto). Por lo tanto los síntomas positivos abarcan alucinaciones y delirios los síntomas negativos incluyen afecto plano, alogia, anhedonia y déficits sociales, y los síntomas cognitivos, que reflejan deficiencias de atención, memoria, percepción y pensamiento (Winship *et al.*, 2018)(Gejman & Sanders, 2012). Esta enfermedad afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo. Es más frecuente en hombres (12 millones) que en mujeres (9 millones). Asimismo, los hombres desarrollan esquizofrenia generalmente a una edad más temprana, suele ser entre los 18 y los 25 años y en las mujeres, entre los 25 y los 35 años. (*WHO / world health organization, 2022*)

A pesar de los avances en el conocimiento de las bases biológicas de la conducta, los mecanismos neurobiológicos precisos involucrados en la esquizofrenia permanecen prácticamente desconocidos por lo que existen varias hipótesis sobre la etiología en el desarrollo de esta enfermedad compleja y multifactorial (Winship *et al.*, 2018). La hipótesis dopaminérgica



sostiene que los síntomas de la esquizofrenia se deben a un exceso de dopamina (DA) o a una elevada sensibilidad a este neurotransmisor (Callado *et al.*, 2009), se postula que la hiperactividad de las vías dopaminérgicas mesolímbicas y las alteraciones de los receptores de la familia D1 y D2 y del espacio pre-sináptico son decisivas para la expresión clínica de los síntomas psicóticos, con aparición de sintomatología positiva, negativa, afectiva y cognitiva (Lahera *et al.*, 2013). La DA ejerce sus funciones a través de receptores post-sinápticos y pre-sinápticos. La disponibilidad de DA a nivel de los receptores está regulada por el transportador de dopamina (DAT), encargado de la recaptación de este neurotransmisor desde el espacio extracelular hacia el interior de la neurona pre-sináptica después de su liberación. Teniendo en cuenta el papel de la DAT en estas funciones, su desregulación se relaciona con el desarrollo de trastornos neurológicos como la esquizofrenia (Mccutcheon *et al.*, 2019). Se postula que en el sistema glutaminérgico podría haber una disminución de la señalización de esta vía a nivel de los receptores ionotrópicos-NMDA, generando los síntomas positivos, negativos, cognitivos y afectivos típicos de la esquizofrenia. Así, en la esquizofrenia la hipofunción de NMDA puede hacer al sistema dopaminérgico más sensible al estrés psicosocial (Callado *et al.*, 2009).

Otro mecanismo fisiopatológico relacionado con la esquizofrenia, y al cual se le atribuye una participación importante es la neuroinflamación. Se propone un estado inflamatorio subyacente que actuaría como predisponente durante el neurodesarrollo para el establecimiento de la enfermedad (Monji *et al.*, 2013), este proceso lleva inevitablemente a un estado pro-oxidante como mecanismo subyacente de la enfermedad (Riegel *et al.*, 2010). Particularmente, el cerebro es vulnerable y los mecanismos que protegen frente a este factor de daño consisten en la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno mediante enzimas antioxidantes

como glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa, entre otros (Maldonado *et al.*, 2010). El control terapéutico de la esquizofrenia, se basa en la administración de fármacos antipsicóticos, predominantemente por aquellos que actúan sobre el sistema dopaminérgico, que son agrupados como fármacos típicos o de primera generación (como el haloperidol -HAL-) y atípicos o de segunda generación (como la olanzapina -OLZ-) (Bermejo & Rodicio, 2007). Sin embargo, el manejo actual de los síntomas de la esquizofrenia se basa en la prescripción de los antipsicóticos tercera generación (como la aripiprazole) (Stępnicki *et al.*, 2020). Los tres grupos de fármacos son eficaces para síntomas positivos, los de la segunda y tercera generación para los negativos y cognitivos, lo que resulta en un beneficio aparente para los pacientes al cursar con una disminución de las características clínicas de la esquizofrenia, la consecuencia de un tratamiento prolongado lleva a efectos colaterales adversos importantes (Bernardo & Surgonà, 2008) (Stępnicki *et al.*, 2020). Las plantas medicinales han sido importantes instrumentos de la medicina tradicional en diferentes patologías y hoy representan un valioso objeto de estudio en la búsqueda de mejores opciones terapéuticas. *Tagetes lucida* Cav es una planta nativa de México comúnmente conocida en la medicina tradicional de éste, como “pericón” (BDMTM, 2009). Pertenece a la familia Compositae/-Asteraceae y su uso medicinal más frecuente es en trastornos digestivos. Asimismo, para dolores en general, problemas de inflamación, insomnio, ansiedad y depresión (BDMTM, 2009) También, es ampliamente usada para tratar padecimientos populares como los “nervios”, “susto” o “espanto” para los “**LOCOS**” ya que alivia a los *dementes* (Argueta and Gallardo, 1994). Entre las propiedades farmacológicas de *Tagetes lucida* Cav se encuentra diferentes estudios sobre su actividad antiinflamatoria (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020) y antioxidante (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Así mismo, se ha

demostrado efecto sobre el SNC, como antidepresivo (Bonilla-Jaime *et al.*, 2015), ansiolítico y sedante (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto producido por los extractos (TIHex, TIAEt, TIMet y TLAq) y dos cumarinas, herniarina y dimetilfraxetina obtenidos de *T. lucida* en diferentes modelos de psicosis experimental inducida mediante vía dopaminérgica por la inducción de HAL y vía glutamatérgica por la inducción aguda de ketamina y crónica de MK-801, así como, el efecto modulador de ambas cumarinas sobre la respuesta neuro inflamatoria y oxidante en ratones.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Trastornos mentales

Existe una gran variedad de trastornos mentales, cada uno de ellos con manifestaciones distintas, que se caracterizan por una combinación de alteraciones del pensamiento, la percepción, las emociones, la conducta y las relaciones con los demás. Entre ellos, se incluyen depresión, trastorno afectivo bipolar, psicosis (principalmente la esquizofrenia), demencia, discapacidades intelectuales y trastornos del desarrollo, como el autismo (*WHO / world health organization, 2022*).

En los trastornos mentales el término «psicosis» se emplea para referirse a aquellos desordenes de la mente caracterizados por cierta pérdida de contacto con la realidad. Cuando una persona sufre este tipo de trastorno se dice que ha tenido un «episodio psicótico». La psicosis afecta principalmente a los adultos jóvenes y es bastante común, por lo que cerca de 3 de cada 100 jóvenes sufrirán un episodio psicótico, lo cual significa que entre este sector de la población la psicosis es más común que la diabetes (*WHO / world health organization, 2022*).

Esta enfermedad afecta a cada persona de forma diferente y, además, durante las etapas iniciales no siempre es posible poner un nombre o una etiqueta a la enfermedad. Sin embargo, cuando una persona sufre una psicosis, se suele diagnosticar de una enfermedad psicótica específica. En el caso de un primer episodio psicótico, resulta especialmente difícil determinar con exactitud el tipo de psicosis, esencialmente porque en muchos casos se desconocen en gran medida los factores que la han provocado. Según el manual de diagnóstico de la *American Psychiatric*

*Association: DSM-V (Diagnostic and statistical manual of mental disorders)* la psicosis se puede clasificar de la siguiente manera (Valle, 2020):

- **Psicosis inducida por tóxicos:** El consumo de drogas o alcohol, o bien la abstinencia repentina tras un consumo prolongado, puede provocar la aparición de síntomas psicóticos. En algunos casos, los síntomas se resuelven rápidamente al desaparecer los efectos de la droga, mientras que en otros la enfermedad puede persistir a pesar de suspender el consumo.
- **Psicosis reactiva breve:** En ocasiones, los síntomas psicóticos aparecen de forma súbita en respuesta a una situación de mucha tensión, como puede ser un cambio importante en las circunstancias personales o la muerte de un familiar. Aunque los síntomas pueden ser muy intensos, la recuperación se produce en pocos días.
- **Trastorno delirante:** El síntoma principal son los delirios, es decir, es la firme creencia en cosas que no son ciertas.
- **Psicosis orgánica:** A veces, los síntomas psicóticos son consecuencia de lesiones o enfermedades orgánicas como traumatismos, infecciones o tumores. Habitualmente se presentan junto con otros síntomas específicos de tipo neurológico.
- **Trastorno bipolar:** En estos casos, la psicosis es la punta del iceberg de una alteración del estado de ánimo más generalizada que se caracteriza por la alternancia de episodios de euforia y excitación (manía) y otros de desánimo e inhibición (depresión). En caso de presentar síntomas psicóticos, éstos suelen estar relacionados con el estado de ánimo. Así, en un episodio depresivo, el enfermo puede escuchar voces que le dicen que se

suicide mientras que, en un episodio maníaco, puede creerse un ser con cualidades excepcionales capaz de realizar grandes proezas.

- **Trastorno esquizoafectivo:** Este diagnóstico corresponde a la presencia simultánea o consecutiva de síntomas de un trastorno del estado de ánimo (tales como la depresión o la manía) y de psicosis. Es decir, el cuadro clínico no es típico de un trastorno afectivo ni de la esquizofrenia.
- **Depresión psicótica:** Consiste en una depresión aguda combinada con síntomas psicóticos, sin que en ningún momento de la enfermedad lleguen a aparecer síntomas maníacos.
- **Trastorno esquizofreniforme:** Únicamente se distingue de la esquizofrenia en que los síntomas persisten menos de seis meses.
- **Esquizofrenia (EZQ):** la cual se encuentra entre las patologías psiquiátricas más severas e incapacitantes y que hace referencia a aquellos trastornos psicóticos en los que los síntomas persisten durante un período no inferior a seis meses, y su duración y la intensidad de estos varían según el caso.

## 2.2 Esquizofrenia

La EZQ es una enfermedad psiquiátrica de origen genético y ambiental caracterizada por un conjunto variable de síntomas clásicos de la psicosis (Gejman & Sanders, 2012). Los trastornos psicóticos, entre ellos la esquizofrenia, provocan anomalías del pensamiento, las emociones, el lenguaje, la percepción del yo y la conducta. Las psicosis suelen ir acompañadas de alucinaciones (oír, ver o percibir algo que no existe) y delirios (ideas persistentes que no se

ajustan a la realidad de las que el paciente está firmemente convencido, incluso cuando hay pruebas de lo contrario). Estos trastornos pueden dificultar que la persona trabaje o estudie con normalidad (*WHO / world health organization, 2022*).

La historia de la EZQ se desarrolla paralelamente a la historia de la Psiquiatría. Corresponde a *Emil Kraepelin, Eugen Bleuler, Benedict A. Morel* y *Karl Luwig Kahlbaum*, las primeras descripciones de las manifestaciones clínicas de esta afección aceptadas hasta hoy y enriquecidas por otros, entre los que se encuentran: *Adolf Meyer, Harry Stack Sullivan, Gabriel Langfeldt, Kurt Schneider* y *Karl Jasper*, todos de una forma u otra han intentado definir criterios diagnósticos para la esquizofrenia, existiendo hoy día aproximadamente una decena de patrones para estos (Vega Jiménez *et al.*, 2018) (Jablensky, 2010). Las manifestaciones patognomónicas en la esquizofrenia se congregan en tres grupos de síntomas:

**Síntomas Positivos:** son comportamientos psicóticos que en ocasiones pueden perder el contacto con la realidad. La gravedad de estos síntomas depende si la persona está siguiendo un tratamiento o no. Y pueden ser de 3 tipos:

- *Alucinaciones:* es una alteración en la percepción producida por la ausencia de un estímulo (vista, oído, olfato, gusto y tacto). Las alucinaciones auditivas conocidas como las voces son las más comunes. Las voces pueden ser internas, es decir, que parecen venir de dentro de la mente de la persona, o pueden ser externas y parecer tan reales como si otra persona estuviera hablando.

- *Los delirios*: son aquellas creencias falsas o ideas muy fijas que no son coherentes con la realidad, aun cuando haya indicios de que estas percepciones son falsas, aun así, continúan.
- *Trastorno del pensamiento*: son alteraciones en el procesamiento del pensamiento se suele notar en la forma de expresión y en el lenguaje, que pueden llegar a dificultar la capacidad de comunicación de quién las está padeciendo.

**Síntomas negativos:** son asociados a la interrupción de los comportamientos y de las emociones en condiciones normales. Los síntomas que presentan son:

- *Afecto plano*: en la cual la persona no mueve el rostro, se muestra inexpresivo, además de un habla con voz desanimada y monótona.
- *Falta de satisfacción en la vida*: el paciente no se encuentra cómodo con su vida cotidiana, produciéndole un desagrado que lo manifiesta de manera reiterada.
- *Falta de habilidad en sus actividades*: el paciente no puede iniciar ni mantener sus actividades diarias, mostrando un desempeño poco pulcro y desorganizado.
- *Falta de comunicación*: la persona no puede interactuar con su entorno, a pesar de verse forzada a hacerlo.

**Síntomas Cognitivos:** Se caracterizan por ser más sutiles, convirtiéndose en datos difíciles de reconocer, produciendo en ocasiones angustia emocional, por su incapacidad de relacionarse con la vida. Los síntomas cognitivos incluyen:



- *Problemas en el aprendizaje*: el paciente presenta déficit en su concentración y atención, con severos problemas en la memoria, por lo que no cuenta con la habilidad de utilizar la información inmediatamente después de haberla aprendido.
- *Déficit del funcionamiento razonable*: la persona esquizofrénica no puede comprender la información y utilizarla para la toma de decisiones (Aznar *et al.*, 2009)(Jablensky, 2010) (Tancara & Uber, 2013).

No todos los síntomas descritos están presentes en cada uno de los pacientes diagnosticados con esquizofrenia. No son específicos, pues se dan también en otras enfermedades, caracterizadas por una gran heterogeneidad entre los individuos y variabilidad en cada uno de ellos a lo largo del tiempo. Existen diversos tipos de esquizofrenia, cada uno con sus particularidades, aunque en muchos casos pueden confundirse síntomas de una con otra. La clasificación según el manual de diagnóstico de la *American Psychiatric Association: DSM-IV (Diagnostic and statistical manual of mental disorders)* es (Pichot *et al.*, 2002) (Tancara & Uber, 2013) (Valle, 2020) :

**Esquizofrenia paranoide**: se presentan delirios, siendo los más comunes los de persecución; además de alucinaciones auditivas, ansiedad, ira y violencia. Sin embargo, la persona no sufre un comportamiento desorganizado, ni cambios afectivos, es decir, que en la mayor parte de los casos solo se presentan síntomas positivos, mientras que los síntomas negativos y cognoscitivos no se desarrollan

**Esquizofrenia catatónica**: se presentan alteraciones psicomotoras, como la presencia de un trastorno del movimiento, llegando incluso a producirse inmovilidad del sujeto, además de comportamiento negativo y aislamiento social, también se presentan movimientos poco

normales, tales como muecas, posturas extrañas o movimientos estereotipados y en algunas ocasiones puede que el paciente en el momento de un intercambio verbal copie lo que dice o hace la otra persona

**Esquizofrenia desorganizada:** se caracteriza porque presenta lenguaje y comportamiento desorganizado, con ideas delirantes que giran en torno a temas incoherentes. A diferencia del tipo paranoide, la persona presenta una afectividad aplanada, en la cual parece sentirse decaído, pudiendo abarcar diferentes grupos etarios, inclusive infantes

**Esquizofrenia hebefrénica:** la característica más significativa de este tipo de esquizofrenia es que se presenta a una edad temprana (12 y 13 años), lo cual se confunde muchas veces con algún tipo de retraso mental; los síntomas encuentran en relación con una enfermedad psiquiátrica ya que el individuo sufre de delirios, mantiene una afectividad plana y tiene una grave alteración de su conducta

**Esquizofrenia indiferenciada:** “Cajón de sastre” reservado para aquellas esquizofrenias que no entran en ninguna de las cuatro categorías mencionadas anteriormente.

**Esquizofrenia residual:** Ausencia de sintomatología de las esquizofrenias descritas antes, o su aparición es de forma tenue.

### 2.3 Epidemiología

La esquizofrenia es una enfermedad de precoz aparición en la vida, generalmente comienza durante la adolescencia o la adultez temprana y tiende a presentar un curso crónico fluctuante acompañado de incapacidad que se dificulta aún más debido a la no precisión de su etiología (WHO / world health organization, 2022).

Los trastornos mentales constituyen una patología que se presenta en todas las culturas, apareciendo a cualquier edad. En términos absolutos, se estima que cada año, 450 millones de personas en el mundo van a sufrir algún problema que podría catalogarse como trastorno mental o de conducta; constituyen, por tanto, una serie de procesos patológicos que requieren asistencia sanitaria especializada (Díaz *et al.*, 2018). La esquizofrenia afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo, con una incidencia anual de aproximadamente 1 por cada 1.000 habitantes (Alexis *et al.*, 2017), sin embargo, no es tan común como muchos otros trastornos mentales. Es más frecuente en hombres (12 millones) que en mujeres (9 millones). Asimismo, los hombres desarrollan esquizofrenia generalmente a una edad más temprana (*WHO / world health organization*, 2022).

Las tasas de mortalidad de quienes padecen trastornos mentales son altas, en la EZQ; el riesgo global de muerte es 1.6 y 1.4 veces mayor, en hombres y mujeres respectivamente, comparado con las de la población general (Torres De Galvis, 2018) y entre 2 y 2,5 veces más probabilidades de morir a una edad temprana que el conjunto de la población. Esto se debe por lo general a complicaciones físicas, problemas cardiovasculares, metabólicos e infecciones y el suicidio como resultado extremo, pero no poco común en personas con trastornos mentales no tratados (*WHO / world health organization*, 2022). México se encuentra en un rezago importante, en la atención que brinda a la salud mental, puesto que, si bien se estima que alrededor del 15% de la población del país padece algún trastorno de este tipo, sólo 2.5% de los pacientes se encuentran bajo supervisión de algún especialista, o al amparo de alguna institución de atención especializada (Castro *et al.*, 2014).

## **2.4 Fisiopatología de la Esquizofrenia**

A pesar de los avances en el conocimiento de las bases biológicas de la conducta, los mecanismos neurobiológicos precisos involucrados en la EZQ permanecen prácticamente desconocidos por lo que existen varias hipótesis sobre la etiología en el desarrollo de esta enfermedad compleja y multifactorial (Mccutcheon *et al.*, 2019). A continuación, se explicarán las hipótesis que tomaron lugar en el presente estudio.

### **2.4.1 Hipótesis Dopaminérgica**

La dopamina es una amina biógena que se desempeña como neurotransmisor en el SNC. Se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina, lo que se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos. En el primero de ellos, la enzima limitante, la tirosina hidroxilasa, convierte la L-tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Después, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos convierte la L-DOPA en 3,4-dihidroxifeniletilamina (dopamina-DA). Ambos pasos se llevan a cabo en el citosol de la terminal dopaminérgica (Avila-rojas & Pérez-neri, 2017). La DA, en el sistema nervioso periférico se relaciona con la modulación de la función cardíaca, el tono vascular y la motilidad gastrointestinal. En el SNC, participa en la regulación de la función motora, la emotividad y la afectividad por lo que se encuentra implicada en trastornos neurológicos y psiquiátricos como la esquizofrenia (Avila-rojas & Pérez-neri, 2017). La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia se propuso por primera vez en la década de 1960, cuando se descubrió que la clorpromazina, el primer fármaco antipsicótico que fue exitoso en tratar los síntomas positivos (Yang & Tsai, 2017).

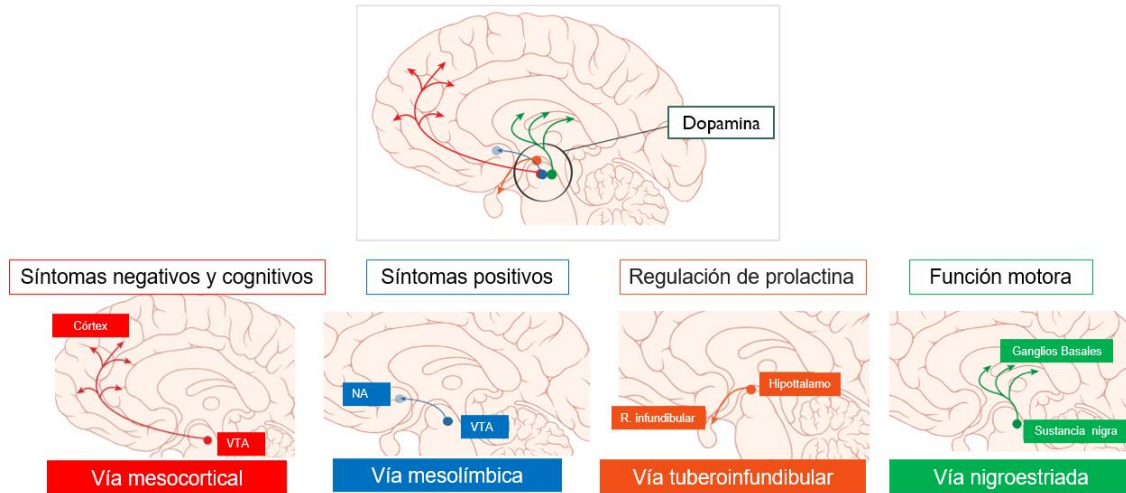
Esta hipótesis sostiene que los síntomas de la esquizofrenia se deben a alteración de receptores de las familias D1 y D2, al exceso de DA, la elevada sensibilidad a este neurotransmisor y una desregularización del transportador a dopamina (DAT) (Callado *et al.*, 2009) (Mané, 2013). Existen 4 vías principales en el desarrollo de la esquizofrenia según la hipótesis dopaminérgica (Figura 1):

- **Vía Mesolímbica** (área tegmental ventral - área límbica, Núcleo accumbens): Esta vía se encuentra asociada con la modulación de las respuestas de la conducta frente a estímulos de gratificación emocional y motivación, es decir, es el mecanismo cerebral que media la recompensa. Teóricamente la hiperactividad dopaminérgica de esta vía explicaría la producción de los síntomas positivos en las psicosis y puede desempeñar un papel en las conductas agresivas y hostiles de la esquizofrenia. Quizás, la mayor incidencia de abuso de sustancias en la Esquizofrenia podría explicarse como un intento de potenciar la función deficitaria de este sistema de recompensa o centro del placer mesolímbico.
- **Vía Mesocortical** (área tegmental ventral – corteza ventromedial): En esta vía se encuentra la modulación de las respuestas relacionadas con las emociones, afectividad y motivación, por lo que, una hipofunción dopaminérgica aquí podría explicar parte de los síntomas negativos y afectivos observados en la esquizofrenia. Por otro lado, cuando este neurotransmisor se proyecta a la corteza dorsolateral se relacionan con la regulación de funciones cognitivas, por lo que algunos de los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia pueden ser debidos a un déficit de actividad dopaminérgica a este nivel.

- **Vía Nigroestriada** (sustancia negra - ganglios basales o estriado): Esta vía está implicada en el control de la función motora, haciendo parte del sistema extrapiramidal. Cuando la esquizofrenia no es tratada, se preserva el funcionamiento normal de esta vía. Sin embargo, el principal tratamiento para la esquizofrenia se encuentra basado en medicamentos antipsicóticos, los cuales bloquean los receptores tipo D2 en esta vía, generando trastornos de movimiento como la enfermedad de Parkinson (con temblor, rigidez), acatisia y distonía, provocados por la hipofunción de DA. Cuando la dopamina está en exceso en esta vía, se producen movimientos hiperkinéticos como corea, tics o discinesias.
- **Vía tuberoinfundibular** (hipotálamo – región infundibular): Esta vía regula la secreción de prolactina a la circulación sanguínea inhibiendo su liberación, participando en funciones neuroendocrinas. Así mismo, como en la vía nigroestriada en pacientes que no reciben tratamiento el funcionamiento de esta vía es normal. Sin embargo, el tratamiento con antipsicóticos eleva los niveles de prolactina, pudiendo surgir efectos secundarios (galactorrea, amenorrea y disfunción sexual). (Ruiz *et al.*, 2010) (Lahera *et al.*, 2013)

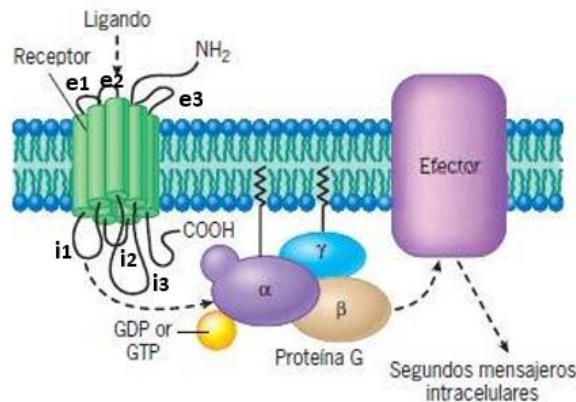
Durante su paso por el espacio extracelular, la DA permite la transmisión sináptica a través de una serie de receptores. Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores (con más de 100 miembros) acoplados a una proteína G heterodimérica (Figura 2). En esta familia de receptores, el reconocimiento del neurotransmisor y la molécula efectora (típicamente una enzima que produce un segundo mensajero difusible) son entidades diferentes, acopladas entre sí por una proteína con capacidad para unir nucleótidos de guanina (proteína G) que poseen 7 dominios

transmembranales, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno, y están acoplados a sistemas de transducción intracelulares mediante proteínas G (Avila-Rojas and Pérez-Neri, 2017).



**Figura 1.** Vías dopaminérgicas. VTA, área tegmental ventral; NA, núcleo accumbens; (Modificado de Guzmán, 2020)

Los 7 dominios intramembranales están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas (i1, i2, i3) y extracelulares (e1, e2, e3) y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado.



**Figura 2.** Estructura de proteína G acoplada a receptores dopaminérgicos (Modificado Bahena-Trujillo *et al.*, 2000)

Se conocen 5 receptores de DA y se clasifican farmacológicamente en dos familias, tipo D1 y tipo D2, que a su vez comprenden los subtipos D1 y D5, y los subtipos D2, D3 y D4, respectivamente (Avila-rojas & Pérez-neri, 2017). La teoría dopaminérgica de la psicosis postula que la hiperactividad de las vías dopaminérgicas mesolímbicas y las alteraciones de los receptores de la familia D1 y D2 y del espacio pre-sináptico son decisivas para la expresión clínica de los síntomas psicóticos. Por un lado, la hiperfunción dopaminérgica subcortical en las proyecciones mesolímbicas resultaría en la hiper-estimulación de los receptores D2 (D2, D3 y D4) con aparición de sintomatología positiva y por otro lado, una hipo-función en las proyecciones dopaminérgicas mesocorticales a la corteza prefrontal, resulta en la hipo-estimulación de los receptores D1(D1y D5) con la consecuente sintomatología negativa, afectiva y cognitiva (Lahera *et al.*, 2013).

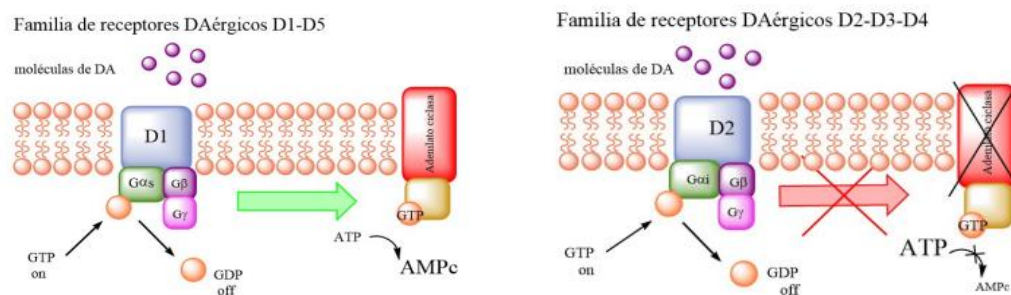
Los receptores del subtipo D1 (D1 y D5) en su subtipo D1 se componen de 466, mientras que los D5 de 477 aminoácidos. Los del subtipo D1, son los más ampliamente expresados en el SNC, encontrándose preferencialmente en el estriado, corteza cerebral, tubérculo olfatorio y Núcleo Accumbens, con menos expresión en la amígdala, hipotálamo y tálamo (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

Poseen una región carboxilo terminal que es aproximadamente 7 veces más larga que la correspondiente a los receptores de la familia D2 (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Los receptores de la familia D1 se caracterizan principalmente por su acople a proteínas G $\alpha$ s, con la consecuente producción del segundo mensajero monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) por estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilato ciclasa, localizada en la



membrana celular, la activación del receptor D1 induce la producción de otros segundos mensajeros (Ortega-gutiérrez, 2013).

Los receptores del subtipo D2 se conforman por 443 aminoácidos. Los del subtipo D3 se encuentran conformados por 400 aminoácidos, y se ha mostrado que tienen varias isoformas, dentro de las más importantes se encuentran, la forma larga llamada “D3 long” y la forma corta llamada “D3 short”, cuya diferencia entre ellos es de solo 21 aminoácidos en la tercera asa intracelular, y finalmente, los del subtipo D4 que consta de 419 aminoácidos y posee 9 isoformas (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Los receptores de la familia D2 se caracterizan principalmente por su acople a proteínas G $\alpha$ i/o, inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa, disminuyendo la producción de AMPc, con ello no se lleva a cabo la activación de PKA (cinasa de proteína activada por AMPc), por lo tanto por un lado se disminuye la entrada de Ca<sup>+2</sup> a la célula y con ello se evita la fusión vesicular a la membrana, disminuyendo la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico y por otro lado reduce la excitabilidad neuronal por incrementos en la corriente entrante de K<sup>+</sup>, por lo que estaría modulando así las corrientes iónicas (Figura 3) (Ortega-Gutiérrez, 2013).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2 (Tomado de. Marrero, 2017a)

La DA ejerce sus funciones a través de receptores post-sinápticos y pre-sinápticos, y su disponibilidad a nivel de los receptores está regulada por el transportador de dopamina (DAT), encargado de la recaptación de este neurotransmisor desde el espacio extracelular hacia el interior de la neurona pre-sináptica después de su liberación. La disfunción de dicho transportador está relacionada con la enfermedad de Parkinson y trastornos psiquiátricos como esquizofrenia y déficit de atención con hiperactividad. La actividad de DAT está regulada por modificaciones postraduccionales e interacción con diferentes proteínas pre-sinápticas y auto-receptores dopaminérgicos D2 y D3 que facilitan el reclutamiento de DAT en la membrana o su internalización para ser reciclado o degradado (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

#### **2.4.2 Hipótesis Glutamatérgica**

Para poder explicar la complejidad de la esquizofrenia, existen algunos elementos que se basan en la alteración del sistema dopaminérgico, pero que también tienen lugar modificaciones en otros sistemas de neurotransmisión, como las que involucra al glutamato (GLU)(Callado *et al.*, 2009). El glutamato es un neurotransmisor excitatorio capaz de actuar sobre cualquier neurona cerebral (Ruiz *et al.*, 2010). Este aminoácido es el principal excitatorio del SNC (Neira & Ortega, 2004). Se encuentra en tres compartimentos celulares diferentes: neuronas presinápticas, neuronas postsinápticas, y en la glía, lo que ha servido para caracterizar la denominada “sinapsis tripartita glutamatérgica”. De forma integrada, esta sinapsis neuronal-glial es compleja e integra la liberación, recaptación e inactivación del glutamato, sus diferentes receptores y los transportadores de aminoácidos (Gibert-Rahola, 2014).

Se sintetiza a partir de la desaminación de la glutamina, proveniente de las células gliales, mediante la glutaminasa o por la transaminación de alfa cetoácidos del ciclo de Krebs, como el alfa cetoglutarato, que es aminado a partir del aspartato, para convertirse en glutamato. El esqueleto carbonado del aspartato, una vez desaminado, es convertido en oxalacetato, reacción mediada por una transaminasa. El glutamato se almacena en vesículas que se liberan, posteriormente, al espacio intercelular para actuar sobre receptores específicos (Gibert-Rahola, 2014). Existen 4 vías glutamatérgicas específicas, con relevancia en la fisiopatogenia de la Esquizofrenia (Fig.4):

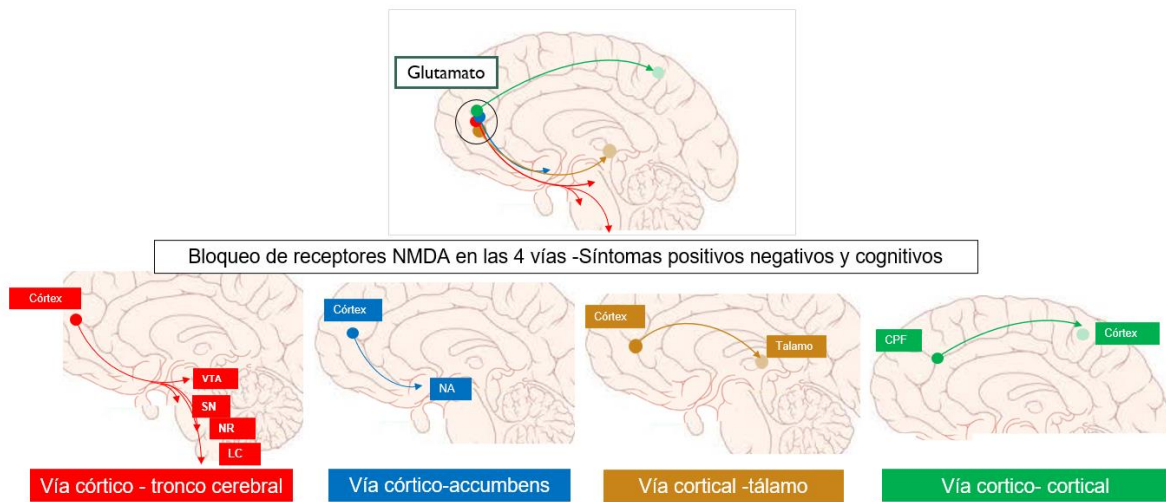
- **Vía corticotroncoencefálicas:** Esencial en la regulación de liberación de otros neurotransmisores. Se proyecta desde las neuronas piramidales de la corteza prefrontal a centros del troncoencéfalo donde los Núcleos del Rafe (NR) son responsables de la neurotransmisión serotoninérgica, por lo que esta proyección se encuentra estrechamente relacionada con el sistema dopaminérgico y los efectos de la serotonina en la corteza prefrontal a través de sus receptores 5HT<sub>2A</sub>. Se ha sugerido un aumento del tono serotoninérgico central en los pacientes con esquizofrenia, diversos autores proponen que la sintomatología negativa de la esquizofrenia reflejaría en parte, una hipofunción dopaminérgica en la corteza prefrontal, debida al efecto inhibitor que tendría la serotonina en esa zona (Gibert-Rahola, 2014). Por otro lado el Locus Coeruleus (LC) se encarga de la neurotransmisión noradrenérgica; la Sustancia negra (SN) y Área Tegmental Ventral (ATV) la dopaminérgica (Ruiz *et al.*, 2010). Por lo que la proyección glutamatérgica desde esta vía al ATV comunica específicamente con la vía dopaminérgica mesolímbica mediante una interneurona GABAérgica. Cuando se

activa esta vía, se produce la liberación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) el cual, a su vez, inhibe la liberación de DA en la vía mesolímbica, por lo que se considera que la vía ascendente glutamatérgica actúa como un freno de la vía mesolímbica. Cuando hay una hipoactividad glutamatérgica mediada por los receptores a Glu tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) en la vía descendente o el “freno” de la transmisión GABAérgica está alterado, se produce una hiperactividad DA en el sistema mesolímbico que será la causa de los síntomas positivos de la psicosis (Gibert-Rahola, 2014).

- **Vía córtico-accumbens:** forma parte del brazo descendente del haz córtico-estriado-tálamo-cortical (CSTC). Habitualmente las proyecciones glutamatérgicas descendentes finalizan sobre neuronas GABAérgicas en el estriado, que a su vez proyectan al tálamo creando un filtro sensorial. La hipofunción del receptor NMDA en los haces CSTC provoca la reducción de la función inhibitoria del filtro talámico, lo que puede dar lugar a un exceso de información sensorial en la corteza, apareciendo de esta manera síntomas positivos de la esquizofrenia. Además el efecto de la hiperactividad dopaminérgica mesolímbica explicado con anterioridad, sobre los haces CSTC reduce aún más la efectividad del filtro talámico, haciendo que demasiada información escape a la corteza cerebral de manera difusa, contribuyendo de esta manera a la producción de alucinaciones y otros síntomas corticales como los negativos, afectivos y cognitivos (Gibert-Rahola, 2014).
- **Vías corticotalámicas:** Es una vía glutamatérgica que aporta entradas sensoriales al tálamo desde la corteza. Una hipofunción de los receptores de NMDA a este nivel provoca una desregulación de la información que llega a la corteza debido a una

sobrecarga y malfuncionamiento de las entradas glutamatérgicas corticales directamente desde el filtro talámico (Gibert-Rahola, 2014).

- **Vías corticocorticales:** Las neuronas piramidales se conectan entre sí mediante glutamato. Teniendo en cuenta la hipótesis de la esquizofrenia del receptor glutamatérgico hipofuncionante, existiría una comunicación corticocortical disfuncional caótica, pudiendo dar lugar a la aparición de síntomas de esquizofrenia (Gibert-Rahola, 2014)



**Figura 4.** Vías glutamatérgicas. VTA, área tegmental ventral; SN, sustancia negra; NR, núcleos rafe; LC, Locus coeruleus; NA, núcleo accumbens; CPF, corteza prefrontal (Modificado de Guzmán, 2020).

Mediante las proyecciones corticotroncoencefálicas se desarrolló una hipótesis en la que los receptores NMDA podrían ser hipoactivos en la esquizofrenia, resultando una hiperactividad dopaminérgica mesolímbica con aparición de sintomatología positiva. Asimismo, se observó que cuando los receptores NMDA son hipofuncionantes debido a la acción de antagonistas como los “anestésicos disociativos” específicamente la fenciclidina (PCP), además de los síntomas

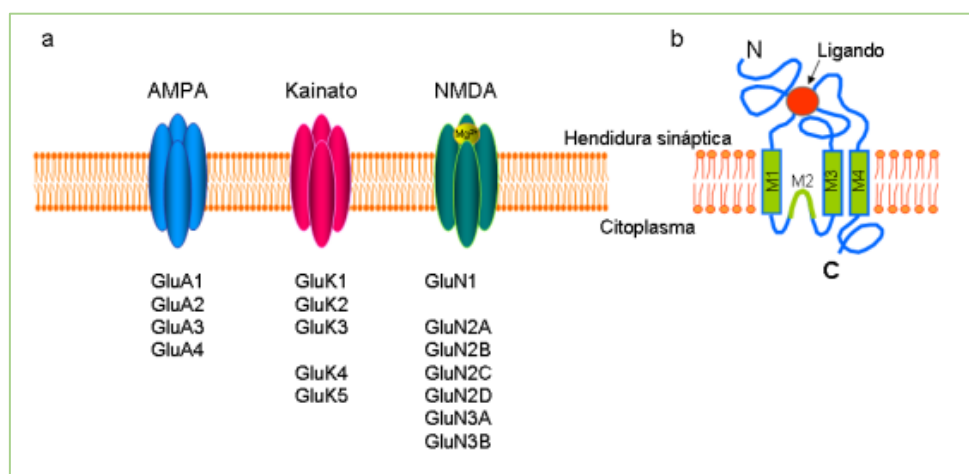
positivos descritos aparecían síntomas negativos, cognitivos y afectivos típicos de este trastorno (Ruiz *et al.*, 2010).

El GLU ejerce su acción a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Gibert-Rahola, 2014). Los primeros son proteínas integrales de membrana que, al ser activados por un agonista, funcionan como canales catiónicos no selectivos y median repuestas sinápticas rápidas entre neuronas. Inicialmente fueron descubiertos en mamíferos, en los cuales se clasificaron en tres tipos, de acuerdo con sus propiedades farmacológicas (N-metil-D-aspartato) NMDA, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5 metil-4-isoxazol (AMPA) y ácido kaínico (KA), de los cuales los mayormente implicados en la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia son los tipos NMDA (Ahmed *et al.*, 2020).

Cada subunidad de los receptores inotrópicos posee 4 dominios: un dominio amino-terminal extracelular, un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio carboxi-terminal intracelular. El dominio transmembrana está formado por tres hélices que atraviesan completamente la membrana plasmática (M1, M3 y M4) y un segmento (M2) que se introduce parcialmente en la membrana para retornar al espacio intracelular, y que forma las paredes del poro. El dominio de unión al ligando está formado por los segmentos extracelulares S1 y S2. S1 se encuentra entre el dominio amino-terminal y el primer segmento transmembranal M1, y S2 entre los segmentos M3 y M4. El dominio carboxi-terminal es el más variable, en términos de secuencia peptídica y longitud, entre las diferentes subunidades (Fig.5b). Contiene lugares de fosforilación y regiones de unión a proteínas intracelulares, implicados en la regulación del tráfico y la función del receptor (Marco *et al.*, 2011).

En las neuronas corticales principales maduras, los NMDAr median la neurotransmisión excitatoria glutamatergica y desempeñan un papel importante en el aprendizaje y la memoria a través de la inducción de plasticidad sináptica (Ahmed *et al.*, 2020).

Estos son complejos receptores heterotetraméricos que se componen de uno o dos GluN1 subunidades indispensables (codificadas por el gen GRIN1) y dos o tres GluN2 (A-D); codificadas por GRIN2 (A-D) y/o GluN3 (A-B); codificado por subunidades GRIN3 (A B).



**Figura 5.** Receptores ionotrópicos del glutamato. **a)** Subunidades de receptores. **b)** Dominios receptores (Tomado de Marco *et al.*, 2011)

Son canales catiónicos, cuya activación requiere la unión simultánea del agonista L-glicina o D-serina (para GluN1 o GluN3) y glutamato (para subunidades GluN2) (Fig. 5a), así como despolarización de la membrana para eliminar el bloqueo de  $Mg^{2+}$  y la unión adicional de los coagonistas glicina y glutamato permitiendo la entrada dependiente del voltaje de iones  $Na^{+}$  y  $Ca^{2+}$  y la salida de iones  $K^{+}$ . Esta activación dual mediante la unión de ligandos y la despolarización de la membrana hace que el receptor NMDAr se adapte de forma óptima para funcionar como detector de coincidencias (Adell, 2020) (Nakazawa & Sapkota, 2019).

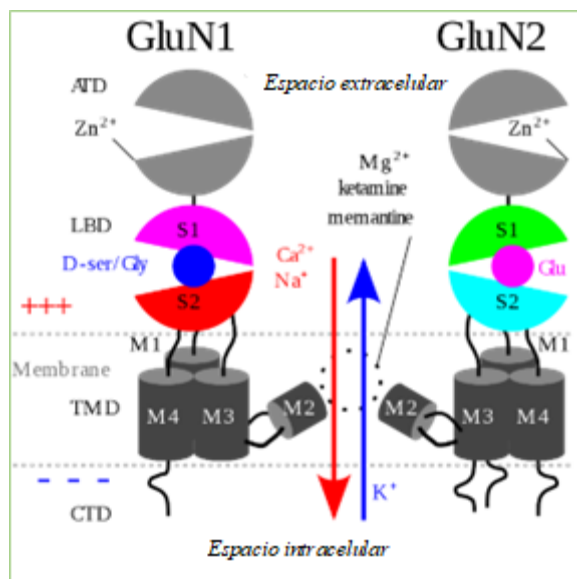
Los receptores NMDA integrados por subunidades NR1 y NR2 tienen alta permeabilidad al calcio, la presencia de la subunidad GluN3A confiere una reducción en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y una menor sensibilidad al bloqueo del canal por  $\text{Mg}^{2+}$ . Por ello, esta subunidad considerada atípica actúa dominando de forma negativa la función del receptor. Este comportamiento es crucial durante el desarrollo para establecer una correcta conectividad sináptica, y permite el establecimiento y consolidación de circuitos neuronales adecuados. (Marco *et al.*, 2011)

La activación de NMDAr da como resultado la apertura del canal iónico que no es selectivo para los cationes. Si bien la apertura y el cierre del canal de iones se regula principalmente por la unión del ligando, el flujo de corriente a través del canal de iones depende del voltaje. Magnesio extracelular ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y los iones zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) pueden unirse a sitios específicos en el receptor, bloqueando el paso de otros cationes a través del canal iónico abierto. La despolarización de la célula desaloja y repele los iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  del poro, lo que permite un flujo dependiente del voltaje de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hacia la célula y el potasio ( $\text{K}^+$ ) fuera de la celda. Se cree que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los NMDAr en particular es crítico en la plasticidad sináptica, un mecanismo celular para el aprendizaje y la memoria, debido a las proteínas que se unen y son activadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  iones. Sustancias como MK-801, ketamina, PCP y memantina antagonistas cuyos sitios de unión están dentro de la región de poro del canal iónico (Marco *et al.*, 2011) (Fig.6).

Tanto los receptores NMDAr y AMPAr funcionan de forma coordinada y están ubicados estrechamente en las células postsinápticas. La activación de AMPAr producen la



despolarización primaria de la membrana, necesaria para retirar el bloqueo por  $Mg^{2+}$  de los NMDAr y permitir así la entrada de  $Ca^{2+}$ .



**Figura 6.** Receptor NMDA subunidades NR1/NR2. Extremo aminoterminal extracelular, (ATD.); Ligando extracelular, (LBD.); Porción transmembrana, (TMD); Extremo carboxiterminal intracelular (CTD) (Tomado de internet [https://hmn.wiki/es/NMDA\\_receptor](https://hmn.wiki/es/NMDA_receptor)).

Ambos tipos de receptores interactúan con proteínas adaptadoras a través de las cuales se anclan en las densidades postsinápticas a otras proteínas como quinasas, fosfatasa, transportadores y a receptores metabotrópicos de glutamato donde actúan formando grandes complejos macromoleculares de señalización (Giménez, 2012).

La hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica, no son mutuamente excluyentes y la interacción entre ambos sistemas, tiene como consecuencia que la elevación de los niveles de glutamato y de su co-agonista glicina pueda ser beneficioso en el tratamiento de la esquizofrenia. Esto es debido a que la hipofunción de NMDAr podría ser responsable de una situación hiperdopaminérgica. El flujo de DA aumenta tras el tratamiento con agentes antagonistas de NMDA y, por otra parte, agentes antipsicóticos atípicos revierten los efectos psicomiméticos

producidos por antagonistas del receptor de glutamato. Estas acciones cruzadas sobre sinapsis complejas, en las que en una misma dendrita coinciden contactos de neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas, dan como resultado cambios en la morfología de las neuronas y en la remodelación de circuitos (Giménez, 2012) (Gibert-Rahola, 2014).

Además de la hipótesis dopaminérgica y glutamatérgica, se plantea que la pérdida de homeostasis celular en algún punto del desarrollo de la esquizofrenia es provocada por alteraciones oxidantes e inflamatorias que contribuyen de manera importante en la etiología de esta, por lo que son consideradas importantes factores de investigación.

### **2.4.3 Inflamación y estrés oxidante en la esquizofrenia**

Otro mecanismo fisiopatológico al cual se le atribuye una participación importante, en la esquizofrenia es la neuroinflamación. Se propone un estado pro-inflamatorio subyacente que actuaría como predisponente durante el neurodesarrollo para el establecimiento de la enfermedad (Monji et al., 2013), ya que un proceso inflamatorio en la patogenia de la esquizofrenia, representa un “desafío” inmune prenatal durante el segundo trimestre de la gestación, siendo clave para el desarrollo de esquizofrenia. Se sugiere que una infección por un patógeno en sí no es el mecanismo fundamental que desencadena este trastorno, sin embargo, la respuesta inmune alterada de la madre ante una infección persistente y crónica por este patógeno sí puede relacionarse con un incremento en el riesgo de padecer la enfermedad al nacimiento.

La concentración de mediadores de la inflamación, en la esquizofrenia, son relativamente bajos en comparación con otras enfermedades inflamatorias, se cursa con una activación de bajo grado

de esta que está implicado en un peor pronóstico de la esquizofrenia en relación con los síntomas psicóticos positivos y negativos, la afectación cognitiva y la pérdida de volumen cerebral. La asociación entre factores inflamatorios y un peor rendimiento cognitivo en primeros episodios psicóticos subraya la importancia inflamatoria en el peor pronóstico de los trastornos psicóticos en fases tempranas de la enfermedad, así como también niveles elevados de citocinas proinflamatorias en las recaídas psicóticas (Soria, Uribe, Salvat-pujol, *et al.*, 2018). El rol de la inflamación mediante la regulación de citocinas que juegan un papel importante en la aparición de síntomas psicóticos positivos en sujetos con esquizofrenia, por un lado los macrófagos crónicamente activados producen citocinas, como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-2 (IL-2), los factores de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN)- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , mientras que la microglía aduce que las citocinas proinflamatorias y los radicales libres sean liberados por esta activada del sistema nervioso central, ocasionando una neurogénesis anormal, degradación neural y anomalías de la sustancia blanca, las que desempeñan un papel decisivo en la patogénesis de la esquizofrenia (Manu *et al.*, 2014). Se ha postulado que una convergencia entre los cambios neuroinflamatorios de diversas citocinas y los receptores de dopamina y glutamato lleva a procesos cognitivos implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia (Girgis *et al.*, 2014) (Ramírez-jirano *et al.*, 2019).

Paralelamente, el estrés oxidante es un mecanismo subyacente de la enfermedad (Riegel *et al.*, 2010) y se ha propuesto que los efectos nocivos de la inflamación en la esquizofrenia pueden estar mediados por este mecanismo. Se ha demostrado que niveles anormales de metabolitos de estrés oxidante en tejido periférico y en tejido nervioso, están relacionados con un proceso inflamatorio exacerbado con excitotoxicidad, disfunción mitocondrial y agregación proteica

anormal que inducen neurodegeneración. La activación o incremento de la densidad de la microglía puede conllevar la síntesis de prostaglandinas, citocinas, especies reactivas del oxígeno y marcadores de peroxidación lipídica como MDA, causando muerte celular (Soria *et al.*, 2018).

La alteración en el equilibrio oxido-reducción se produce cuando los mecanismos celulares de defensa antioxidantes son insuficientes para inactivar las especies reactivas de oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) que se generan de forma fisiológica en el metabolismo oxidativo celular o de la exposición ambiental a factores prooxidantes (Rossi- Mañón, 2016) (Maldonado *et al.*, 2010). El oxígeno ( $O_2$ ) es necesario para la vida de la mayoría de los seres vivos, ya que actúa en la respiración mitocondrial como aceptor final de 4 electrones, dando lugar a 2 moléculas de agua y la formación de ATP. Cuando la reducción del  $O_2$  es parcial, se generan ERO. De este modo, cuando el  $O_2$  capta un electrón, se produce el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), que puede dar lugar a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al radical hidroxilo (OH). Otro radical es el óxido nítrico (NO), que al reaccionar con el  $O_2^-$  forma ERO y ERN como el anhídrido nitroso ( $N_2O_3$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Hernández-Espinosa *et al.*, 2019).

Aunque las ERO poseen funciones beneficiosas en la transducción de señales o en la protección frente a patógenos al poseer un importante papel como modulador de la inflamación, también pueden provocar un daño oxidante molecular en lípidos, proteínas y en el ADN cuando sobrepasan la capacidad de los mecanismos antioxidantes. Así mismo las ERN donde el NO actúa como un regulador esencial de la presión sanguínea, como protector cardiovascular, como inhibidor de la agregación plaquetaria y también en la adhesión leucocitaria sin embargo, resulta perjudicial a niveles elevados, ya que afecta el funcionamiento celular mediante la oxidación de

proteínas, activa al factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) que es un factor de transducción y mediador de inflamación por inducir a la ciclooxigenasa (COX), también está involucrado en la apoptosis neuronal (Hernández-Espinosa *et al.*, 2019)

Los mecanismos antioxidantes consisten en la eliminación o la inhibición de la formación de las ERO y ERN mediante enzimas antioxidantes intracelulares como el glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa. (Rossi- Mañón, 2016). (Maldonado *et al.*, 2010). El estrés oxidante además de su estrecha relación con la neuro-inflamación, provoca alteraciones en los niveles de neurotransmisores, algunos de los cuales son clave en esquizofrenia siendo generadas por el estrés oxidativo y la disfunción de la membrana, lo que sugiere una conexión entre el estado oxidativo y la fisiopatología de múltiples neurotransmisores alterados en la esquizofrenia (Ramírez-jirano *et al.*, 2019).

Debido a los múltiples factores involucrados en el desarrollo de la esquizofrenia como se han mencionado anteriormente, se ha hecho difícil encontrar un tratamiento que abarque de manera global todos los síntomas que presenta la enfermedad, sin embargo, el principal tratamiento se encuentra basado en antipsicóticos que están direccionados principalmente a los síntomas positivos de esta.

## **2.5 Fármacos antipsicóticos**

El tratamiento farmacológico de la esquizofrenia engloba un amplio abanico de medicamentos, algunos de ellos con una larga experiencia de utilización y con importantes efectos secundarios (Gómez Ayala, 2006). Hasta mediados de la década de los cincuenta no se disponía de fármacos

activos para el tratamiento de las enfermedades psiquiátricas graves. En 1952, la aparición de las fenotiazinas en el tratamiento de las psicosis graves, como la esquizofrenia o el síndrome maniaco-depresivo, revolucionó el campo de la terapéutica e inauguró la era de la psicofarmacología. Posteriormente, se fueron sintetizando nuevos derivados, como la prometazina, la piritiazina, la dietazina, la etopropazina y, finalmente, la clorpromazina lo que hoy conocemos como antipsicóticos o neurolepticos. En la actualidad, son un grupo de fármacos de uso frecuente en el tratamiento de procesos psiquiátricos (demencia, esquizofrenia o trastorno bipolar). (Bermejo Ceruelo & Sonsoles Garcia, 2007).

El tratamiento de la esquizofrenia ha evolucionado a lo largo de la segunda mitad del siglo pasado, principalmente gracias al desarrollo de los fármacos antipsicóticos (Tajima *et al.*, 2009). Algunos de estos medicamentos tienen un mecanismo de acción común (aunque no único): el efecto anti-dopaminérgico. Las diferencias entre ellos se deben a su afinidad por los distintos receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos, así como por otros subtipos de receptores noradrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos. Los antipsicóticos típicos o de primera generación como el haloperidol (HAL), flufenazina y trifluoperazina entre otros, son los más antiguos, con acción fundamentalmente anti-dopaminérgico reducen la actividad de la dopamina, bloqueando el receptor dopaminérgico D2 por lo que resultan ser eficaces en el control de síntomas psicóticos positivos (delirios y alucinaciones). Sin embargo, son poco eficaces sobre los negativos (depresión, aislamiento social). La eficacia terapéutica de los distintos antipsicóticos típicos es similar, pero la respuesta en cada paciente puede ser diferente según el fármaco utilizado. Esta variabilidad individual no se plasma en diferencias relevantes en los porcentajes globales de respuesta a cada fármaco; sin embargo, sí se observan diferencias

en el perfil de reacciones adversas agudas y crónicas, como rigidez, catalepsia y sedación y, en menor medida, los efectos anticolinérgicos y la hipotensión ortostática (éstas adquieren mayor relevancia en pacientes geriátricos) (Tabla 1). (Gómez Ayala, 2006) (Bermejo & Rodicio, 2007) (Bernardo & Surgonà, 2008).

Debido al poco alcance que tenían los fármacos típicos en amplio rango de síntomas relacionados con la esquizofrenia. La investigación se encamino a solventar las carencias de estas, por lo que se condujo a un segundo hito en la psicofarmacología de la esquizofrenia: en 1959 aparece un nuevo antipsicótico, la clozapina, estudiado inicialmente como antidepresivo, aunque su efecto antipsicótico pronto se hizo evidente y se comercializo en 1990. A esta sustancia le siguieron distintos compuestos cuyas características diferenciales respecto a los antipsicóticos típicos son: mayor eficacia en el tratamiento de pacientes con esquizofrenia resistente y en los síntomas negativos de esta enfermedad, a lo que se une su carencia de efectos extrapiramidales. Estos fármacos (clozapina, olanzapina, risperidona, etc.) son los denominados antipsicóticos atípicos o de segunda generación.(Gómez Ayala, 2006).

La eficacia de los antipsicóticos típicos esta mediada por el bloqueo de los receptores D2 a nivel límbico, sin embargo, también bloquean estos receptores a nivel estriatal, produciendo la reducción de los movimientos, la disminución de la conducta de exploración y de la catalepsia (respuestas conductuales en modelos animales equivalentes al parkinsonismo). Una característica de los antipsicóticos atípicos es que son más selectivos a las neuronas dopaminérgicas de la vía mesocortical que involucra al núcleo accumbens y parte del sistema estriado ventral, que es la región que media la información de los sistemas que intervienen en

la motivación, la emoción y el movimiento (García-anaya *et al.*, 2001). Los antipsicóticos atípicos como la olanzapina, quetiapina, risperidona, paliperidona, ziprasidona, asenapina y lurasidona, además presentan un antagonismo por los receptores D2 como lo hacen los típicos. También presentan agonismo parcial a este receptor, y antagonismo por receptores serotoninérgicos 5-HT1A. Entre ellos, se ha propuesto que la actividad antagónica de la clozapina sobre los receptores 5-HT1A podrían contribuir a su eficacia contra la ansiedad, depresión y los síntomas cognitivos y negativos de la esquizofrenia. Más allá, se ha propuesto que el antagonismo 5-HT1A contribuye al aumento de la liberación de dopamina prefrontal. Esto podría estar relacionado con su eficacia potencial para los síntomas negativos y la disfunción cognitiva de la esquizofrenia (Tajima *et al.*, 2009).

Aunque los antipsicóticos atípicos por su naturaleza causan menos problemas motores, estos pueden provocar efectos adversos de tipo metabólico como obesidad y síndrome metabólico, sedantes entre otros (Ortiz & De la Mata, 2001). En años más recientes la investigación se ha enfocado al diseño de fármacos multidirigidos, como los antipsicóticos de tercera generación como aripiprazol, brexpiprazol y cariprazina se distinguen entre los antipsicóticos debido a su mecanismo de acción, que no está relacionado con el antagonismo de los receptores de dopamina D2 sino con el agonismo parcial en este receptor. Estos antipsicóticos a menudo se describen como "dopamina estabilizadores".



**Tabla 1.** Efectos secundarios no-deseables de antipsicóticos de primera, segunda y tercera generación. (Bernardo & Surgonà, 2008)(Stepnicki et al., 2020)

Medicamento responsable	Efecto secundario	Síntomas
Antipsicótico primera generación	Parkinsonismo	Rigidez, temblores acinesia y bradicinesia
Antipsicótico de primera generación (de potencia elevada)	Distonía aguda	Contracciones, espasmos musculares involuntarios (torsión de cara, cuello, laringe, ojos, torso)
Antipsicóticos de primera generación	Acatisia	agitación somática, imposibilidad de mantener quietas las piernas y permanecer quieto
Antipsicóticos primera y segunda generación (con menor probabilidad)	Discinesia tardía	Movimientos involuntarios anómalos e hiperkinéticos (especialmente en la región orofacial)
Antipsicóticos primera y segunda y tercera generación	Sedación	Somnolencia diurna
Antipsicóticos primera segunda y tercera generación y bloqueantes $\beta$ de acción periférica	Efectos cardiovasculares	Hipotensión ortostática, taquicardia y prolongación de intervalo QTc
Antipsicóticos segunda y tercera generación	Efectos metabólicos	Obesidad y síndrome metabólico

De hecho, pueden actuar como agonistas totales o parciales, o como antagonistas hacia el receptor D2, dependiendo de nivel extracelular de dopamina. También son agonistas parciales de 5-HT1A receptor, lo que resulta funcionalmente en el bloqueo de este receptor. Otros receptores afectados por antipsicóticos de tercera generación incluyen los receptores D3, 5-HT2A, 5-HT2B y 5-HT7 generando así menos efectos adversos, sin embargo, no existen medicamentos que abarquen todos los síntomas de la esquizofrenia de una manera efectiva, por

lo que los efectos secundarios siguen causando deterioro en la calidad de vida de las personas con dicha enfermedad. En el cuadro 1 se presentan los efectos secundarios más comunes de los antipsicóticos (Stępnicki *et al.*, 2020).

Debido a los efectos secundarios presentados por los medicamentos antipsicóticos prescritos para la esquizofrenia, la investigación de nuevos fármacos que abraquen más síntomas de manera segura permanece en continuo desarrollo, para esto, una herramienta útil en farmacología resulta ser el uso de modelos biológicos.

## **2.6 Modelos biológicos**

Los modelos farmacológicos, tratan de simular los síntomas de la enfermedad mediante el uso de diferentes sustancias, administradas en roedores, bajo diferentes esquemas. Dependiendo de las sustancias que se utilicen, se puede inducir la mayoría de los síntomas del espectro de la EZQ, aunque éstos se presentan por un corto periodo de tiempo comparado con lo que realmente sucede en la EZQ en humanos (Jáquez-cabalceta *et al.*, 2017). Se han podido simular los síntomas positivos, negativos y cognitivos, a través de la manipulación de diferentes vías de neurotransmisión. Entre ellas la dopaminérgica y la glutamatérgica, con resultados relevantes que llevan a la continuación en el análisis de dichas vías, tanto como modelos para la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos, como para un mayor acercamiento a la fisiopatología de este trastorno.

### 2.6.1 Catalepsia inducida con Haloperidol

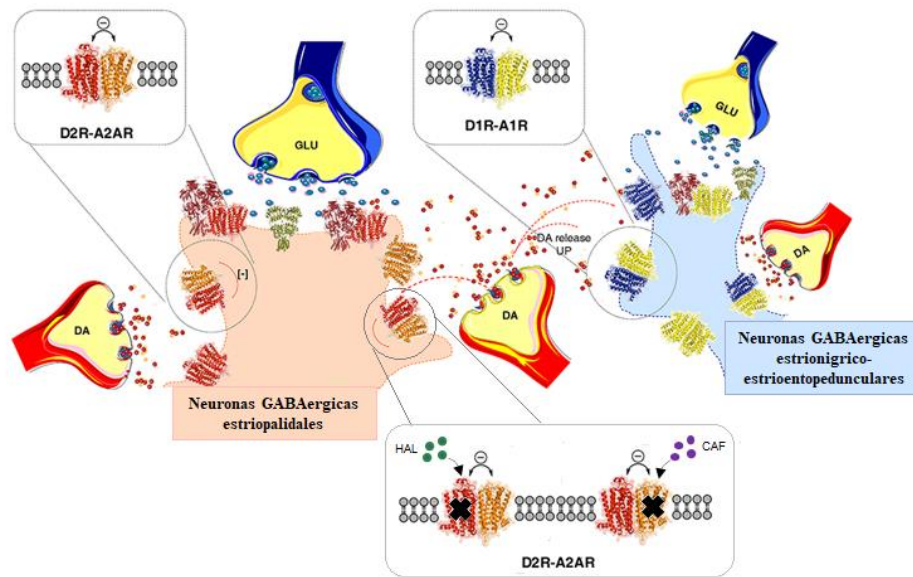
El haloperidol es una butirofenona (antipsicótico de primera generación o típico) sintetizada por Janssen e introducida en terapéutica desde 1958. Se utiliza principalmente en el control de las manifestaciones psicóticas de la esquizofrenia. También se utiliza en el síndrome orgánico cerebral, fase maníaca del desorden bipolar, psicosis atípica, síndrome de Gilles de la Tourette y enfermedad de Huntington. Las reacciones adversas más frecuentemente asociadas con la terapia antipsicótica son los efectos extrapiramidales, pudiendo aparecer en más del 60 por 100 de los pacientes e incluyen: distonías, acatisias y efectos parkinsonianos como temblor, rigidez y en particular la catalepsia. Estos efectos están relacionados con el bloqueo de los receptores dopaminérgicos centrales involucrados en funciones motoras (Zamora *et al.*, 1995).

La catalepsia se define como el mantenimiento a largo plazo de un animal en una postura anormal impuesta externamente (Jain *et al.*, 2015). La catalepsia inducida en roedores mediante la administración de fármacos como haloperidol es un modelo experimental ampliamente muy utilizado para evaluar extrapiramidalismo, mediante el bloqueo de receptores dopaminérgicos D2 postsinápticos en las neuronas nigroestriatales. Este modelo ha permitido profundizar en los procesos funcionales de la vía dopaminérgica mediante la investigación de sustancias potencialmente activas como son el uso de productos derivados de plantas medicinales (Matthysse, 1986).

Un aspecto importante en la investigación mediada por este modelo inducido con haloperidol mediante receptores de dopamina es la distribución funcional entre los receptores adenosina y dopamina en cerebro (Jovel- Espinosa & Mejía-Sobrino, 2015). La adenosina es un nucleósido

endógeno que funciona como neuromodulador en el SNC (Góngora Alfaro, 2010). Los receptores A1 y los A2 son la diana principal de los efectos conductuales que se producen en animales de experimentación tras la administración de fármacos agonistas y antagonistas a la adenosina. La mayoría de los receptores adenosínicos estriales se encuentran localizados en la neurona GABAérgica, una neurona eferente que constituye más del noventa por ciento de la población neural estrial. Existen dos subtipos de este grupo de neuronas, las estriopalidales, que contiene receptores dopaminérgicos del subtipo D2 y las estriónigro-estrioentopedunculares, que contienen receptores dopaminérgicos D1. Ambos tipos contienen receptores A1, mientras que los receptores A2<sub>A</sub> se encuentran solamente en las neuronas estriopalidales (Fredholm, 1995)(Reyes, 2008) (Figura 7).

Debido a estas localizaciones anatómicas, los receptores A2<sub>A</sub> solo co-distribuyen con los receptores dopaminérgicos del tipo D2, mientras que los receptores A1 co-distribuyen tanto con receptores D2 como con D1. Estos datos proporcionan el marco anatómico que justifica un gran número de resultados experimentales que sugieren que la mayor parte de los efectos motrices de agonistas y antagonistas dopaminérgicos se producen como consecuencia de la interacción funcional entre subtipos de receptores adenosínicos y dopaminérgicos (Fredholm, 1995)(Reyes, 2008).



**Figura 7.** Representación gráfica de la modulación de heteroreceptores D1-A1 y D2-A2<sub>A</sub> y efecto de HAL (haloperidol) que bloquea receptores dopaminérgicos (D2) y la CAF (cafeína) que bloquea receptores de adenosina (A2<sub>A</sub>).

En particular, los receptores A2<sub>A</sub> que modulan de forma antagonista los efectos producidos por la estimulación de los receptores D2, mientras que los receptores A1 modulan de forma antagonista al receptor D1 (Fredholm, 1995). Es por ello que en este modelo se hace uso de la cafeína como fármaco control, ya que esta cruza la barrera hematoencefálica y es estructuralmente similar a la adenosina bloqueando los efectos catalépticos del haloperidol mediante el antagonismo de los receptores A2<sub>A</sub> actuando como un inhibidor competitivo (Góngora Alfaro, 2010) (Figura.7).

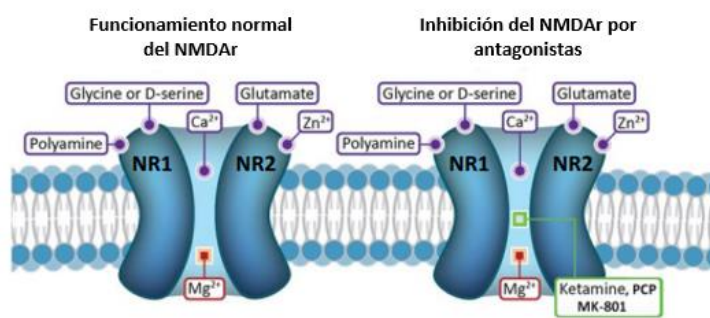
### 2.6.2 Psicosis inducida con Ketamina y MK-801 de los receptores NMDA.

Durante años los estimulantes del sistema psicomotor como las anfetaminas y la cocaína, así como alucinógenos de la familia del ácido lisérgico eran bien conocidos por inducir estados de psicosis en humanos (síntomas positivos). Por el contrario, se descubrió que la administración

de antagonistas del receptor de glutamato del tipo NMDA como fenilciclidina (PCP), dizocilpina (MK-801) o la ketamina, hacen aparecer de una forma asombrosamente mimética tanto síntomas positivos como negativos y cognitivos de la esquizofrenia en individuos sanos y exacerba los síntomas en pacientes con esquizofrenia (Watis *et al.*, 2008)(Adell, 2020). La ketamina es una arilcicloalquilamina de uso analgésico que fue sintetizada hace 50 años. Su modo de acción original por bloqueo no competitivo de los receptores-canales de NMDA le confiere propiedades muy distintas a las de los otros agentes anestésicos (Mion, 2012). En 1965 los laboratorios comercializaron este fármaco como anestésico para uso humano y para uso veterinario. Es un líquido translúcido, derivado liposoluble de la fenciclidina (PCP). Sus características psicodislépticas fueron descubiertas después de que un gran número de destinatarios informó de lo que sentían al salir de la anestesia. Los restantes experimentos mostraron que una dosis muy menor que la anestésica produce una experiencia psicodélica de gran intensidad. La ketamina además de interactuar con NMDAr y AMPAr también lo hace con los receptores nicotínicos, muscarínicos, opioides y monoaminérgicos, induciendo alteraciones de la percepción, reducción del rendimiento cognitivo, estados disociativos, dificultad para recordar palabras y disminución de la memoria inmediata, síntomas relacionados con la esquizofrenia (Royo-Isacha *et al.*, 2004) (Neira & Ortega, 2004).

El MK-801 (Dizocilpina) es una dibenzocicloheptenimina usado como anestésico con un potente antagonismo no competitivo de mayor afinidad y especificidad por los NMDAr que con PCP y ketamina (Redolat *et al.*, 1998)(Adell, 2020). El MK-801 bloquea la inducción de Potenciación a Largo-Plazo, retarda la adquisición de tareas espaciales y empeora la adquisición de tareas de evitación pasiva. Además, este antagonista puede deteriorar también el proceso de

plasticidad sináptica que subyace al aprendizaje asociativo, un aspecto de la EZQ además de la psicosis mencionada anteriormente. El tratamiento crónico con MK-801 en roedores es más consistente con el tipo de deterioro cognitivo asociados con la EZQ (Redolat *et al.*, 1998). Si bien la ketamina puede desencadenar una psicosis temporal en ciertas personas, su vida media corta y su potencia más baja la convierten en una opción clínica mucho más segura. Sin embargo, el MK-801 se usa con más frecuencia en modelos animales para simular la psicosis con fines experimentales debido a sus características de acción más duradera (Kovacic & Somanathan, 2010).



**Figura 8.** Representación esquemática de los antagonistas no competitivos (KET y MK-801) que bloquea a receptores NMDA (Tomado Sureda, 2015)

Los antagonistas (ketamina, PCP y MK-801) de los NMDAr se unen dentro del canal iónico del receptor en varios de los sitios de unión, lo que impide el flujo de iones, incluido el  $Ca^{2+}$ , a través del canal impidiendo el funcionamiento normal del receptor mediante el bloqueo de este (Figura 8).

## **2.7 Pruebas conductuales**

### **2.7.1 Natación forzada (NF)**

Es un modelo ampliamente utilizado para determinar el efecto antidepresivo en roedores, se usa para la evaluación de extractos vegetales y de compuestos de síntesis. Una de las ventajas de este procedimiento es su sensibilidad a una amplia gama de fármacos antidepresivos que la convierte en una prueba de detección adecuada por lo que una de las características más importantes que conducen a su alta validez predictiva. La NF se basa en la suposición que cuando se coloca un animal en un recipiente lleno de agua, primero se esfuerza por escapar, pero al final exhibe una inmovilidad que puede considerarse como un reflejo de una medida de desesperación conductual. Esta prueba es ampliamente utilizada porque implica la exposición de los animales al estrés, ya que tiene un papel en la tendencia a la mayor depresión. Además, se ha demostrado que la NF comparte algunos de los factores que se ven influenciados o alterados por la depresión en humanos, incluidos cambios en el consumo de alimentos, anomalías del sueño y anhedonia inducida por la abstinencia de drogas. (Yankelevitch-yahav *et al.*, 2015) (Santillán-urquiza *et al.*, 2019).

### **2.7.2 Evitación pasiva (EP)**

La EP es uno de los ensayos con animales más utilizados para estudiar los mecanismos de aprendizaje y memoria y para identificar compuestos que modifiquen los procesos cognitivos. El animal se condiciona con un estímulo aversivo y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia. Esta tarea suele ser una prueba de primera línea en las empresas farmacéuticas, que tiene también un papel destacado en la investigación neurocientífica centrada en los neurotransmisores y señales moleculares en los procesos de aprendizaje y la memoria. En este



procedimiento se ha observado resultados similares en ratones y ratas. La exposición en una sola etapa permite una sincronización precisa de las inyecciones de drogas, ya sea antes o después del entrenamiento, o antes de la prueba de retención. Por lo tanto, es posible diseccionar las posibles contribuciones y efectos de las intervenciones farmacológicas en la codificación, la consolidación y la retención (recuperación y expresión de la memoria) (McAllister-Williams *et al.*, 2010).

### **2.7.3 Interacción social (IS)**

Las interacciones sociales son un componente fundamental y adaptativo de la biología de numerosas especies. El reconocimiento social es primordial para la estructura y la estabilidad de las redes y relaciones que definen las comunidades. Para los animales, como los ratones, el reconocer de sus congéneres puede ser importante para mantener la jerarquía social y la elección de pareja. Una variedad de trastornos neuropsiquiátricos se caracteriza por alteraciones en el comportamiento y relaciones en comunidad, que incluyen depresión, autismo trastornos del espectro, trastornos bipolares, trastornos obsesivo-compulsivos y esquizofrenia. La prueba del paradigma de tres cámaras conocida como protocolo de interacción social se ha empleado con éxito para estudiar la afiliación y la memoria sociales en varias líneas de ratones. Se basa principalmente en 2 conceptos la "preferencia por la novedad social" que se define como la propensión a pasar el tiempo con un ratón desconocido antes que con un ratón familiar y la "sociabilidad" en este caso se define como la propensión a pasar tiempo con otro ratón, en comparación con el tiempo que se pasa solo en un lugar idéntico pero vacío (Kaidanovich-beilin *et al.*, 2011) (Santillán-urquiza *et al.*, 2019).

#### 2.7.4 Campo abierto (CA)

La prueba de CA es común para medir exploración a través del comportamiento y actividad general de roedores. Fue introducido por el psicólogo Calvin S. Hall originalmente en ratas, y con el tiempo se utilizó ampliamente en ratones. Inicialmente se recurría a este ensayo para medir ansiedad ya que se puede observar las reacciones de los roedores en un ambiente que no tiene salida, más adelante fue usada para estudiar la actividad motora ya que permite analizar el efecto excitador o depresor del sistema locomotor. En la actualidad, además, se utiliza comúnmente para valorar los efectos sedantes, tóxicos o estimulantes de diferentes tratamientos experimentales. Como tal, la prueba tiene una serie de usos y se incluye en casi todos los análisis exhaustivos del comportamiento de los roedores. Consiste en la exploración, por el roedor, de una zona amplia abierta, paredes transparentes y el piso color negro con líneas blancas que lo dividen sus 9 cuadrantes y se analizan los diferentes parámetros de comportamiento (Gould *et al.*, 2009)(Santillán-urquiza *et al.*, 2019)

Los modelos biológicos y las pruebas conductuales han permitido evaluar nuevas alternativas a nivel terapéutico como lo son el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades como la esquizofrenia. Existen una gran variedad de plantas que han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran especies de la familia asterácea como *Tagetes lucida*.

## 2.8 Plantas medicinales

En la literatura de los últimos 20 años hay considerable información acerca de extractos, fracciones y metabolitos secundarios que incluyen: ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos derivados de plantas con importante actividad sobre sistema nervioso central. Y quizá es la terapia basada en plantas una de las partes centrales de la medicina alternativa y complementaria. Los Fito-medicamentos (formulados con extractos vegetales que contienen mezclas de compuestos), pueden ser útiles en el tratamiento de la EZQ (Pérez-Ortega *et al.*, 2016).

### 2.8.1 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae ó Compositae ocupa un lugar preponderante en la flora de México, tanto a nivel de géneros como de especies y contribuye substancialmente a la enorme riqueza florística del país. Actualmente, se registran para el territorio de la República 3,005 especies nativas de dicha familia, distribuidas en 392 géneros (De Jesús Balleza and Villaseñor, 2002). Son muy abundantes en zonas áridas y montañosas, y escasas en selvas tropicales bajas. La investigación sistemática, quimio-taxonomía y farmacológica ha renovado la importancia de esta familia, que, al ser tan rica en metabolitos secundarios, resulta de gran relevancia como fuente de principios activos con posible aplicación terapéutica (Moscatelli, 2015), una de ellas es *Tagetes lucida*, la cual ha reportado una variabilidad de efectos farmacológicos, además, de etnobotánicos específicamente sobre SNC.

### 2.8.2 Descripción botánica *Tagetes lucida* Cav.

*Tagetes lucida* Cav se encuentra descrita taxonómicamente de la siguiente manera según el Herbario nacional de México (MEXU), Plantas vasculares UNAM (De Jesús Balleza &

Villaseñor, 2002) (Tabla 2). Es una planta nativa de México y es comúnmente conocida en la medicina tradicional mexicana como: Pericón Anisillo, atagote, cedrón, flor de xuchitl, hierbanís, hierba anís, hierba de nubes, hierba de San Juan, hierba santa, periquillo, rincón, Santa María, Santa María de jardín, tatalencho, yerbanís (BDMTM, 2009).

*Tagetes lucida* Cav es una hierba erecta de 30cm a 1m de altura, muy ramificada y que huele a anís. Las hojas son de un mismo ancho tanto en la parte axial, como en la distal, con los bordes dentados y de color verde oscuro, de olor y sabor a anís. Tiene las flores dispuestas en cabezuelas agrupadas en racimos, están en las partes terminales de la planta y son de color amarillo. Sus frutos son negros y pequeños (Fig. 9).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la especie *Tagetes lucida* Cav

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Compositae
<b>Género</b>	Tagetes
<b>Especie</b>	<i>Tagetes lucida</i>

Es originaria de México, Guatemala y Honduras. Habita en climas cálido, semicálido, seco, semiseco y templado, entre los 8 a los 850msnm y de los 1000 hasta los 4000msnm (BDMTM, 2009)



**Figura 9.** *Tagetes lucida* Cav- Foto tomada de [c2.staticflickr.com](https://www.staticflickr.com/c2/)

### **2.8.3 Etnobotánica de *Tagetes lucida* Cav.**

El uso medicinal más frecuente de esta planta es en trastornos digestivos. Asimismo, para dolores en general, problemas de reumatismo, inflamación, insomnio, ansiedad y depresión (BDMTM, 2009). También es ampliamente usada para tratar padecimientos como los “**nervios**” y para el “**susto**” o “**espanto**” enfermedad originada por una fuerte y repentina impresión derivada del encuentro con animales peligrosos, objetos inanimados y entidades sobrenaturales producto de cualquier episodio traumático que amenace la integridad física y/o emocional del individuo (Argueta and Gallardo, 1994). Caber resaltar que Francisco Hernández, en el siglo XVI menciona que esta planta “quita el dolor de la cabeza, a los espantados y **alivia a los dementes** (Argueta and Gallardo, 1994).

### **2.8.4 Química y farmacología *Tagetes lucida* Cav**

Ha sido evaluada mediante diversos estudios farmacológicos, en la que ha sido reportada por su efecto insecticida, antibacteriano y citotóxico (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Asimismo, se ha

demostrado efecto sobre el SNC por sus propiedades antidepresivas en la prueba de natación forzada en ratas (Bonilla-Jaime *et al.*, 2015), efecto ansiolítico y sedante en modelos experimentales en ratones tales como: campo abierto, cilindro de exploración, placa de agujero, laberinto plus y la potenciación de la hipnosis inducida por barbitúricos (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Entre las diferentes propiedades farmacológicas de *Tagetes lucida* Cav también se encuentra diferentes estudios sobre su actividad antiinflamatoria y antioxidantes atribuida a algunos de sus compuestos y aceites esenciales (Xu *et al.*, 2012). La planta contiene un aceite esencial en el que sólo se ha identificado un componente que está presente en altas concentraciones, el estragol; además contiene cumarinas como hernierina, dimetilfraxetina, escoporona y flavonoides, particularmente glicósidos de quercetina, tagetona, tagetina y camferol, taninos, pectina y gomas (BDMTM, 2009).

En estudios recientes se evaluó su actividad antiinflamatoria de extracto de hexano y acetona de la especie en un modelo de edema auricular inducido con TPA encontrando una inhibición del edema del 92.7 y 75.9 por ciento, correspondiente. Así mismo se aislaron 5 cumarinas del extracto hexánico las cuales fueron identificadas, caracterizadas y evaluadas: 7-isopreniloxicumarina<sup>1</sup>, herniarina<sup>2</sup>, 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina<sup>3</sup>, 6,7,8-trimetoxicumarina<sup>4</sup> y escoparona<sup>5</sup>. Los Compuestos 1 y 3 no se habían identificado previamente en *T. lucida*. Compuesto 1 mostró la mayor actividad con un 81,1% de inhibición del edema, mientras que 2 la redujeron en 54.4%, los otros compuestos mostraron menos del 50% de la actividad inhibitoria (Monterrosas Brisson *et al.*, 2020).

### 3 JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de los trastornos mentales continúa en aumento, causando efectos considerables en la salud de las personas, así como graves consecuencias a nivel socioeconómico y en el ámbito de los derechos humanos, en todos los países. Las enfermedades mentales como la esquizofrenia no son sólo un problema creciente de salud pública, sino también social y económico que afecta a individuos y familias en todo el mundo. Hasta el momento, no existe un medicamento completamente eficaz contra la EQZ, mientras que los fármacos disponibles que contrarrestan algunos síntomas positivos, negativos y cognitivos como los antipsicóticos típicos y atípicos entre otros, se acompañan de diversos efectos colaterales, además, no evitan la progresión de la enfermedad. Por lo que se requiere buscar nuevas alternativas terapéuticas que garanticen seguridad y efectividad, lo que ha llevado a que la investigación se centre en el uso de plantas medicinales para la obtención de nuevos tratamientos útiles.

*Tagetes lucida* Cav es una planta nativa de México comúnmente conocida en la medicina tradicional mexicana como pericón y ampliamente usada para tratar padecimientos como los “nervios” y “susto” o “espanto”. Se han demostrado sus actividades farmacológicas como: antidepresivo, sedante, neuroprotector y antiinflamatorio. Por los antecedentes anteriormente mencionados se propone a *Tagetes lucida* Cav como especie vegetal capaz de actuar como modulador de parámetros asociados con la esquizofrenia mediante la evaluación de los síntomas negativos, positivos y cognitivos asociados a las vías dopaminérgica y glutamatérgica, así como también regulador de la neuroinflamación y estrés oxidante.

#### **4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Será capaz la administración de extractos y compuestos de *Tagetes lucida* Cav de modificar la conducta de psicosis, la inflamación y el estrés oxidante, en ratones con psicosis experimental?

#### **5 HIPÓTESIS**

Debido al uso etnomédico de *Tagetes lucida* Cav, los extractos y compuestos aislados de la especie disminuirán los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la psicosis experimental inducida por fármacos que actúan sobre las vías glutamatérgica y dopaminérgica, además de actuar como modulador de la respuesta inflamatoria y oxidante en cerebro de ratones.



## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad farmacológica de *Tagetes lucida* en ratones con esquizofrenia experimental en diferentes modelos.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los extractos de *Tagetes lucida* sobre la potenciación cataléptica por el haloperidol y la disminución de la actividad de síntomas positivos, negativos y cognitivos de psicosis inducidos con Ketamina.
2. Evaluar el efecto tóxico de la administración aguda de los extractos con mayor actividad de *Tagetes lucida* mediante la prueba de Irwin.
3. Elucidar la estructura química de compuestos aislados de los extractos de *Tagetes lucida* Cav con mayor actividad antipsicótica.
4. Evaluar el efecto de herniarina y dimetilfraxetina aislados de *Tagetes lucida* sobre la potenciación cataléptica por el haloperidol y la disminución de la actividad de síntomas positivos, negativos y cognitivos de psicosis inducidos con Ketamina.
5. Evaluar el efecto de herniarina y dimetilfraxetina aislados de *Tagetes lucida* sobre la disminución de los síntomas negativos, positivos y cognitivos presentes en la psicosis crónica inducida con MK-801.
6. Evaluar el efecto de herniarina y dimetilfraxetina de *Tagetes lucida* Cav sobre la neuroinflamación inducida con MK-801 a través de la cuantificación de la concentración cerebral de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4).

7. Evaluar el efecto de herniarina y dimetilfraxetina de *Tagetes lucida* Cav sobre el estrés oxidante inducido con MK-801 a través de la actividad moduladora de marcadores biológicos de GHS, GSSG, ON y MDA.

## 7 MATERIAL Y MÉTODOS

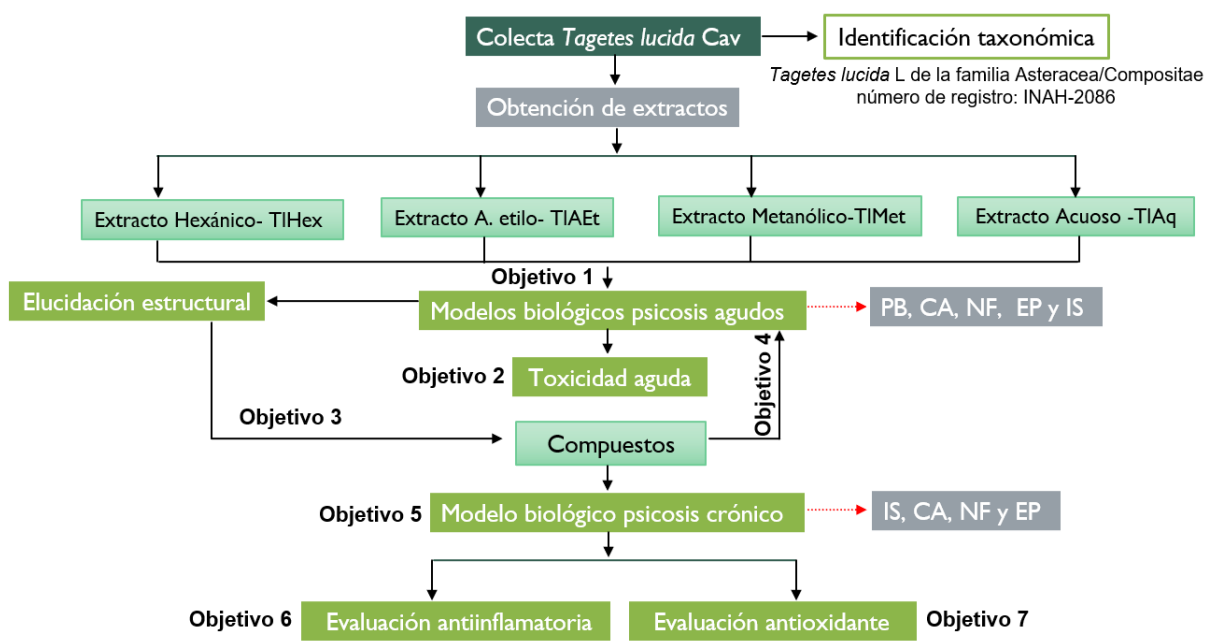
### 7.1 Material vegetal y obtención de extractos.

Las partes aéreas de *T. lucida* fueron adquiridas de forma comercial en el municipio de Xochitepec, Morelos, en el mes de septiembre de 2018. El material vegetal se trasladó al Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS) en el mismo municipio. Un ejemplar de herbario fue enviado al jardín etnobotánico del INAH, con las maestras Margarita Avilés y Macrina Fuentes, quienes realizaron la identificación taxonómica de la planta como *Tagetes lucida* L de la familia Asteracea/Compositae y le asignaron el número de registro: INAH-2086.

La planta se secó a temperatura ambiente en camas de secado durante dos semanas. Posteriormente se pulverizó en un molino eléctrico marca Pulve plastic, EUA, hasta obtener un tamaño de partícula de 4mm. El material molido (4 kg) se colocó en un matraz de vidrio, para su primera extracción con *n*-hexano (5L) por 24 h y este procedimiento se realizó por triplicado, se filtró y eliminó el solvente a presión reducida en un rotavapor (Buchi rotavapor R-114, Alemania) a una temperatura de 40°C, con presión controlada y a 81 rpm, con lo que cual se obtuvo el extracto hexánico, que fue etiquetado como (TIHex) y se almacenó a 4 °C para su posterior uso en pruebas biológicas.

El material vegetal residual, una vez seco, se colocó en un matraz con acetato de etilo (5 L) por 24 h y se realizó el proceso por triplicado, para su posterior eliminación del solvente mediante rota evaporación. Se etiquetó como TIAEt y se almacenó a 4 °C, para su posterior uso en las pruebas biológicas. El resto fue usado como materia prima en la obtención de extractos más polares, como el metanólico (TIMet) y el acuoso (TIAq), realizando el mismo proceso por

triplicado, al final se almacenaron bajo las mismas condiciones. Todos los extractos fueron evaluados en las pruebas biológicas agudas (catalepsia por HAL y psicosis inducida con KET), lo que permitió realizar una selección de los productos con mayor actividad farmacológica, para realizar la separación cromatográfica y elucidación de compuestos que se analizaron en el ensayo de psicosis aguda con KET. En el diagrama de la Figura 10, se muestra la metodología general que se llevó a cabo en este proyecto.



**Figura 10.** Diagrama experimental. PB, prueba en barra; CA, campo abierto; NF, natación forzada; EP, evitación pasiva; IS, interacción social.

## 7.2 Animales y tratamientos

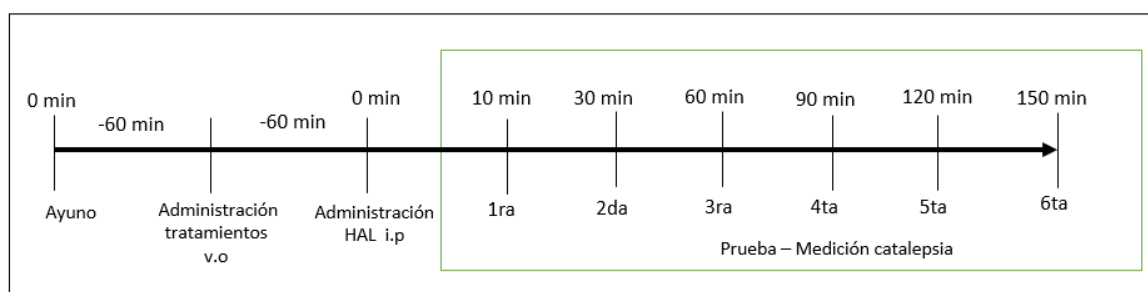
Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR (n = 10, 28-30 g), y fueron manipulados de acuerdo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron agrupados aleatoriamente en **Grupo basal:** animales sanos sin daño; **Grupos control negativo:** animales

administrados de acuerdo a las pruebas a evaluar ( HAL, antipsicótico típico, 0.5 mg/kg, -ip-), (Ketamina, KET, 50 mg/kg, antagonista de receptores NMDA, usado como inductor de psicosis a través de la vía glutamatérgica, -ip-), (MK-801 0.05 mg/kg, antagonista de receptores NMDA, -ip-) **Grupos control positivo:** (Olanzapina, OLZ, antipsicótico atípico, 1 mg/kg, vía oral -vo-), (Cafeína, antagonista de receptores A2 para adenosina, bloquea los efectos del HAL, 15 mg/kg, -vo-); (NMDA 5 mg/kg, -vo-) **Grupos Experimentales:** Extractos provenientes de *T lucida* hexánico (TIHex), acetato de etilo (TIAEt), metanólico (TIMet) y acuso (TIAq) a 25 y 50 mg/kg y compuestos provenientes de extractos dimetilfraxetina y herniarina a 1 y 5 mg/kg.

### 7.3 Ensayos farmacológicos agudos

#### 7.3.1 Catalepsia inducida con haloperidol

Para el ensayo de catalepsia se realizó el siguiente diagrama experimental (Figura 11) y los animales fueron administrados con diferentes tratamientos como se muestra en la Tabla 3.



**Figura 11.** Diagrama modelo de catalepsia inducida con Haloperidol. v.o, vía oral; i.p, vía intraperitoneal; HAL, Haloperidol.

**Tabla 3.** Tratamientos y dosis administradas en el modelo de catalepsia inducida con HAL.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento vía oral</b>	<b>Dosis</b>
<b>Control negativo (Veh)</b>	Tween 20	1 %
<b>Control Positivo</b>	Cafeína	15 mg/kg
<b>Experimentales</b>	TIHex	25 y 50 mg/kg
	TIAEt	25 y 50 mg/kg
	TIMet	25 y 50 mg/kg
	TIAq	12.5, 25 y 50 mg/kg

El vehículo usado en este caso fue Tween 20 al 1% para todas las administraciones. Todos los grupos se les administro haloperidol 0.5 mg/kg

Para la medición del tiempo de catalepsia, en la **PB** los animales se colocaron en una varilla de vidrio de 0.8 mm de diámetro sostenida por 2 soportes de madera a una altura de 4 cm y separada por un soporte horizontal de 2.5 cm de altura situado a 2 cm de la proporción media de la varilla de vidrio (Figura 3) durante 1 min y se observó el efecto cataléptico a diferentes tiempos después de administrar el HAL como se indica en la Figura 2. Se tomó como criterio de respuesta positiva de catalepsia el tiempo en el que el ratón permanece en una posición inmóvil durante 20 s o más, tiempos de acinesia menores a 20 s no son considerados como catalepsia.



**Figura 12.** Fotografía de un ratón con catalepsia- inducida con HAL, en prueba en barra

### **7.3.2 Modelo de psicosis inducida con ketamina**

La psicosis aguda, fue inducida con ketamina y las pruebas conductuales (NF, EP, IS y CA) utilizadas permitieron observar los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la

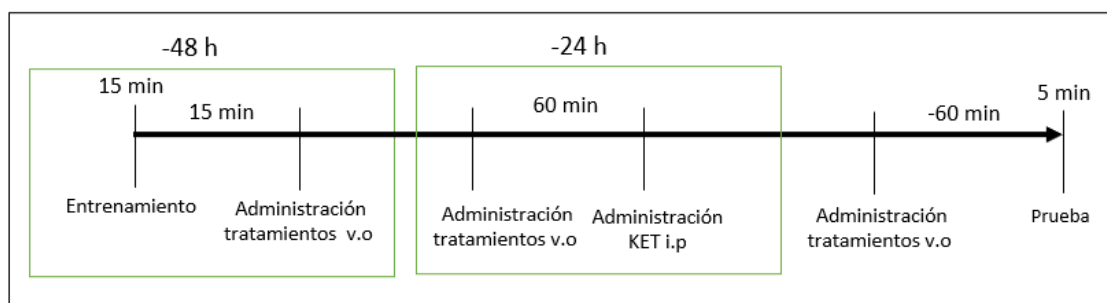
esquizofrenia. Los animales fueron administrados con los diferentes tratamientos como se muestra en la Tabla 4, usando una n de 5 ratones por cada prueba.

**Tabla 4.** Tratamientos usados en el ensayo de psicosis aguda- inducida con KET.

Grupo	Tratamiento vía oral	Dosis (mg/kg)
Control negativo (Veh)	Tween 20	0.1 mL/10 g peso
Control Positivo	NMDA	5
Experimentales	TIHex	50
	TIAEt	
	TIMet	
	TIAq	25

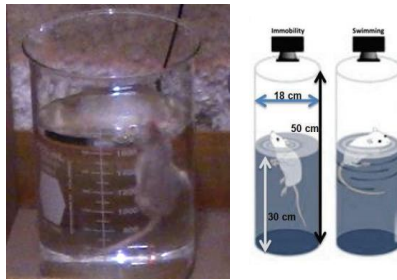
El vehículo usado en este caso fue Tween 20 al 1% para todas las administraciones. Todos los grupos se les administro ketamina 50 mg/kg

Natación forzada **NF**, este modelo es ampliamente utilizado para evaluar el efecto antidepresivo, basado en la desesperanza “conductual” de los animales. Para llevar a cabo este ensayo se realizó el siguiente diagrama experimental.



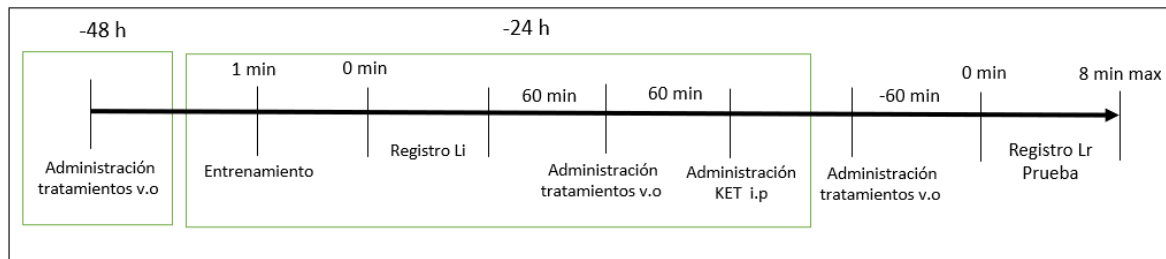
**Figura 13.** Diagrama modelo de psicosis inducida con ketamina en ensayo de Natación Forzada. v.o, vía oral; i.p, vía intraperitoneal; KET, ketamina

NF consistió en un entrenamiento previo, 48 h antes de la prueba final, en la que los animales se colocan durante 15 min a nadar individualmente en (2 L de capacidad) los cuales se llenan con agua a  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C y con una profundidad de (1.6 L aprox.) (Figura 14).



**Figura 14.** Foto. Prueba de Natación Forzada.

Transcurrido el tiempo, se secan con una toalla y son devueltos a sus cajas, posteriormente a los 15 min se le administra a cada grupo de animales el tratamiento. A las 24 horas, se administra nuevamente el tratamiento y 60 min después la ketamina, seguidas otras 24 horas se administra por última vez y 60 min después se realiza la prueba sometiendo a los animales NF durante 5 min y se registra el tiempo total de inmovilidad de cada ratón como se muestra en la Figura 13. En la figura 15, se muestra el diseño experimental que se llevó a cabo en la prueba de Evitación pasiva **EP**.



**Figura 15.** Diagrama modelo de psicosis inducida con ketamina en prueba de Evitación Pasiva. v.o, vía oral; i.p, vía intraperitoneal Li, latencia inicial; Lr, latencia de retención; KET, ketamina;

En una cámara con dos compartimientos uno claro y otro oscuro, el animal se condiciona con un estímulo aversivo (descarga de 0.6 mA durante 2 seg en la cámara oscura) (Figura 16) y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia. Se registran dos parámetros que permiten

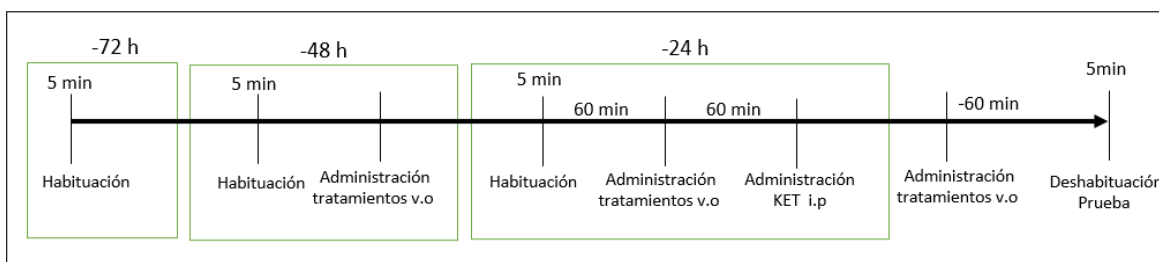


determinar la mejora o pérdida de la memoria. Latencia inicial (Li) este se registra en la etapa de entrenamiento, y corresponde al tiempo en el que el animal tarda de pasar de un espacio iluminado a un espacio oscuro y en el cual se presenta el estímulo de daño. El segundo parámetro es latencia de retención (LR) y este se registra durante la prueba 24 h después del entrenamiento, y corresponde nuevamente al tiempo en el que el roedor tarda de pasar de un espacio iluminado al espacio oscuro pero esta vez sin el estímulo aversivo y con un tiempo máximo de 8min.



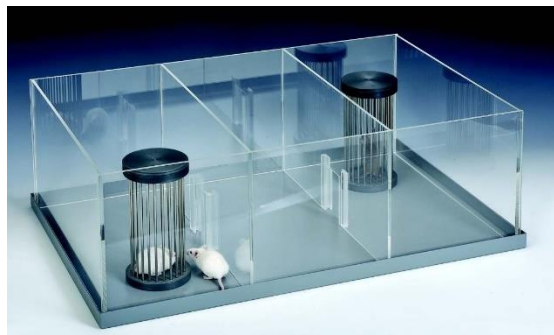
**Figura 16.** Cámara usada en Evitación Pasiva. Li, latencia inicial; Lr, latencia de retención.

La prueba de interacción social **IS**, como se señala en el diagrama experimental de la Figura 17. Este ensayo conductual se centra en el grado de familiaridad entre dos individuos. El aparato utilizado consiste en una jaula con una ventana de malla de alambre, junto a la cual se coloca otra circular que, a su vez, está dividida en dos cámaras, cada una de ellas con una ventana con malla (Figura 18).



**Figura 17.** Diagrama modelo de psicosis inducida con ketamina en prueba de Interacción Social. v.o, vía oral; i.p, vía intraperitoneal; KET, ketamina

La prueba comienza con la habituación, situando al ratón en la jaula principal durante 10 minutos para que se familiarice con el entorno y dejando vacía la cámara circular. Posteriormente, en uno de los compartimentos de la cámara circular se coloca un ratón que llamaremos “familiar”, ya que estuvo en contacto previamente durante cinco minutos con el ratón experimental (se puede utilizar un ratón de su misma jaula) durante 3 días en la fase de habituación y en el otro compartimento se coloca un ratón nuevo (que nunca ha sido expuesto al ratón experimental) el 4to y último día del modelo, en la fase de deshabituación. La caja circular se gira para enfrentar, por medio de las ventanas de acoplamiento, al ratón de la caja principal con cada uno de los dos compartimentos en sesiones de cinco minutos. La experiencia se realiza cuatro veces. En las tres primeras el animal se enfrenta a un ratón familiar y durante el transcurso de estas sesiones el ratón se acostumbra a esa exposición y varía su investigación social (habituación).

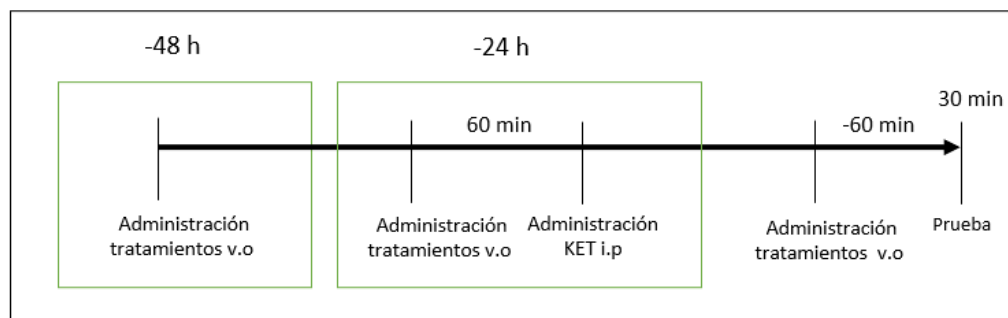


**Figura 18.** Cámara usada en la prueba de Interacción Social. Tomado de <https://ncbc.medicine.uiowa.edu/equipment-fees/equipment/behavior/social-behavior>

En la cuarta exposición se gira la cámara y se muestra el ratón nuevo (deshabituación). En todas las sesiones se mide el tiempo de exploración, definido como el tiempo que el animal emplea en acercarse u olisquear la ventana de acoplamiento. Los ratones con una función cognitiva no deteriorada pasarán más tiempo olisqueando al ratón nuevo que al familiar; los que tengan un

déficit cognitivo no distinguirán entre el ratón familiar y el nuevo (su tiempo de exploración será similar).

Campo abierto CA. Los síntomas positivos como parámetro fundamental de la esquizofrenia fueron observados bajo el ensayo de CA. En esta prueba, los ratones son colocados en un ambiente novedoso sin posibilidad de escapar. Se llevó a cabo el experimento usando el modelo del diagrama en la Figura 19.



**Figura 19.** Diagrama modelo de psicosis inducida con ketamina en ensayo de Campo Abierto. v.o, vía oral; i.p, vía intraperitoneal; KET, ketamina.

Para la prueba de campo abierto el primer día del diseño experimental los animales fueron administrados con los diferentes tratamientos, para el segundo día nuevamente fueron administrados con los tratamientos y 60 min después se realizó la administración de la ketamina. 24 horas después fueron administrados por última vez con los tratamientos y 60 min después se realizó la prueba en la cual se utilizó un equipo con medidas de 30x30x15 cm fabricado de acrílico con paredes transparentes y piso negro dividido en 9 cuadros de igual área (Figura 20). En este ensayo cada ratón se colocó en el centro del aparato de CA para determinar su patrón conductual por 30 min y se registraron parámetros de locomoción: Cruces totales (CT) y Estiramientos Verticales (EV), Conductas Estereotipadas: (CE, estas son movimientos repetitivos, involuntarios

con ningún propósito obvio como la cabeza girando), Acicalamientos (Ac) y Tiempo invertido en acicalarse (TAc).



**Figura 20.** Foto. Equipo de Campo Abierto

#### **7.4 Modelo de toxicidad aguda por clases $\gamma$ - neurotóxico mediante prueba de Irwin.**

La prueba de observación de Irwin se usa comúnmente para evaluar los efectos de una nueva sustancia en el comportamiento y la función fisiológica. Los resultados de esta prueba se utilizan para determinar la toxicidad potencial y seleccionar dosis para una actividad terapéutica específica, también se puede utilizar en un enfoque de seguridad para detectar los efectos adversos de un nuevo compuesto en el comportamiento general y para evaluar su neurotoxicidad aguda (Roux, Sablé and Porsolt, 2004). Los parámetros registrados durante la prueba fueron: Contorsiones abdominales, pérdida de tono muscular, ptosis palpebral, alteración motriz (hiperactividad o inmovilidad), amontonamiento, temores, parálisis de miembros, secreción salival, constipación, convulsiones y muerte.

La prueba se llevó a cabo durante 16 días con un número total de 6 ratones por grupo. Los ratones fueron seleccionados aleatoriamente en 8 grupos: Basal- control positivo- animales sin daño; Vehículo-control negativo- animales administrados con lipopolisacárido (LPS-2.5 mg/kg, v.i.) una endotoxina de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que desempeñan una

importante función en la activación del sistema inmune produciendo un deterioro del animal de forma sistémica (Romero *et al.*, 2010); extractos de TIAE y TIAq a 300, 500 y 1000 mg/kg v.o. El ensayo se dividió en dos partes, la primera parte se realizó en las primeras 24 horas después de las administraciones. Se registraron los diferentes parámetros a los 30 min, 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Al finalizar la observación se realizó el sacrificio y disección de tejido (hígado) de 3 animales por grupo.

Para la segunda parte, los animales restantes por grupo siguieron en observación, con un registro de parámetros cada 24 horas durante 15 días. Al finalizar el ensayo nuevamente se realizó el sacrificio y disección de tejidos.

## **7.5 Caracterización química de *Tagetes lucida* Cav.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas agudas los extractos de TIAEt y TIAq presentaron actividad antipsicótica, por lo que se procedió a realizar la separación cromatográfica mediante cromatografía líquida en columna (CLC) y se realizó seguimiento mediante cromatografía en capa fina (CCF). Posteriormente se realizó la elucidación química de compuestos aislados.

### **7.5.1 Separación de TIAEt mediante CLC**

Con la finalidad de buscar la fracción más activa en los modelos farmacológicos, se realizó un análisis químico de las fracciones con posible actividad antipsicótica del extracto de acetato de etilo. Se usaron 20 g del extracto TIAEt, que fueron adsorbidos en 20 g de sílica fase normal, para su separación por CLC. Para la columna se utilizaron 80 g del mismo tipo de sílica como fase estacionaria. La columna 1 (C1), con clave TIAEtC1, fue eluída con un sistema de

diferencial de gradiente: hexano/acetato de etilo/metanol. Con un volumen de salida de 200 ml de la columna, fueron tomadas fracciones que fueron concentradas por destilación a presión reducida y analizadas por cromatografía en capa fina, para el monitoreo del perfil químico en cada muestra. Con este procedimiento, se obtuvieron 45 fracciones y las que presentaron el mismo perfil químico fueron agrupadas, y llamadas “reuniones”, para continuar con su proceso de separación química. La reunión de fracciones de interés fue separada, utilizando el mismo procedimiento de CLC (fase normal y/o fase reversa) y sistemas de gradientes agua /acetonitrilo para fase reversa y *n*-hexano/ acetato de etilo /metanol para las columnas de fase normal. El monitoreo de las fracciones, en cuanto a su perfil químico general, se llevó a cabo por CCF, usando también reveladores específicos, que permitieron conocer de manera gruesa el grupo de compuestos al que pertenece cada “mancha” en la placa. Y otra vez, aquellos similares fueron agrupados en “reuniones”.

Para continuar con la separación química de una de las fracciones llamada TIAEtC1F24-26 (2g), se utilizó una segunda columna (TIAEtC2). La muestra fue adsorbida en 2 g de sílica fase normal, y como fase estacionaria 30 g de la sílice, mientras que la fase móvil fue un sistema de gradiente de fase normal de hexano/ acetato de etilo. De la colecta de volumen de esta C2 se obtuvieron 71 fracciones y se reunieron según su perfil cromatográfico, tomando la reunión TIAEtC2F31-34 para continuar la separación.

En la tercera columna cromatográfica (TIAEtC3), se prepararon 517 mg de TIAEtC2F31-34 (517 mg) adsorbidos en 10 g de sílica gel fase reversa como fase estacionaria y un sistema de gradiente de fase reversa de agua/ acetonitrilo. De esta columna se obtuvieron 55 fracciones de

las cuales, la fracción **TIAEtC3F9** se identificó un compuesto tipo cumarina anteriormente reportado para la especie por Monterrosas-Brisson y colaboradores en 2020 el cual fue comparado con estándares de laboratorio mediante CCF y e identificado como dimetilfraxetina.

Para continuar con la separación cromatográfica se realizó una cuarta columna, con el producto de separación TIAEtC3F5 (94.6 mg), adsorbidos 10 g de sílica gel fase normal y un gradiente correspondiente a la fase normal de hexano/acetato de etilo. Se obtuvieron 40 fracciones, realizando las reuniones correspondientes.

### **7.5.2 Separación de TIAq mediante CLC**

Debido a que el extracto TIAq, fue efectivo en los ensayos agudos de psicosis, se llevó a cabo su separación, por técnicas cromatográficas.

Se tomaron 277.5 g de TIAq y se disolvieron en 50 ml de metanol, obteniendo así una parte soluble y un precipitado (Pp). Se decidió no continuar trabajando con el Pp, debido a que su perfil observado en CCF, evidenciaba menor número de “manchas” indicando un contenido químico más pobre que la parte soluble en metanol. De esta última, se logró realizar 3 columnas cromatográficas. Para la primera, TIAqC, se tomaron 13.5 g del extracto y se adsorbieron en 15 g, y con 10 g de sílice gel fase normal como fase móvil y un gradiente de elución fase normal hexano/acetato de etilo. Se obtuvieron 48 fracciones y se reunieron según su perfil químico.

Continuando con la separación cromatográfica para la siguiente columna (TIAqC2) se tomaron 319.9 mg de la fracción TIAqC1F13-14 y se adsorbieron en 1g, y con 10 g de sílice gel fase normal como fase móvil, que fueron eluidos en un sistema de fase normal

diclorometano/acetona con un sistema de gradiente (100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 0:100). Lo que permitió la obtención de 65 fracciones con un volumen de 50 ml por vial, que fueron agrupadas de acuerdo con su perfil cromatográfico mediante CCF, donde se observaron 2 grupos de compuestos, uno de tonalidad morado-amarillo y el otro grupo de tonalidades naranjas que serían parte de compuestos tipo flavonoides.

En la búsqueda de los compuestos de tonalidad morado-amarillo se tomó la fracción TIAqC2F58-60 (16 g) para realizar la columna TIAqC3. La muestra fue adsorbida en 20 g, y con 100 g de sílice gel fase normal y como fase móvil un gradiente de elución fase normal diclorometano/metanol (100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 30:70, 0:100) obteniendo 28 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo con su perfil cromatográfico. De la fracción **TIAqC3F9** se identificó un compuesto tipo cumarina anteriormente reportado para la especie por Monterrosas-Brisson y colaboradores en 2020 el cual fue comparado con estándares de laboratorio e identificado como herniaria.

Para la siguiente columna TIAqC4 se tomó la fracción TIAqC3F16-19 con un peso de 1.24 g. la muestra fue adsorbida en 1 g, y con 10 g de sílice gel fase reversa y como fase móvil un sistema de gradiente agua/ acetonitrilo/metanol (100:0:0, 95:5:0, 90:10:0, 85:15:0, 80:20:0, 75:25:0, 70:30:0, 65:35:0, 50:50:0, 30:70:0, 0:100:0, 0:0:100) obteniendo un total de 59 fracciones las cuales fueron agrupadas de acuerdo con su perfil cromatográfico.

Para lograr una mejor separación cromatográfica de un grupo de compuestos tipo flavonoide, se tomó la fracción TIAqC4F17-23 para realizar la columna TIAqC5. La cantidad de 160 mg de muestra se adsorbieron en 1 g, como fase estacionaria de usaron 8 g de sílice fase reversa y la



móvil fue un sistema de gradiente agua/acetonitrilo/metanol (100:0:0, 98:2:0, 96:4:0, 94:6:0, 50:50:0, 0:100:0, 0:0:100) colectando 71 fracciones las cuales fueron reunidas según su contenido químico. Del resultado de esta columna se obtuvo 1 fracción **TIAqC5F26** presentando una coloración amarilla mediante cromatografía en capa fina por lo que fueron llevadas a elucidación estructural mediante experimentos de una y dos dimensiones.

Con el fin de continuar la separación de los flavonoides que se revelan en color naranja, se realizó la columna TIAqC6 tomando 6 g la fracción TIAqC2F28 que provino de la columna 2, al inicio de la separación. La muestra fue preparada con 6 g de sílice gel fase normal e igualmente empacada con 20 g de la misma fase. Usando un sistema de gradiente de Agua/acetonitrilo/ metanol (100:0:0, 95:5:0, 90:10:0, 85:15:0, 80:20:0, 75:25:0, 70:30:0, 60:40:0, 50:50:0, 0:100:0, 0:0:100) colectando un total de 49 fracciones reunidas según su contenido químico obteniendo la fracción **TIAqC6F14** la cual fue llevada a elucidación estructural mediante experimentos de una y dos dimensiones.

Para la última columna cromatográfica TIAqC7 se tomó la fracción TIAqC6F10-20 (1.5 g) y se adsorbió en 2 g de sílice fase reversa e igualmente fue empacada con 10 g como fase estacionaria, como fase móvil se usó un sistema de gradiente agua/acetonitrilo/ metanol (100:0:0, 95:5:0, 90:10:0, 85:15:0, 80:20:0, 75:25:0, 70:30:0, 50:50:0, 0:100:0, 0:0:100) obteniendo un total de 68 fracciones reunidas según su perfil cromatográfico. Del resultado de esta columna se obtuvo la separación de los compuestos de coloración naranja vistos en CCF (**TIAqC7F19** y **TIAqC7F35**) por lo que fueron llevadas a elucidación estructural mediante experimentos de una y dos dimensiones.

### **7.5.3 Análisis de la separación química de *T. lucida* por CCF.**

Para el análisis de CCF del seguimiento de todos los fraccionamientos, como fase estacionaria se usaron placas (Merck) de sílica gel 60 de fase normal o fase reversa de diferentes tamaños de acuerdo con el número de muestras a eluir y como fase móvil un sistema de disolventes ajustado según la polaridad requerida: agua /metanol/ hexano/ acetonitrilo/ acetato de etilo y diclorometano. Las placas eluidas se observaron en luz ultravioleta (Detector marca UVGL-58, UVP, Cambridge, UK) a longitudes de onda de 254 nm y 365nm y posteriormente se revelaron con distintos indicadores de presencia de compuestos, como NP/NG por sus siglas en inglés de Natural Products-polyethylenglycol (Sigma-Aldrich, USA) para flavonoides (cuyo viraje de color en el rango amarillos-naranja, indican positivo para dichas sustancias); mientras que el 4-hidroxibenzaldehído (conocido como “revelador universal”, que vira a tonos morados- indicando la presencia de una gran variedad de compuestos en las muestras, entre ellos terpenos). La composición de las fracciones analizadas por CCF permitió las diferentes reuniones de las fracciones.

### **7.5.4 Análisis de los extractos y compuestos de *T. lucida* mediante CLAR**

Los extractos (TIAE y TIAq) y compuestos aislados de *T. lucida* se diluyeron en metanol a concentraciones 2 mg/ml y fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en un cromatógrafo Waters 2695 acoplado a un detector UV de serie de fotodiodos Waters 2996 para determinar el grado de pureza de los tratamientos. Se empleó una columna Licrosphere® 100 RP-18 de 250×4 mm (5 µm de tamaño de partícula) con un flujo de 0.9 ml/min, y una fase móvil agua/ acetonitrilo con gradiente como se indica en la Tabla 5. Los cromatogramas obtenidos por CLAR fueron extraídos y analizados a diferentes longitudes de

onda entre intervalos de 200 a 700 nm para el análisis y mejor identificación de la familia química a la cual pertenecen los compuestos presentes en las muestras.

De acuerdo con los análisis de CLAR mediante el tiempo de retención (TR) y espectros de ultravioleta visible (UV) y su comparación con lo reportado por Monterrosas en 2020 se pudo realizar la identificación de dimetilfraxetina y herniarina.

**Tabla 5.** Gradiente empleado en CLAR

<b>Tiempo (min)</b>	<b>H2O (%)</b>	<b>CH3CN (%)</b>
<b>1</b>	100	0
<b>2</b>	95	5
<b>3</b>	95	5
<b>4</b>	70	30
<b>20</b>	70	30
<b>21</b>	50	50
<b>23</b>	50	50
<b>24</b>	20	80
<b>25</b>	20	80
<b>26</b>	0	100
<b>27</b>	0	100
<b>28</b>	100	0
<b>30</b>	100	0

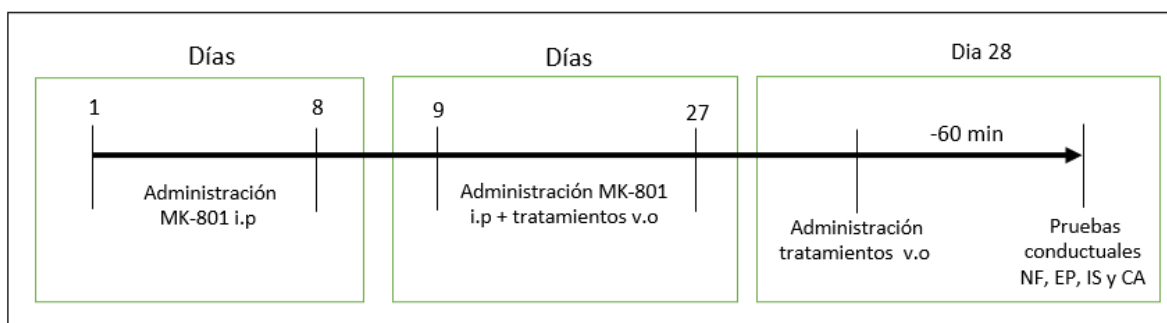
### **7.5.5 Técnicas espectroscópicas y espectrométricas para elucidación química estructural**

La caracterización estructural de los compuestos aislados (TlAqC6F14, TlAqC7F19 y TlAqC7F35) se realizó empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas, los espectros UV se obtuvieron por un detector de fotodiodos en serie (Waters 2996), los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) así como los

experimentos de 2- dimensiones (2-D) por sus siglas en inglés: de *correlated spectroscopy* (COSY), *heteronuclear simple quantum coherence* (HSQC), *heteronuclear multiple bond coherence* (HMBC), fueron realizados en un equipo Varian INOVA -400 a 400 y 100 MHz. Para los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente, las muestras fueron diluidas de acuerdo con su solubilidad utilizando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). En todos los casos se utilizó el tetrametilsilano (TMS) estándar interno.

### 7.6 Modelo farmacológico de psicosis crónica inducida con MK-801

En esta etapa se realizó la inducción de psicosis crónica con MK-801 a 0.5 mg/kg, que es antagonista de NMDAr y que se ha reportado en la literatura que induce rasgos psicóticos en los ratón (Neira & Ortega, 2004). Esta prueba consta de 28 días. Del 1 al 8 se administró MK-801 para inducir la psicosis sub crónica en ratones. Del día 9 al 27 se administró MK-801 más los diferentes tratamientos. El día 28 se administró los tratamientos 1 hora antes de realizar las pruebas conductuales: NF, EP, IS y CA como se indica en la Figura 21.



**Figura 21.** Diagrama del modelo biológico de psicosis crónica.

Una vez que fueron concluidas las pruebas conductuales del modelo crónico, los animales fueron sacrificados y se realizó la disección de los órganos (cerebro e hígado), que fueron

almacenados a -70 °C para realizar la determinación de citocinas y marcadores de oxidación. Para la homogenización, los órganos fueron dispuestos en una solución TRIS-HCl 10mM, pH 7.4, 200mM de manitol, 50mM de sacarosa y 1mM de EDTA, 0.01 fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, inhibidor de proteasas). Las muestras se centrifugaron a 233.33 Hz (14000 rpm) durante 5 min y el sobrenadante (extracto proteico) se usó para la cuantificación

### **7.6.1 Cuantificación de citocinas por ELISA**

El nivel de las citocinas se midió por el método de ELISA (por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*; Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Para la cuantificación de las citocinas pro y anti-inflamatorias, se utilizaron los Kits, Mouse IL-1 $\beta$  BD OptEIA™ ELISA Kit, Mouse TNF- $\alpha$  BD OptEIA™ ELISA Kit, Mouse IL-6 BD OptEIA™ ELISA Kit, Mouse IL-10 BD OptEIA™ ELISA Kit, Mouse IL-17 BD OptEIA™ ELISA Kit, Mouse IL-12 BD OptEIA™ ELISA Kit, Mouse IL-4 BD OptEIA™ ELISA Kit Se siguieron las instrucciones descritas por los proveedores. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Immuno Plate Maxisorp, Rosekilde, Denmark). La lectura de densidad óptica se midió después de 30 minutos a 405 nm.

### **7.6.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante GSH, GSSH, ON y MDA.**

La actividad de GSH (glutación reducido) se determinó utilizando el método descrito por Sedlak y Lindsay (1968), en el que se midieron los grupos tiol en el reactivo de Ellman, 5,5' ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB). Se mezclaron el extracto proteico (cerebro 100 e hígado 5  $\mu$ L) con 700  $\mu$ L de Buffer de fosfatos (PBS), 2 ml de tampón TRIS (0.4 mM-pH 8.9) y con 50  $\mu$ L

DTNB 6mM, y se registró la absorbancia a 412 nm. El GSSG (glutación oxidado) se determinó usando el extracto proteico (cerebro 50 e hígado 0.5  $\mu$ L) mezclado con 150 $\mu$ L para cerebro y 199.5 $\mu$ L para hígado de Buffer de fosfatos ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  143mM + EDTA 6mM pH 7.5) y 100  $\mu$ L DTNB 6mM. Se redujo la mezcla de GSSG a GHS usando un 1 $\mu$ L de la enzima GR en presencia de 50 $\mu$ L NADPH y se registró la absorbancia 412 nm. El cambio de color durante la reacción y la velocidad de reacción son proporcionales a las concentraciones de GSH/GSSG (Sedlak & Lindsay, 1968).

El malondialdehído (MDA) es el producto final de la peroxidación de ácidos grasos y un marcador de radicales libres. La determinación de MDA se realizó siguiendo la prueba de ácido tiobarbitúrico (TBA). Se tomaron 50  $\mu$ L del extracto proteico de cerebro y 10  $\mu$ L de hígado. Se mezclaron el extracto proteico con 200  $\mu$ L de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.2 M y 25  $\mu$ L de TBA. Se encubo la solución durante 60 min a 90 °C, posteriormente se hizo reaccionar con n-butanol y se registró la absorbancia 535 nm.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que juega un papel importante para determinar estrés oxidante. Un medio para investigar la formación de óxido nítrico es medir el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que es uno de los dos productos de descomposición primarios, estables y no volátiles de NO. Este ensayo se basa en una reacción de diazotización que se describió originalmente por Griess en 1879. Usando 50  $\mu$ L extracto proteico de cerebro e hígado se realizó la reacción con 50  $\mu$ L sulfanilamida 1% y diclorhidrato de N-1-naftilendiamina (NED) 0.1% en condiciones ácidas ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  5%). El ensayo se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc-Immuno Plate

Maxisorp, Rosekilde, Denmark). La lectura de densidad óptica se midió después de 30 minutos a 520 nm (Griess, 1879).

### **7.7 Análisis estadístico**

Los resultados de los ensayos conductuales, concentración de citocinas y actividad antioxidante fueron analizados utilizando la prueba de Análisis de varianza o ANOVA, con una postprueba de *Dunnet* a un nivel de significancia de \* $p < 0.05$ , al compararse cada grupo con el Veh en cada ensayo farmacológico. Se utilizó el software GraphPad Prism 9 para la representación gráfica y el análisis estadístico.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Obtención de extractos de *Tagetes lucida*.

De las partes aéreas de la planta se obtuvieron en total 4 extractos, cada uno de ellos de diferente polaridad y rendimiento; como se indica en la Tabla 6, el más abundante fue el acetato de etilo TIAEt.

**Tabla 6.** Rendimiento de extractos provenientes de *T. lucida*

<i>Tagetes lucida</i> Cav (Partes aéreas) Peso seco 4 kg		
Extracto	Peso en g	Rendimiento (%)
TIHex	84.7	2.11
TIAEt	284.0	7.1
TIMet	241.2	6.03
TI Aq	277.5	6.93

TIHex extracto hexánico; TIAEt, extracto de acetato de etilo; TIMet, extracto metanólico; TIAq, extracto acuoso

### 8.2 Efecto de extractos de *T. lucida* en las pruebas agudas

#### 8.2.1 Catalepsia inducida con HAL

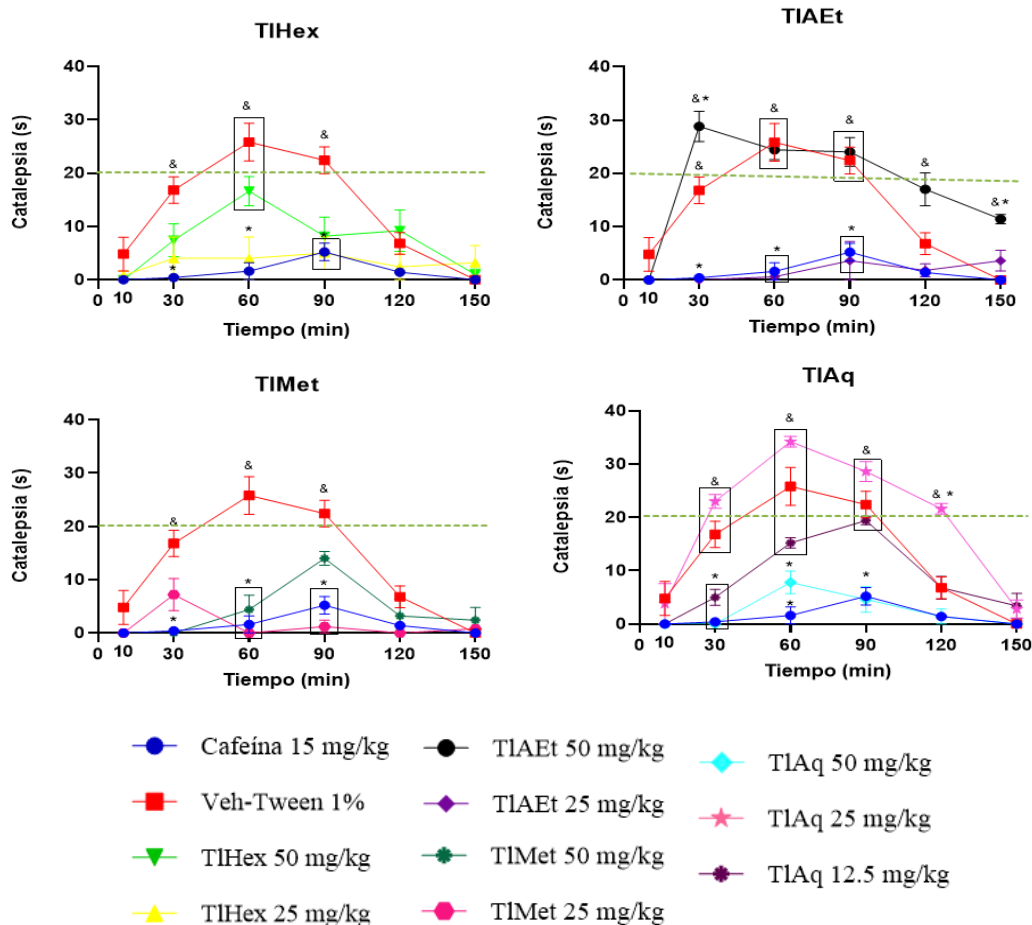
Los resultados obtenidos en este ensayo (Figura 22), muestran que el control negativo Veh-Tween 1% (■) es decir los animales que no se les administro ningún tipo de tratamiento, presentaron una tendencia para incrementar el tiempo del estado de inmovilidad de los ratones en la PB, desde el min 10. Efecto que fue progresivo conforme pasaba el tiempo; en el minuto 30, ya se observó un aumento significativo del tiempo de inmovilidad en la barra respecto al grupo con cafeína (15 mg/kg,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no fue sino hasta el minuto 60 y hasta el minuto 90 que se presentó el efecto cataléptico (permanencia en la barra sin moverse, más allá de 20 seg), estos datos fueron significativamente diferentes también a la cafeína (●,  $p < 0.05$ ); El efecto inducido con HAL, se bloqueó por completo en los minutos 120 y 150 ( $p < 0.05$ ). El



tratamiento TIHex a una dosis de 50 mg/kg (▼), incrementa el tiempo de la postura inmóvil del animal y se presenta como una tendencia desde el minuto 30, con un pico máximo al minuto 60, sin embargo, esto no representa una actividad cataléptica.

La administración de TIAEt a 50 mg/kg (●), induce un incremento significativo respecto al grupo con cafeína, en el tiempo de permanencia en la postura inmóvil de los ratones, mostrando catalepsia desde el minuto 10 y hasta el minuto 120, incluso al minuto 150 los ratones aún tenían rasgos de dicha actividad ( $p < 0.05$ ). Para este tratamiento, la actividad cataléptica en los tiempos de 30 y 150 minutos presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de animales que sólo reciben el HAL ( $p < 0.05$ ). Y en el minuto 30 se da con un tiempo superior a los 20 seg potenciando el efecto cataléptico sobre el HAL. La dosis menor de TIAEt, 25 mg/kg, fue capaz de bloquear completamente el estado cataléptico inducido con el agonista D2, comportándose igual que la cafeína.

TIAq a 25 mg/kg (★), induce un incremento significativo en comparación con la cafeína ( $p < 0.05$ ) en la postura de inmovilidad de la barra, desde el minuto 30, con catalepsia ya en el minuto 60 y hasta el 90, y para el minuto 120 además de la diferencia con la cafeína se presenta una diferencia estadísticamente significativa por encima de los 20 segundos con el grupo que solo recibió HAL ( $p < 0.05$  \*), efecto que cae posteriormente; se observa un patrón similar que el del grupo control negativo.



**Figura 22.** Efecto de los extractos de *T. lucida* sobre el estado cataléptico inducido con HAL 0.5mg/kg en PB. Veh-tween, control negativo; Cafeína, control positivo; TIHex extracto hexánico; TIAEt, extracto de acetato de etilo; TIMet, extracto metanólico; TIAq, extracto acuoso. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5 \pm DE$ , (&  $p < 0.05$ ) en comparación con control positivo y (\*  $p < 0.05$ ) al vehículo.

Mientras que, la dosis menor, 12.5 mg/kg (✱), provoca un incremento en el tiempo de inmovilidad de los ratones sobre la barra desde el minuto 30 que tiende a incrementarse hasta presentarse la catalepsia en el minuto 60 con un pico máximo en el minuto 90 (\* $p < 0.05$ ), y disminuye para el minuto 120 y 150. Sin embargo, los resultados presentados a una dosis de 50 mg/kg (◆) bloquean el efecto del HAL, en todos los tiempos analizados. Ambas dosis 50 (✱)

y 25 (●) mg/kg del extracto TIMet, disminuyen la catalepsia inducida con HAL, observándose un mayor bloqueo en la dosis menor.

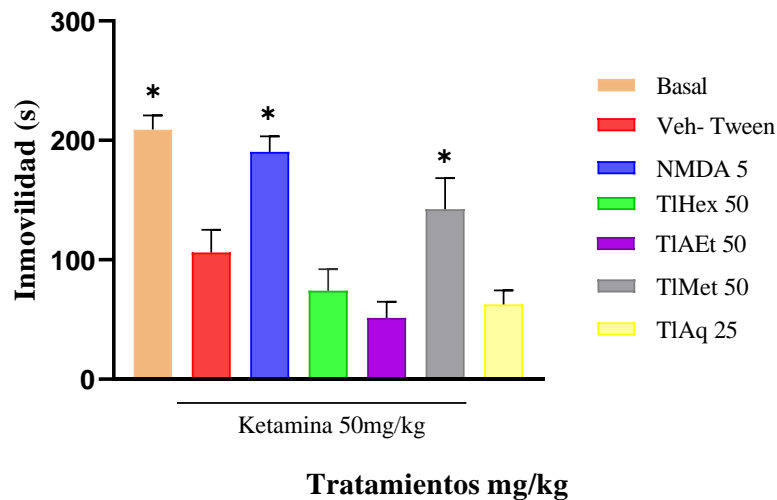
### **8.2.2 Efecto de *Tagetes lucida* sobre diferentes parámetros de psicosis inducida con KET**

De acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo de catalepsia inducida con haloperidol, se procedió a realizar la evaluación en el modelo de psicosis inducida con ketamina de los extractos (TIHex, TIAEt y TIMet a 50 mg/kg y TIAq a 25 mg/kg), utilizando diferentes pruebas conductuales.

- ***Prueba de natación forzada.***

La KET (Veh-Tween) provocó una disminución en el tiempo de inmovilidad de los ratones cuando fueron expuestos al cilindro con agua, con respecto al grupo basal. El antagonista de KET, el NMDA provocó un incremento significativo de la variable de inmovilidad, respecto al Veh-Tween ( $p < 0.05$ )

Para los extractos de TIHex y TIAEt a una dosis de 50 mg/kg y TIAq a 25 mg/kg se observa una disminución significativa de la inmovilidad respecto al grupo control negativo (Veh-Tween) ( $p < 0.05$ ) y el efecto fue similar al NMDA a 5 mg/kg.



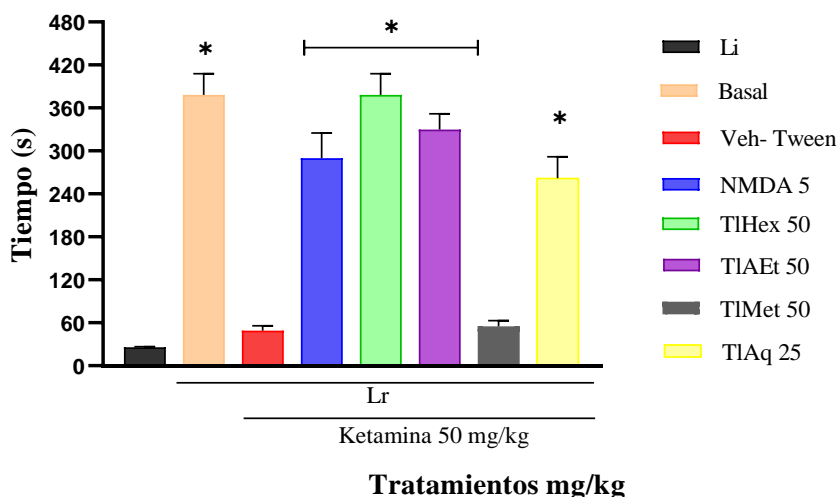
**Figura 23.** Efecto de los extractos de *T. lucida* sobre el tiempo de inmovilidad inducido con ketamina en prueba de NF. Basal, animales sin daño; Veh- Tween, control negativo; NMDA, control positivo; TIHex extracto hexánico; TIAEt, extracto de acetato de etilo; TIMet, extracto matanolico; TIAq, extracto acuoso. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5\pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween (-).

- **Prueba de evitación pasiva.**

En la Figura 24 se observa el tiempo de latencia durante el entrenamiento, Li, todos los grupos fueron iguales estadísticamente y se encuentran representados en la barra negra de la figura, con un promedio de 20.85 s. En la fase Lr, tiempo de latencia durante la prueba, se puede observar que el grupo Veh (control negativo) y TIMet 50mg/kg presentaron un tiempo similar al Li, por lo que este extracto no generó ningún tipo de aprendizaje en los roedores, y por lo tanto no presentó una diferencia estadísticamente significativa con el grupo de daño ( $p < 0.05$ ).

Por lo contrario, el grupo basal que representa animales sanos, mostraron un comportamiento normal de aprendizaje, por lo que todos recordaron el estímulo aversivo.

Así mismo, como se esperaba la administración de NMDA a 5 mg/Kg, induce el incremento en el Lr, ya que lograron recordar el estímulo aversivo y su tiempo de respuesta fue mayor al presentado en la etapa inicial y al grupo solo de KET. Un comportamiento similar se observó con los grupos que recibieron los extractos TIHex y TIAEt a 50 mg/kg y TIAq a 25 mg/kg. Estos datos fueron estadísticamente diferentes al del grupo con sólo KET ( $*p < 0.05$ , Figura 24)

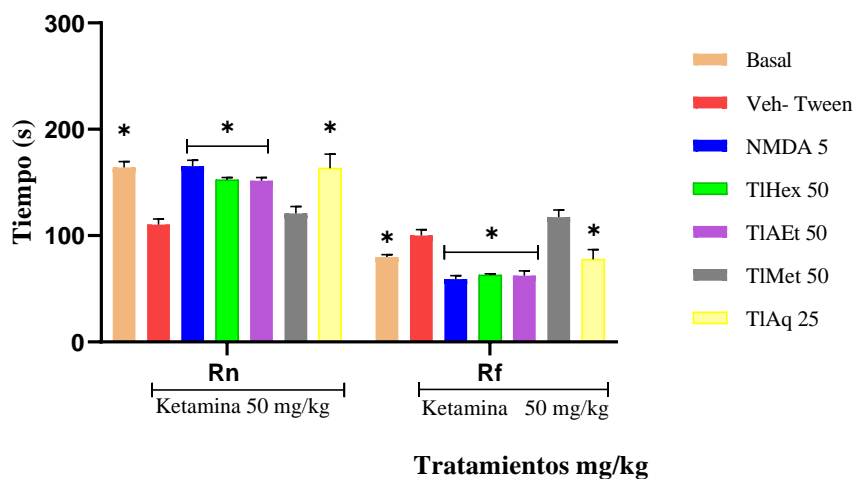


**Figura 24.** Efecto de los extractos de *T. lucida* sobre el deterioro cognitivo inducido con ketamina en prueba EP. Basal, animales son daño; Veh-Tween, control negativo; NMDA, control positivo; TIHex extracto hexánico; TIAEt, extracto de acetato de etilo; TIMet extracto metanólico; TIAq, extracto acuoso. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5 \pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween (-)

- **Interacción social.**

En la Figura 25, se observa que los animales del grupo Basal gastan significativamente más tiempo oliendo a un ratón nuevo (Rn) en comparación con el ratón familiar (Rf) que aquellos del grupo de daño con KET (Veh-Tween 1%  $*p < 0.05$ ) los cuales invierten el mismo tiempo tanto con el Rn como con el Rf. El extracto de AEt a 50 mg/kg y TIAq a 25 mg/kg fueron capaces de contrarrestar de manera significativa el efecto de KET sobre la sociabilidad, marcada como número de olisqueos ( $*p < 0.05$ ) hacia los Rn en comparación de los Rf, mientras que

TlMet no modifica dicho parámetro por lo que su interacción fue igual a los animales del grupo control negativo sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).



**Figura 25.** Efecto de los extractos de *T. lucida* sobre la disminución del tiempo de interacción inducido con ketamina en prueba de IS. Basal, animales son daño; Veh-Tween, control negativo; NMDA, control positivo; TIHex extracto hexánico; TIAEt, extracto de acetato de etilo; TlMet extracto metanólico; TIAq, extracto acuoso. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5 \pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween (-)

- **Prueba campo abierto.**

En el ensayo agudo de inducción de ketamina, los síntomas positivos se evaluaron en el CA. En la Tabla 7 se indica que los parámetros evaluados en el grupo basal presentan valores menores a los animales que recibieron KET y Veh (control negativo), ( $* p < 0.05$ ). Mientras que, el grupo de ratones que recibió el fármaco NMDA a 5 mg/kg, mostraron un comportamiento similar al basal en los parámetros de CT, Ac, TAc, EV, CE y TCE, todos ellos mostraron diferencia estadística con el Veh ( $*p < 0.05$ ).

**Tabla 7.** Efecto de los extractos de *T. lucida* sobre síntomas positivos de la esquizofrenia inducida por ketamina en la prueba de CA.

Tratamientos (mg/kg)	CT No. eventos	EV No. eventos	Ac No. eventos	TAc Segundos	CE No. eventos	TCE Segundos
Basal	235.0 ± 14.62*	135.2 ± 11.45*	27.8 ± 0.73*	185.4 ± 9.75*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
<b>KET 50 mg/kg</b>						
Veh- Tween	435.6 ± 9.23	225.0 ± 15.33	42.2 ± 3.73	272.6 ± 8.09	13.8 ± 1.28	37.6 ± 5.53
NMDA 5	267.6 ± 14.94*	71.6 ± 2.6*	20.4 ± 3.69*	190.0 ± 29.38*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
TIHex 50	227.8 ± 23.35*	144.2 ± 18.43*	22.8 ± 2.80*	223.4 ± 31.94	1.00 ± 0.63*	33.2 ± 19.20
TIAEt 50	216.4 ± 30.87*	95.2 ± 17.75*	24.4 ± 4.08*	176.4 ± 7.89*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
TIMet 50	238.6 ± 6.02*	240.8 ± 11.31	49.2 ± 5.65	194.0 ± 3.45*	4.00 ± 1.76*	5.80 ± 1.59*
TIAq 25	209.6 ± 34.98*	124.8 ± 12.94*	17.2 ± 2.28*	105.0 ± 22.19*	0.40 ± 0.40*	2.0 2.00*

Cruces totales (CT, No. eventos), Elevamientos verticales (EV, No. eventos), Acicalamiento (Ac, No. eventos), tiempo invertido en acicalarse (TAc, segundos) Conductas estereotipas (CE, No. eventos), Tiempo invertido en conductas estereotipadas (TCE, segundos). Basales: ratones sin ketamina. ANOVA, post-prueba Dunnet, \* $p \leq 0.05$  en comparación con el grupo VEH (n=5, ± SE).

La administración de todos los extractos indujo una disminución significativa, en el número de CT, con respecto al control negativo. Así mismo los EV y los Ac disminuyeron significativamente, a excepción del grupo TIMet a 50 mg/kg en el cual aumento el número de eventos en los dos parámetros, superando al control negativo sin diferencia significativa. Aunado a los resultados obtenidos con los diferentes extractos en el parámetro de Ac los animales invirtieron menos tiempo en acicalarse (TAc) con diferencia significativa con respecto grupo de daño (\* $p < 0.05$ ), sin embargo, el grupo TIMet provoca sólo una tendencia a disminuir esa variable, pero no logra ser significativamente diferente al Veh-Tween.

En cuanto a las conductas estereotipadas (CE) y el tiempo invertido en estas (TCE), se puede observar que el grupo de daño presentó valores mayores que los extractos de TIMet y TIAq a

las dosis administradas, con diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ), y el extracto de TIAEt no provoca dichas conductas, por lo que no se registró algún valor.

Cabe señalar que el TIHex, induce una disminución significativa en el número de CE a tal nivel que sólo se observó  $1 \pm 0.63$  eventos, sin embargo, el tiempo promedio en el que realizó dichas conductas, fue similar al del Veh ( $p > 0.05$ ).

### **8.3 Efecto neurotóxico de la administración aguda de extractos de *T lucida* mediante prueba de *Irwin***

La prueba de neurotoxicidad de *Irwin* se llevó a cabo durante 16 días, en los cuales los roedores del grupo basal presentaron un desarrollo normal sin evidenciar conductas que denotaran daño. En las primeras 24 horas de la observación (Tabla 8) los animales de Daño (D) los cuales fueron administrados con LPS mostraron pelos erizados, ptosis palpebral, inmovilidad, amontonamientos y diarrea en los primeros 30 min, estos se presentaron de forma leve. Para el minuto 60, 3 de los parámetros habían aumentado su escala de manera moderada, y para las 2 primeras horas después de la administración estos habían aumentado de manera severa, manteniéndose así durante las siguientes 4 y 6 horas. A las 24 horas de observación seguían manteniendo los síntomas, pero estos disminuyeron de manera leve.

Los animales del Aq (Extracto acuoso) administrados a 300 y 500 mg/kg presentaron un comportamiento normal igual a los roedores del grupo Basal. Así como también el grupo AEt (extracto Acetato de Etilo) a una dosis de 300 mg/kg. Sin embargo, para la dosis de AEt a 500 mg/kg en los primeros 60 min se observó ptosis palpebral e inmovilidad de manera moderada, a las siguientes 2 y 4 horas los parámetros habían disminuido su escala de manera leve y se



sumaron amontonamientos y pelos erizados igualmente de forma leve. Para las 6 y 24 horas ya no se registró presencia de los síntomas anteriormente presentados.

Ambos extractos (Aq y AEt) a una dosis de 1000 mg/kg evidenciaron desde los primeros 30 minutos ligeros amontonamientos, los cuales se mantuvieron para el extracto Aq hasta 2 horas y para el extracto AEt hasta 4 horas. Se registraron otras variables, para el extracto Aq pelos erizados y ptosis palpebral de manera leve desde el minuto 60 hasta las 2 horas, y para el extracto AEt pelos erizados de forma leve, ptosis palpebral e inmovilidad moderadamente desde el minuto 60 hasta las primeras 24 horas de observación. Para los 3 animales por grupo que permanecieron en observación durante 15 días más, se realizó un registro de parámetros cada 24 horas, en la que solo los animales del grupo D y el extracto AEt a 1000 mg/kg siguieron presentando algunos síntomas después de las primeras 24 horas de administración (Tabla 9).

**Tabla 8.** Parámetros conductuales asociados a toxicidad durante las primeras 24 horas de observación.

Tiempo	30 min							60 min							2 horas										
	B	D	Aq 300	Aq 500	Aq 1000	AEt 300	AEt 500	AEt 1000	B	D	Aq 300	Aq 500	Aq 1000	AEt 300	AEt 500	AEt 1000	B	D	Aq 300	Aq 500	Aq 1000	AEt 300	AEt 500	AEt 1000	
Contorsiones	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pelos erizados	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-	+	-	++	-	-	+	-	+	+	
Ptois Palpebral	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	++	++	-	+++	-	-	+	-	+	++	
Inmovilidad	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	++	-	+++	-	-	-	-	+	++	
Amontonamiento	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	
Tono muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tremores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Parálisis miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Secreción salival	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Otros	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Muerte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tiempo	4 horas							6 horas							24 horas										
	B	D	Aq 300	Aq 500	Aq 1000	AEt 300	AEt 500	AEt 1000	B	D	Aq 300	Aq 500	Aq 1000	AEt 300	AEt 500	AEt 1000	B	D	Aq 300	Aq 500	Aq 1000	AEt 300	AEt 500	AEt 1000	
Contorsiones	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pelos erizados	-	++	-	-	-	-	+	+	-	++	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	+	
Ptois Palpebral	-	+++	-	-	-	-	+	++	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	-	-	-	++	
Inmovilidad	-	+++	-	-	-	-	+	++	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	-	-	-	++	
Amontonamiento	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Tono muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tremores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Parálisis miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Secreción salival	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Otros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Muerte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

B, Basal; D, Daño -LPS 2.5mg/kg; Aq, Extracto Acuso-mg/kg; AEt, Extracto Acetato de Etilo-mg/kg; Otros, Diarrea. (-) Sin presencia; (+) Leve; (++) Moderado; (+++) Severo.

Los animales del grupo de D continuaron presentando síntomas durante 5 días más, para las 48, 72 y 96 horas tenían aún pelos erizados, ptosis palpebral e inmovilidad moderada y un ligero amontonamiento, síntomas que para las 120 horas todavía se podían observar levemente, a excepción del amontonamiento.

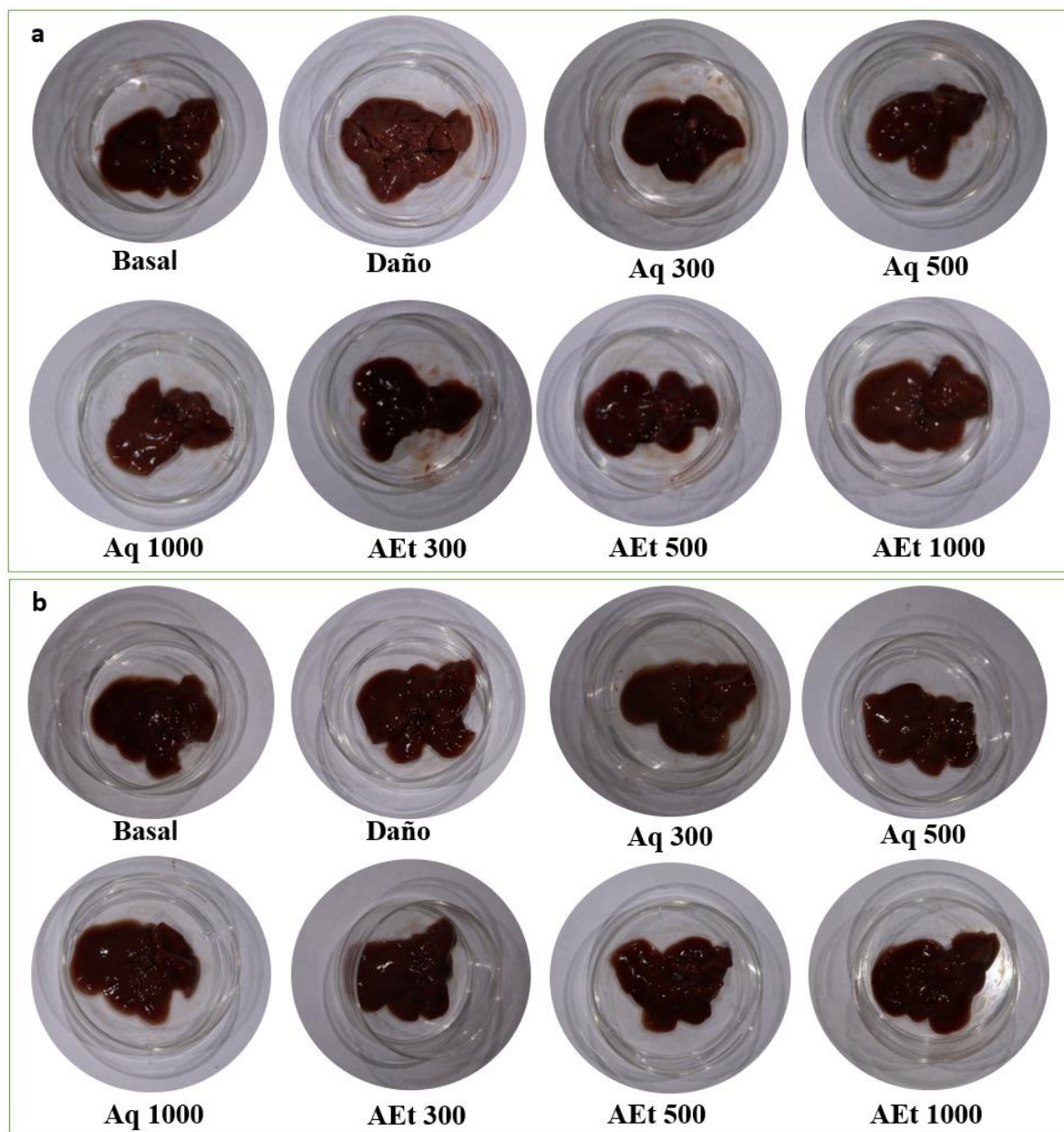
**Tabla 9.** Parámetros conductuales asociados a toxicidad cada 24.

Tiempo	48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	D	AEt 1000	D	AEt 1000	D	AEt 1000	D	AEt 1000	D	AEt 1000
Contorsiones	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pelos erizados	++	+	++	+	+	+	+	-	+	-
Ptosis palpebral	++	+	++	+	++	-	+	-	-	-
Inmovilidad	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-
Amontonamiento	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Tono muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parálisis miembros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Secreción salival	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muerte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D, Daño -LPS 2.5mg/kg; AEt, Extracto Acetato de Etilo- mg/kg; Otros, Diarrea. (-) Sin presencia; (+) Leve; (++) Moderado; (+++) Severo

En la tabla 9, se aprecia que a las 144 horas los animales no cursaban con ptosis palpebral e inmovilidad, sin embargo, aún permanecían los pelos erizados de forma leve, parámetro que para las 168 horas ya habían desaparecido. Para el extracto AEt a 1000 mg/kg los roedores continuaron con pelos erizados y ptosis palpebral de forma leve después de las primeras 24 horas de administración. La ptosis palpebral continuo hasta las 72 horas y los pelos erizados hasta las 96 horas, para las 120 horas ya no había presencia de ninguno estos signos.

Al finalizar las primeras 24 horas los 3 animales por grupo fueron sacrificados y se realizó la disección de los tejidos (Figura 26a), además, se realizó el mismo procedimiento con los animales que continuaron en el modelo por 15 días más (Figura 26b).



**Figura 26.** Imágenes representativas de hígados del efecto toxico de animales con diferentes tratamientos durante la prueba de *Irwin*. **a)** primeras 24 horas. **b)** al finalizar los 16 días. Basal, animales sanos; Daño, animales administrados con LPS 2.5mg/kg; Aq, Extracto Acuso-mg/kg; AEt, Extracto Acetato de Etilo-mg/kg

#### **8.4 Caracterización química de *Tagetes lucida*.**

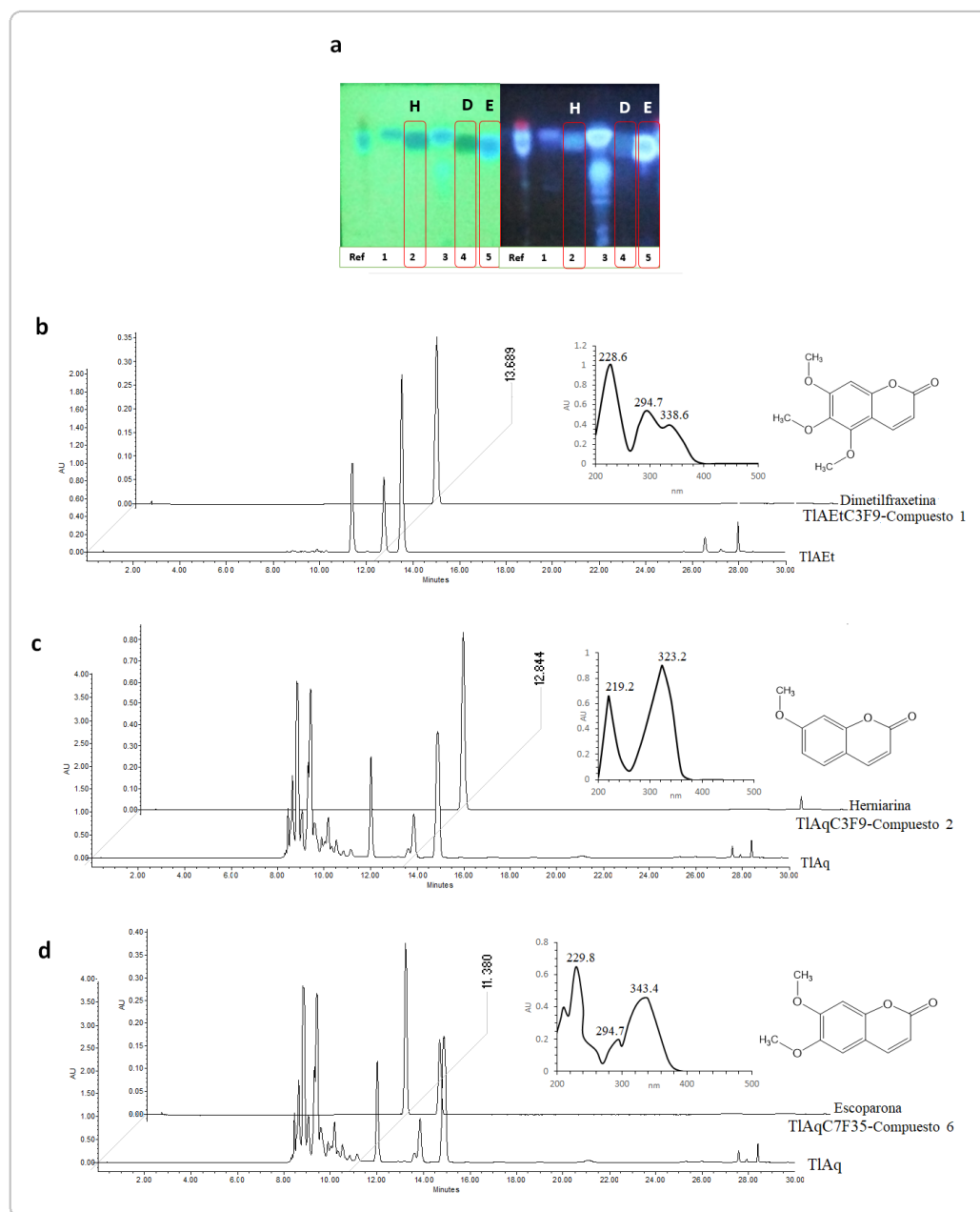
En búsqueda de compuestos con actividad antipsicótica se realizó la separación cromatográfica de los extractos con mayor actividad de acuerdo con los resultados obtenidos y el rendimiento de estos extractos en las pruebas realizadas tanto por vía dopaminérgica como por vía glutamatérgica.

##### **8.4.1 Separación química y elucidación estructural de compuestos aislados de TIAEt y TIAq**

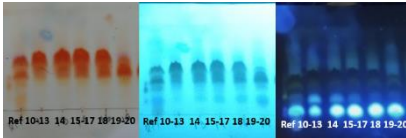
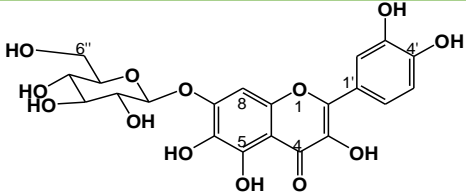
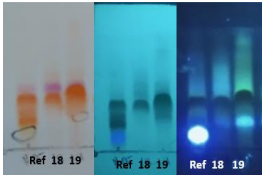
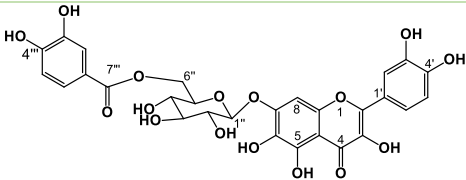
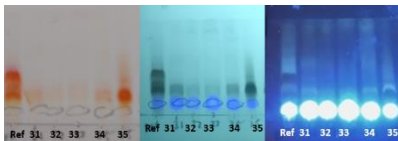
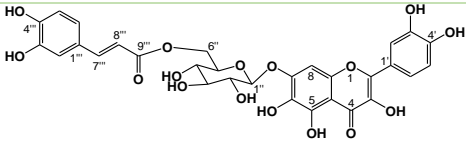
Los resultados obtenidos de la separación y seguimiento cromatográfico de los extractos de TIAEt y TIAq permitieron el aislamiento de 6 compuestos, 3 de ellos tipo cumarina que se pueden observar mediante CCF a longitudes de onda de 254 y 365 nm como lo indica la Figura 27a en los carriles 2, 4 y 5 y que de acuerdo con los resultados comparativos de estándares en CCF y cromatogramas y espectros UV mediante CLAR se describieron como dimetilfraxetina ó 6,7,8-trimethoxycoumarin- compuesto 1 (Figura 27b) correspondiente al extracto TIAEt (TIAEtC3F9), herniaria- compuesto 2 (TIAqC3F9-Figura 27c) y escoporona -compuesto 6 (en mezcla con flavonoide-TIAqC7F35- Figura 27d) ambos del extracto acuoso, anteriormente reportados para la especie por Monterrosas-Brisson y colaboradores en 2020.

Mediante técnicas de elucidación estructural se identificaron los 3 compuestos restantes, provenientes del extracto TIAq, 2 de ellos tipo flavonoide y un último compuesto como mezcla de flavonoide y escoporona. Los 3 compuestos tipo flavonoide identificados por primera vez para la especie fueron Quercetagetina 7-O-glucopiranosido, Quercetagetina 7-O-β -

(6''protocatecol) glucopiranosido y Quercetagetina 7-O-β- (6''- cafeoil) glucopiranosido (compuestos 3, 4 y 5 respectivamente).



**Figura 27.** Perfil cromatográfico de cumarinas aisladas y reportadas de TLAEt y TIAq  $\lambda=350$  nm. a) placa fase normal vista a  $\lambda=254$  y  $365$  nm, sistema 95:5 diclorometano-metanol; Ref, referencia; H, hernierina; D, dimetilfraxetina; E, escoporona. b) Cromatograma de TLAEt y dimetilfraxetina, espectro UV y estructura química de dimetilfraxetina. c) Cromatograma de TIAq y herniarina, espectro UV y estructura química de herniarina. d) Cromatograma de TIAq y Escoporona, espectro UV y estructura química de escoporona.

Fracción	CCF	Estructura
<b>TIAqC6F14</b> <b>Compuesto 3</b>	 Rev      254nm      365nm	 Quercetagetina 7-O-glucopiranósido
<b>TIAqC7F19</b> <b>Compuesto 4</b>	 Rev      254nm      365nm	 Quercetagetina 7-O-β - (6''protocatecoil) glucopiranósido
<b>TIAqC735</b> <b>Compuesto 5</b>	 Rev      254nm      365nm	 Quercetagetina 7-O-β- (6''- cafeoil) glucopiranósido

**Figura 28.** Estructuras de compuestos tipo flavonoide aislados del extracto TIAq de *T. lucida*. Placas cromatográficas reveladas en un sistema 7:3 agua/acetonitrilo, reveladas con flavonoides vistas a  $\lambda=254$  y 365 nm

El Compuesto 3, un precipitado amarillo amorfo, que luego de ser revelado con reactivos específicos para flavonoides, se tornó naranja y absorbió luz UV (Figura 28). En el espectro UV-vis, mostró un max de 214, 260 y 357 nm, que son característicos de los flavonoles. La masa molecular de los compuestos 3, 4 y 5 mostraron picos moleculares correspondientes a  $m/z$  479,03 [C<sub>21</sub> H<sub>19</sub> O<sub>13</sub>] 639 [C<sub>28</sub> H<sub>24</sub> O<sub>16</sub>] y 640 [C<sub>30</sub> H<sub>25</sub> O<sub>16</sub>] respectivamente (Anexo 1).

Los compuestos **4** y **5** presentaron características tipo flavonoide de acuerdo con su coloración y adsorción presentada mediante CCF (Figura 28).

Mediante un análisis comparativo de los datos espectroscópicos con los descritos en la literatura (Shahzadi & Shah, 2015) se pudo determinar que el compuesto **3** corresponde al quercetagenin-7-O- $\beta$ -glucopiranosido (Tabla 10 y 11).

**Tabla 10.** Valores de desplazamiento químico de protón de compuestos 3,4 y 5  $\delta^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm, J en Hz)

Posición	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5
<b>8</b>	6.95, s	6.91, s	6.75, s
<b>2'</b>	7.76, d (2.2)	7.76, d (2.2)	7.69, d (1.8)
<b>5'</b>	6.89, d (8.4)	7.65, dd (1.8, 2.4)	6.52, d (8.0)
<b>6'</b>	7.67, dd (2.2, 8.4)	6.88, d (8.4)	6.55, dd (1.8, 8.0)
<b>Glucopiranosido</b>			
<b>1''</b>	5.04, d (7.7)	5.04, d (7.3)	5.23, d (7.3)
<b>2''</b>	3.58, dd (7.7, 9.1)	3.59, dd (7.3, 9.1)	5.36, dd (7.3, 9.5)
<b>3''</b>	3.53 dd (9.1, 9.1)	3.55, dd (8.8, 9.1)	5.33 dd (9.1, 9.1)
<b>4''</b>	3.43, dd (8.8, 9.5)	5.44, dd (9.1, 9.1)	5.21, dd (9.1, 9.1)
<b>5''</b>	3.56, m	3.57, m	4.09-4.12, m
<b>6a''</b>	3.96, dd (2.2, 12.1)	3.96, dd (2.2, 12.4)	4.49, dd (2.5, 12.4)
<b>b</b>	3.73, dd (6.2, 12.1)	4.32, dd (5.8, 12.1)	4.32, dd (5.1, 12.4)
		<b>Protocateico</b>	<b>Cafeico</b>
<b>2'''</b>		6.82, d (1.8)	6.73, d (1.8)
<b>5'''</b>		6.79, d (8.4)	6.82, d (8.4)
<b>6'''</b>		7.29, dd (1.8, 8.4)	7.56, dd (1.8, 8.4)
<b>7'''</b>			7.42, d (15.7)
<b>8'''</b>			6.16, d (15.7)



**Tabla 11.** Valores de desplazamiento químico de carbono de compuestos 3,4 y 5  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\delta$  en ppm)

Posición	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5
2	146.2	148.8	148.7
3	137.2	137.2	135.7
4	177.6	177.5	175.9
5	148.9	146.1	148.7
6	130.9	130.9	129.4
7	152.9	152.8	151.1
8	95.4	95.4	93.6
9	150.4	150.3	145.4
10	106.7	106.6	105.2
1'	124.1	124.1	122.7
2'	116.2	116.3	114.8
3'	146.8	146.2	147.4
4'	149.1	149.0	144.0
5'	116.2	116.2	115.1
6'	121.9	121.9	120.5
<b>Glucopiranosido</b>			
1''	102.7	102.7	98.4
2''	74.7	74.7	70.2
3''	77.5	77.5	72.3
4''	71.4	71.4	68.3
5''	78.55	78.5	72.4
6''	62.5	62.52	61.9
		<b>Protocateico</b>	<b>Cafeico</b>
1'''		127.8	126.0
2'''		116.1	114.2
3'''		146.8	147.4
4'''		158.9	144.6
5'''		116.2	114.8
6'''		128.9	120.8
7'''		167.26	146.1
8'''			113.1
9'''			167.7

Los compuestos **4** y **5** mostraron las mismas señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que el compuesto **3** (Anexo 2), con la diferencia que en **4** y **5**, se observaron señales adicionales características de un anillo aromático con un Sistema ABX en  $\delta$  6,82 (d, 1,8 Hz), 6,79 (d, 8,4 Hz) y 7,29 (dd, 1,8,

8,4) y  $\delta$  6,73 (d, 1,8 108 Hz), 6,82 (d, 8,4 Hz) y 7,56 (dd, 1,8, 8,4 Hz) asignados a H-2''', H-5''' y H-6''', respectivamente. Además, en **5**, se observó una señal de doble enlace trans en  $\delta$  7,42 (d, 110 15,7) y 6,16 (d, 15,7) (Tabla 10 y 11).

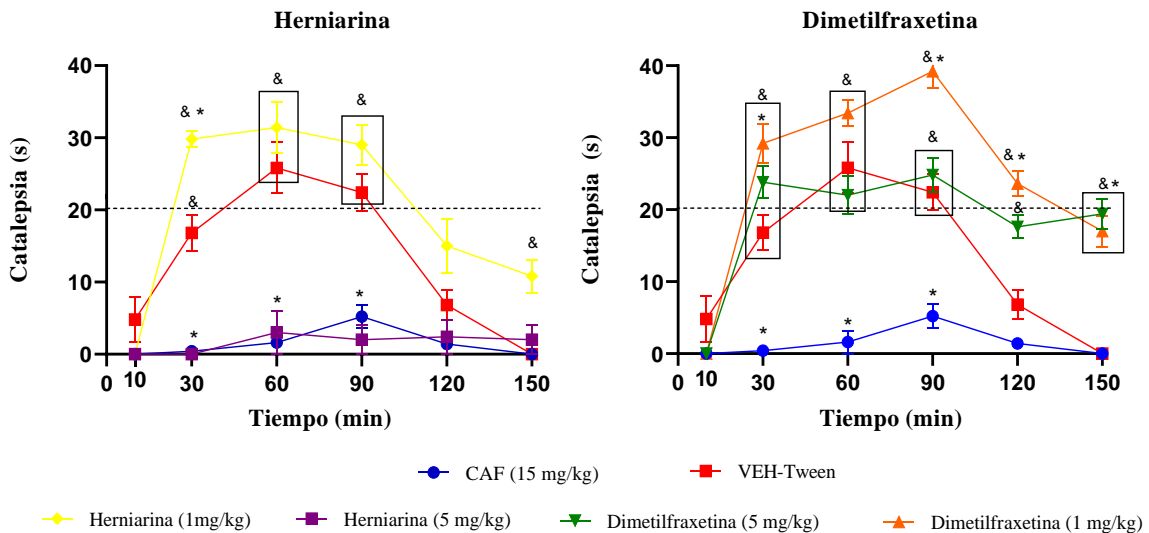
El análisis de los espectros de RMN de una y dos dimensiones y la comparación con los datos descritos en la literatura identificó la presencia de ácidos protocateico y cafeico. (HMBC Anexo 3, HSQC Anexo 4 y COSY Anexo 5). Tanto el compuesto **4** como el **5** tienen un glucopiranosido de quercetagetin-7-O- $\beta$  como su estructura base, y los ácidos están unidos al carbono 6 de la glucosa. Esto se observó por la correlación en el HMBC de metileno H-6''a ( $\delta$  3.96) y H-6''b ( $\delta$  115 4.32) con carbonilo en C-8'' ( $\delta$  167.26) y H-6''a ( $\delta$  4,49) y H-6''b ( $\delta$  4,32) con carbonilo en C-8'' ( $\delta$  167,7), respectivamente. Según el análisis de los datos de RMN (Tabla 10 y 11), el compuesto **4** corresponde a quercetagetina 7-O- $\beta$ -(6''-protocatecoil) glucopiranosido y **5** a quercetagetina 7-O- $\beta$ -(6''-cafeoil) glucopiranosido (Rezaei, *et al.*, 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la separación química los compuestos **1** y **2** correspondientes a dimetilfraxetina y herniarina presentaron un mayor porcentaje de rendimiento en comparación a los otros 4 compuestos aislados, por lo que la disponibilidad de ambos compuestos sumado a los amplios antecedentes que presentan los compuestos tipo cumarinas sobre SNC las hicieron idóneas para ser evaluadas en los modelos agudos mediante vía dopaminérgica y glutamatérgica del presente estudio.

## 8.5 Efecto de las cumarinas de *T. lucida* en los ensayos agudos

### 8.5.1 Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la catalepsia inducida con HAL

Los compuestos fueron probados a dosis de 1 y 5 mg/kg. Los resultados obtenidos en este ensayo (Figura 29) indican que el grupo administrado con dimetilfraxetina a una dosis de 1 mg/kg ( $\blacktriangle$ ), presenta un estado cataléptico al minuto 30, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control positivo (Cafeína 15 mg/kg) (& $p < 0.05$ ), este efecto aumento hasta el minuto 60 y para el minuto 90 y 120 se observa una potenciación cataléptica, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los animales administrados sólo con HAL (\* $p < 0.05$ ). En el minuto 150 hay un decremento en dicha variable menor a los 20 seg, sin embargo, sigue presentando diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control positivo y el grupo Veh-Tween.



**Figura 29.** Efecto de los extractos de *T. lucida* sobre el estado cataléptico inducido con HAL 0.5mg/kg en PB. Veh-tween, control negativo; Cafeína, control positivo. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5 \pm DE$ , \*  $p < 0.05$  en comparación con control positivo.

Para la dosis de dimetilfraxetina a 5 mg/kg (▼), se puede observar desde el minuto 30 al minuto 90 una potenciación de la catalepsia con diferencia significativa con respecto al grupo control positivo ( $p < 0.05$ ) sin embargo no presento diferencia con el grupo de animales solo con HAL ( $p < 0.05$ ). Para el minuto 120 disminuyó de manera progresiva el estado cataléptico y este efecto se mantuvo hasta el minuto 150 por lo que en estos dos puntos no se presentó diferencia estadísticamente significativa con el grupo control positivo ( $p > 0.05$ ) ni con los animales administrados solo con el HAL ( $p > 0.05$ ).

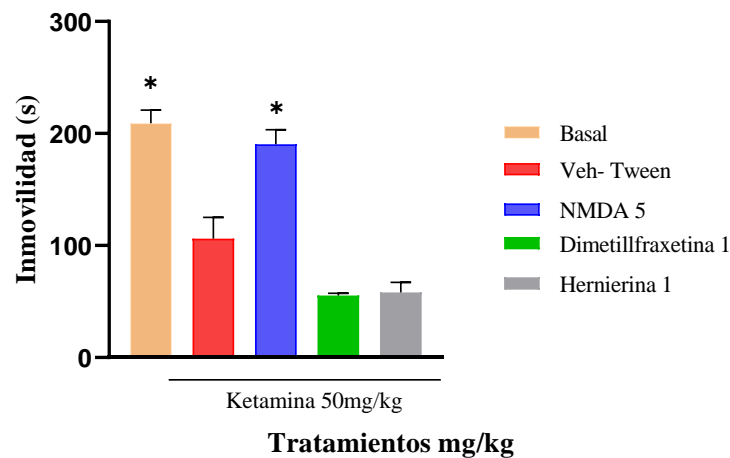
La herniarina a 1 mg/kg (◆) indujo en los ratones un comportamiento similar al de dimetilfraxetina a la misma dosis, con una potenciación de la catalepsia desde el min 30 y una diferencia estadísticamente significativa tanto con el grupo control positivo ( $p < 0.05$ ) como con el grupo de animales solo con HAL ( $p < 0.05$ ) por encima de los 20 seg. En el minuto 90 aumento el estado cataléptico con una diferencia estadísticamente significativa solo con respecto al grupo control positivo ( $p < 0.05$ ) y para el minuto 120 y 150 disminuye progresivamente sin diferencia estadísticamente significativa con ninguno de los dos grupos. Sin embargo, con dosis de 5 mg/kg (■) hay un bloqueo del efecto del HAL, en todos los tiempos analizados.

### **8.5.2 Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre parámetros de psicosis inducida con KET**

Debido a que la dimetilfraxetina y herniarina a 1 mg/kg provocan una potenciación del efecto cataléptico inducido por HAL, se decidió evaluar los compuestos en el modelo de psicosis aguda provocada con KET, y someter a los animales a las diferentes pruebas (NF, EP, IS y CA).

- **Prueba de natación forzada.**

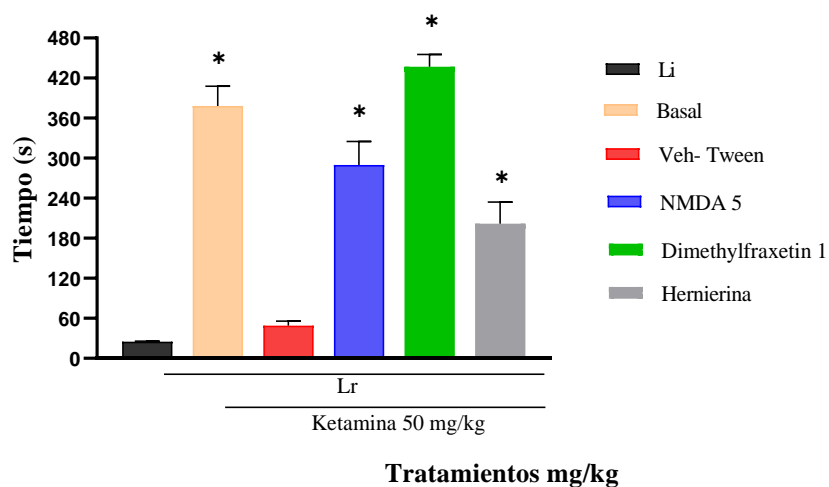
De acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 30 se puede observar que tanto la dimetilfraxetina como la herniarina a 1 mg/kg inducen una disminución significativa del parámetro de inmovilidad respecto al grupo control negativo (Veh-Tween ( $p < 0.05$ )).



**Figura 30.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre el tiempo de inmovilidad inducido con ketamina en prueba de NF. Dimetilfraxetina y herniarina a 1mg/kg; Basal, animales sin daño; Veh-Tween, control negativo; NMDA, control positivo. ANOVA post prueba Dunnett,  $n=5 \pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween (-).

- **Prueba de evitación pasiva.**

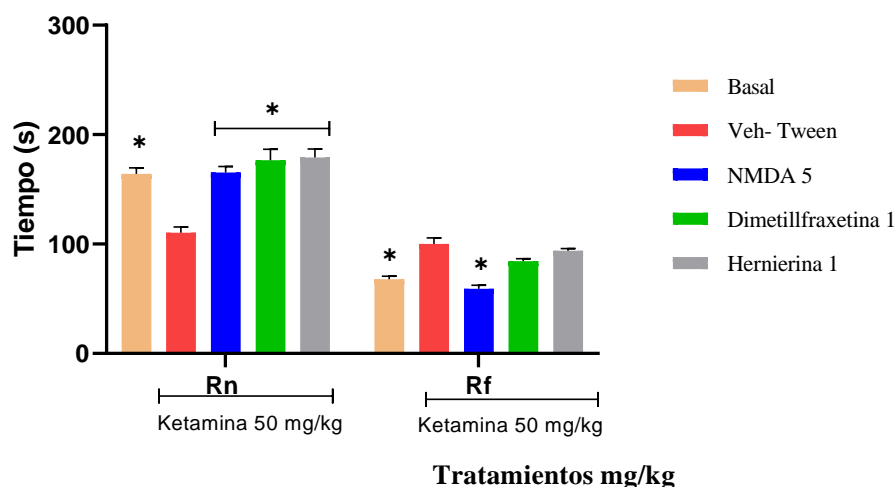
En la Figura 31 se observa que el tiempo de fase Lr de los compuestos dimetilfraxetina y herniarina a 1mg/kg presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Veh-tween ( $*p < 0.05$ ) y la fase Li del experimento. Ambos compuestos lograron revertir el daño causado por la KET, sin embargo, la dimetilfraxetina presentó valores superiores al fármaco de referencia (NMDA 5mg/kg) y a los animales del grupo basal por lo que se puede observar un mejor efecto protector traducido en el aprendizaje de los roedores.



**Figura 31.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre el deterioro cognitivo inducido con ketamina en prueba de EP. Dimetilfraxetina y herniarina a 1mg/kg; Basal, animales sin daño; Veh- Tween, control negativo; NMDA, control positivo. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=5\pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween.

- **Interacción social.**

En la Figura 32, se observa que los compuestos dimetilfraxetina y herniarina a 1mg/kg no presentaron una diferencia estadística con respecto al grupo Veh-tween ( $p > 0.05$ ) en el tiempo de interacción con el ratón familiar (Rf). Sin embargo, este efecto se revierte por ambos compuestos en los olisneos al ratón nuevo (Rn), con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Veh-tween ( $*p < 0.05$ ) por lo que el tiempo que gastaron los animales olisqueando al Rn fue mayor que la interacción con el Rf.



**Figura 32.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre la disminución del tiempo de interacción inducido con ketamina en prueba de IS. Basal, animales son daño; Veh- Tween, control negativo; NMDA; Dimethylfraxetin y Hernierina a 1mg/kg ANOVA post prueba Dunnet, n=5±SE, \*p< 0.05 en comparación con el Veh-Tween (-)

- **Prueba campo abierto.**

En la Tabla 12 se indica las variables que se midieron cuando los ratones fueron expuestos al aparato de CA. La administración de los compuestos indujo una disminución significativa, en el número de CT EV, y Ac con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo VEH-Tween (\*p <0.05). La dimetilfraxetina provocó valores de TAc similares a los animales del grupo basal y del fármaco de referencia. Mientras que la herniarina, aunque tiene una acción similar en los Ac al grupo basal, si aumentó el tiempo en el que los animales permanecieron acicalándose por evento (TAc), por lo que no hay diferencia significativa con respecto al grupo VEH-Tween (\*p <0.05).

**Tabla 12.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre síntomas positivos de la esquizofrenia inducida ketamina en prueba de CA.

Tratamientos (mg/kg)	CT	EV	Ac	TAc	CE	TCE
	No. eventos	No. eventos	No. eventos	Segundos	No. eventos	Segundos
<b>Basal</b>	235.0 ±14.62*	135.2 ±11.45*	27.8 ± 0.73*	185.4 ± 9.75*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
<b>KET 50 mg/kg</b>						
<b>Veh- Tween</b>	435.6 ± 9.23	225.0 ±15.33	42.2 ± 3.73	272.6 ± 8.09	13.8 ± 1.28	37.6 ± 5.53
<b>NMDA 5</b>	267.6 ± 14.94*	71.6 ± 2.6*	20.4 ± 3.69*	190.0 ± 29.38*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
<b>Dimetilfraxetina 1</b>	246.6 ± 23.7*	132.2 ± 12.8*	20.2 ± 1.7*	187.6 ± 47.6*	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0*
<b>Herniarina 1</b>	169.6 ± 12.9*	63.2 ± 7.6*	27.2 ± 2.8*	342.0 ± 75.2	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0*

Cruces totales (CT, No. eventos), Elevamientos verticales (EV, No. eventos), Acicalamiento (Ac, No. eventos), tiempo invertido en acicalarse (TAc, segundos) Conductas estereotipas (CE, No. eventos), Tiempo invertido en conductas estereotipadas (TCE, segundos). Basales: ratones sin ketamina. ANOVA, post-prueba Dunnet, \* $p \leq 0.05$  en comparación con el grupo VEH (n=5, ± SE).

En cuanto a las conductas estereotipadas (CE) y el tiempo invertido en estas (TCE), se puede observar que ambos compuestos a las dosis administradas, evitaron la presencia de dichas conductas, por lo que no se registró algún valor y estos resultados fueron estadísticamente diferentes al grupo de animales administrados solo con KET (\* $p \leq 0.05$ ).

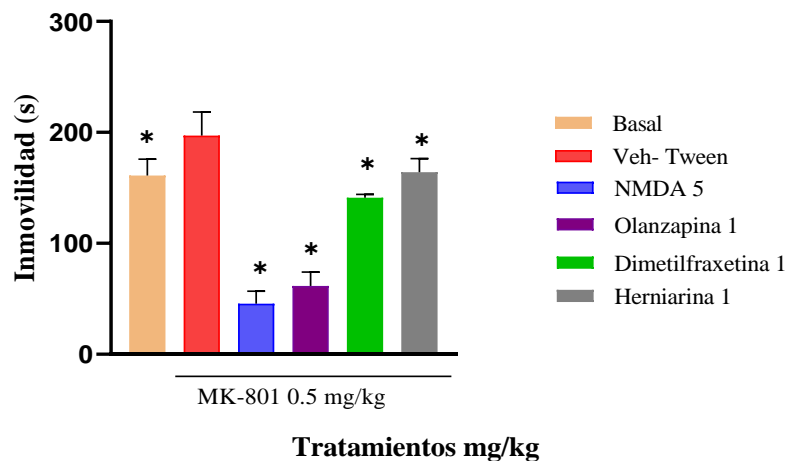
### 8.6 Efecto de herniarina y dimetilfraxetina en un modelo crónico inducido con MK-801

Los resultados obtenidos en el modelo agudo inducido con KET para evaluar el efecto de los compuestos herniarina y dimetilfraxetina a 1 mg/kg sobre los diferentes parámetros asociados a la esquizofrenia nos permitió observar que estos presentaban actividad sobre CNS en cada uno de sus síntomas (positivos, negativos y cognitivos) logrando revertir el daño ocasionado por la ketamina en un modelo agudo, por lo que dichos compuestos fueron llevados a un modelo crónico inducido con MK-801 evaluados nuevamente en las diferentes pruebas conductuales NF, EP, IS y CA.



- **Prueba de natación forzada.**

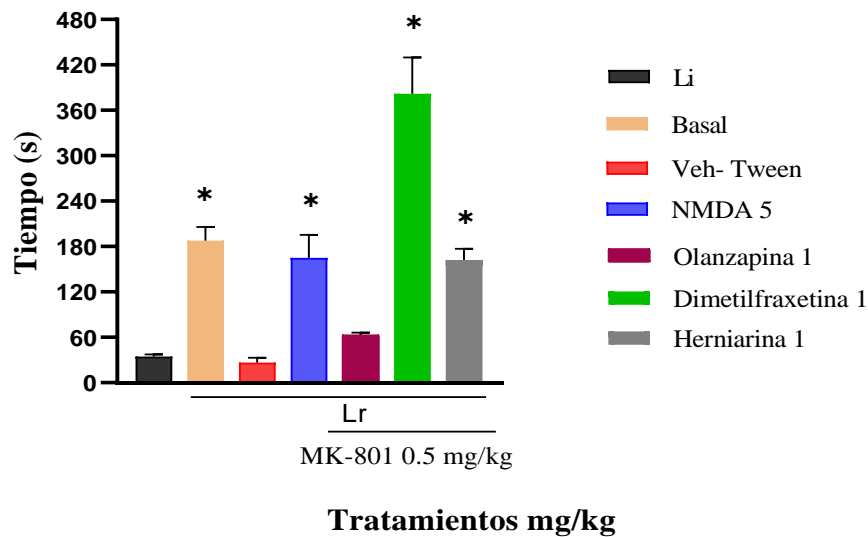
En la Figura 33, se observa que la administración crónica de MK-801 (Veh-Tween) provocó un incremento significativo en el tiempo de inmovilidad de los ratones en NF, en comparación con el grupo basal (\* $p < 0.05$ ). La co-administración de MK-801 con su antagonista el NMDA y con el antipsicótico atípico, la olanzapina, disminuyó significativamente esta variable, cuando se compara con el grupo Veh-Tween. Los animales que recibieron alguna de las dos cumarinas a una dosis de 1 mg/kg, también disminuyen el tiempo de inmovilidad y los datos fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo el Veh- Tween (\*  $p < 0.05$ ).



**Figura 33.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre el tiempo de inmovilidad inducido con MK-801 en prueba de NF. Basal, animales sin daño; Veh- Tween, control negativo; NMDA, control positivo. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=8 \pm SE$ , \* $p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween (-).

- **Prueba de evitación pasiva.**

En la Figura 34 se observa el tiempo de latencia durante el entrenamiento, Li, en la que todos los grupos fueron iguales estadísticamente y se encuentran representados en la barra negra de la figura, con un promedio de 23.35 s.



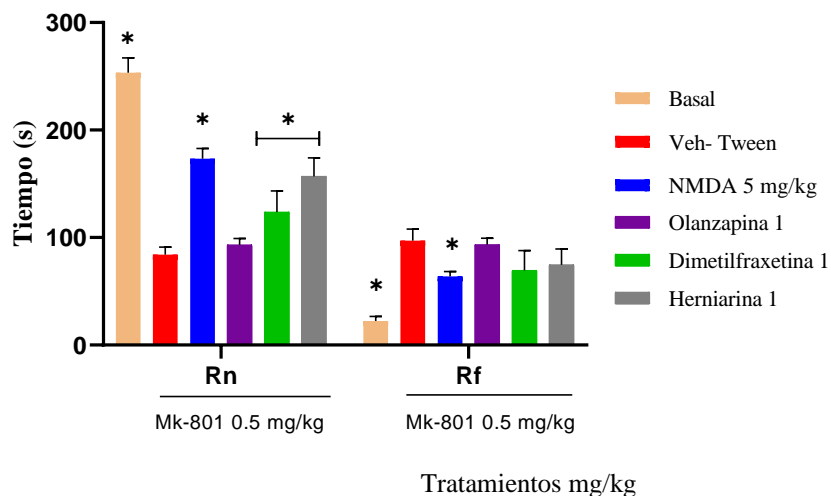
**Figura 34.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre el deterioro cognitivo inducido con MK-801 en prueba de EP. Basal, animales sin daño; Veh- Tween, control negativo; NMDA y Olanzapina, control positivo. ANOVA post prueba Dunnet,  $n=8\pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween (-).

En la fase Lr, tiempo de latencia durante la prueba, se puede observar que el grupo Veh-Tween (control negativo) presentó un tiempo similar al Li, sin una diferencia estadísticamente significativa con el grupo basal ( $p > 0.05$ ). El antipsicótico usado como fármaco control, olanzapina no logró modificar el efecto del MK-801. Por lo contrario, los animales basales los cuales no se generó ningún tipo de daño, mostraron un comportamiento normal de aprendizaje, por lo que todos recordaron el estímulo aversivo.

Así mismo como se esperaba Lr a administración de NMDA a 5 mg/Kg, induce el incremento en el Lr, con su tiempo de respuesta mayor al presentado en la latencia inicial y al grupo vehículo ( $*p < 0.05$ ); el comportamiento que indujeron las cumarinas (1 mg/kg) fue similar al del NMDA y fueron diferentes al Veh-Tween ( $*p < 0.05$ ).

- **Prueba de interacción social**

En la Figura 35, se observa que los animales del grupo Basal, que no recibieron MK-801, gastan significativamente más tiempo oliendo a un ratón nuevo (Rn) y menos tiempo con el ratón familiar (Rf), que aquellos del grupo de daño con MK-801 con diferencia estadísticamente significativa al Veh-Tween ( $*p < 0.05$ ) los cuales presentaron una similitud en tiempo de olisqueo con el Rn y el Rf. La Olanzapina tampoco es capaz de modificar la respuesta de los ratones al MK-801, y por tanto no diferenciaron entre el ratón nuevo y el familiar. El NMDA a 5 mg/kg fue capaz de contrarrestar de manera significativa el efecto de MK-801 sobre la sociabilidad, marcada como número de olisqueos al Rn.



**Figura 35.** Efecto de los compuestos aislados de *T. lucida* sobre la función cognitiva inducida con MK-801 en prueba de IS. Rn, ratón nuevo; Rf, ratón familiar; Basal, animales sin daño; Veh-Tween, control negativo; NMDA, control positivo. ANOVA post prueba Dunnett,  $n=9 \pm SE$ ,  $*p < 0.05$  en comparación con el Veh-Tween.

Los compuestos aislados de *T. lucida* dimetilfraxetina y herniarina lograron aumentar el número de olisqueos al Rn con respecto al grupo Veh-Tween ( $*p < 0.05$ ), sin embargo, el tiempo que

gastaron en oler al Rf, aunque este fue menor en comparación al Rn no presentó una diferencia estadística con el grupo de daño (Veh-Tween  $p > 0.05$ ).

- **Prueba campo abierto.**

En el ensayo agudo de inducción de MK-801 en modelo crónico, los síntomas positivos se evaluaron en el CA. En la Tabla 13 se muestra que los parámetros de CT, EV, Ac, CE y TCE en el grupo basal los valores son significativamente menores a los del Veh-Tween ( $* p < 0.05$ ). Sin embargo, para el parámetro de TAc no hubo diferencia estadística esto debido a que, aunque la tendencia de este tiempo fue menor en los animales basales estos también permanecieron un tiempo prolongado acicalándose.

**Tabla 13.** Efecto de los compuestos aislados de *Tagetes lucida* sobre síntomas positivos de la esquizofrenia inducida MK-801 en prueba de CA.

Tratamientos (mg/kg)	CT	EV	Ac	TAc	CE	TCE
	No. eventos	No. eventos	No. eventos	Segundos	No. eventos	Segundos
<b>Basal</b>	260.1 ± 11.45*	94.71 ± 6.94*	14.29 ± 1.01*	294.0 ± 15.93	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0*
<b>KET 50 mg/kg</b>						
<b>Veh- Tween</b>	354.5 ± 31.80	226.8 ± 17.01	25.83 ± 2.12	363.3 ± 28.04	3.83 ± 1.49	28.83 ± 13.09
<b>NMDA 5</b>	215.2 ± 15.82*	99.83 ± 14.66*	15.00 ± 1.23*	214.7 ± 24.79*	1.17 ± 0.47*	7.83 ± 3.65*
<b>Olanzapina 1</b>	196.3 ± 16.31*	156.6 ± 13.15*	13.00 ± 1.44*	200.4 ± 24.35*	0.66 ± 0.33*	5.42 ± 2.70*
<b>Dimetilfraxetina 1</b>	154.3 ± 17.44*	199.4 ± 8.532	16.50 ± 1.64*	233.1 ± 18.43*	1.00 ± 0.51*	0.85 ± 0.45*
<b>Herniarina 1</b>	327.6 ± 34.26	85.29 ± 5.163*	15.86 ± 1.66*	161.7 ± 19.75*	1.17 ± 0.54*	4.00 ± 1.96*

Cruces totales (CT, No. eventos), Elevamientos verticales (EV, No. eventos), Acicalamiento (Ac, No. eventos), tiempo invertido en acicalarse (TAc, segundos) Conductas estereotipas (CE, No. eventos), Tiempo invertido en conductas estereotipadas (TCE, segundos). Basales: ratones sin MK-801. ANOVA, post-prueba Dunnet,  $*p \leq 0.05$  en comparación con el grupo VEH (n=8 ± SE).

Mientras que, el grupo de ratones que recibió el fármaco NMDA y Olanzapina a 5 y 1 mg/kg respectivamente, hubo diferencia estadística con el Veh-Tween ( $*p < 0.05$ ) en dicha variable.

Para los demás parámetros se evidenció un comportamiento similar al basal en los parámetros de CT, Ac, EV, CE y TCE con diferencia estadística con el Veh (\* $p < 0.05$ ).

### 8.6.1 Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre los niveles de citocinas en ratones con MK-801

La administración crónica de MK-801 provocó el aumento de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e IL-12) en cerebro e hígado de ratones sin ningún tipo de tratamiento (Veh-Tween), presentado una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Basal (\* $p < 0.05$ ).

**Tabla 14.** Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre citocinas en tejido de cerebro e hígado obtenido de ratones con inflamación inducida por MK-801.

Órgano	Tratamiento (mg/kg)	TNF- $\alpha$ [pg/g prot]	IL-1 $\beta$ [pg/g prot]	IL-6 [pg/g prot]	IL-17 [pg/g prot]
Cerebro	Basal	1671.44 $\pm$ 164.17 *	4344.02 $\pm$ 416.81*	19298.54 $\pm$ 757.18 *	81996.91 $\pm$ 9372.79 *
	Veh-Tween	6628.56 $\pm$ 156.67	5879.32 $\pm$ 451.03	29115.56 $\pm$ 2599.62	216449.20 $\pm$ 14005.58
	NMDA 5	1689.45 $\pm$ 160.10 *	3043.81 $\pm$ 137.93*	18926.77 $\pm$ 1706.67 *	95791.69 $\pm$ 11763.10 *
	Olanzapina 1	2379.98 $\pm$ 156.64 *	4553.28 $\pm$ 322.59*	23533.39 $\pm$ 2185.00	139438.33 $\pm$ 19223.13*
	Herniarina 1	2705.99 $\pm$ 208.60 *	2120.91 $\pm$ 142.97*	19247.10 $\pm$ 2211.22 *	85523.77 $\pm$ 3750.10 *
	Dimetilfraxetina 1	2439.67 $\pm$ 158.39 *	1580.42 $\pm$ 320.41*	16537.62 $\pm$ 1970.98 *	79847.58 $\pm$ 8482.22 *
Hígado	Basal	2541.93 $\pm$ 244.04 *	1122.46 $\pm$ 194.88*	10863.64 $\pm$ 879.02 *	25466.88 $\pm$ 2834.14*
	Veh-Tween	4061.71 $\pm$ 166.02	3089.83 $\pm$ 232.40	23037.79 $\pm$ 823.32	73024.17 $\pm$ 1101.02
	NMDA 5	<b>5651.77 <math>\pm</math> 230.63 *</b>	2308.57 $\pm$ 230.33	28644.13 $\pm$ 853.45	61900.49 $\pm$ 3301.60
	Olanzapina 1	<b>6645.76 <math>\pm</math> 204.59 *</b>	2462.10 $\pm$ 229.19	28353.84 $\pm$ 1126.89	68600.30 $\pm$ 2442.20
	Herniarina 1	2669.39 $\pm$ 321.96 *	763.14 $\pm$ 146.81*	15683.76 $\pm$ 643.35 *	25815.25 $\pm$ 2847.66*
	Dimetilfraxetina 1	2330.17 $\pm$ 236.98 *	923.67 $\pm$ 58.08*	11929.34 $\pm$ 1313.79 *	24086.70 $\pm$ 1669.62*

TNF $\alpha$ = factor de necrosis tumoral; IL1 $\beta$ = Interleucina 1 beta; IL6=Interleucina 6; IL17= Interleucina 17. Los datos muestran la media  $\pm$  S.E.M. de 6 animales \* $p < 0,05$  indica diferencias estadísticamente significativas utilizando un ANOVA seguido de la prueba de Dunnett en comparación con el grupo VEH-Tween.

Los ratones con Olanzapina a 1 tienen concentraciones significativamente menores de TNF- $\alpha$ , IL-1b e Il-17 con diferencia estadística con el Veh-Tween (\* $p < 0.05$ ) en cerebro, pero no en

hígado, órgano sobre el cual se observa un incremento de TNF-a (Tabla 14 y 15). El tratamiento con NMDA a 5 mg/kg induce la disminución de las concentraciones de todas las citocinas inflamatorias en cerebro (\**p* <0.05). En hígado, se observó un comportamiento farmacológico similar al descrito para Olanzapina con niveles superiores al presentado por el grupo vehículo-Tween (\**p* <0.05). Para los grupos administrados con herniarina y dimetilfraxetina a 1 mg/kg se observó que ambos compuestos fueron capaces de disminuir los niveles de todas las proteínas pro-inflamatorias tanto en cerebro como en hígado, ambos compuestos con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo negativo (Vehículo-Tween \**p* <0.05).

**Tabla 15.** Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre citocinas en tejido de cerebro e hígado obtenido de ratones con inflamación inducida por MK-801

Órgano	Tratamiento (mg/kg)	IL-12 [pg/g prot]	IL-4 [pg/g prot]	L-10 [pg/g prot]
Cerebro	Basal	909.36 + 52.07*	664.70 ± 33.86 *	65912.92 + 7484.87 *
	Veh-Tween	1648.11 + 154.01	262.19 ± 25.59	21663.59 + 1907.22
	NMDA 5	867.56 + 30.80*	385.88 ± 34.12*	49492.75 + 6055.67*
	Olanzapina 1	1383.92 + 82.76	497.11 ± 37.22*	52684.55 + 1645.96*
	Herniarina 1	1231.94 + 58.54*	489.89 ± 32.70*	59039.89 + 2130.91*
	Dimetilfraxetina 1	1183.70 + 118.71*	386.96 ± 30.52 *	56696.64 + 5497.48*
Hígado	Basal	1348.83 + 47.27*	325.72 ± 32.25*	37433.10 + 3272.82*
	Veh-Tween	1966.23 + 90.90	33.31 ± 9.78	16431.34 + 1497.28
	NMDA 5	2205.16 + 107.71	1073.00 ± 37.19*	115799.46 + 9129.30*
	Olanzapina 1	2237.83 + 154.74	1059.28 ± 18.52*	107998.49 + 7955.79*
	Herniarina 1	1505.66 + 44.75*	502.70 ± 63.48*	40254.43 + 5446.25*
	Dimetilfraxetina 1	1242.33 + 55.19*	302.35 ± 14.65*	32502.37 + 3080.57

IL12= Interleucina 12; IL4=Interleucina 4; IL10= Interleucina 10. Los datos muestran la media ± S.E.M. de 6 animales \**p*<0,05 indica diferencias estadísticamente significativas utilizando un ANOVA seguido de la prueba de Dunnett en comparación con el grupo VEH-Tween.

En la cuantificación de citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10, en el grupo de daño presentaron una disminución de estas con respecto al grupo Basal en ambos órganos (Vehículo-Tween \**p* <0.05). Los ratones administrados con los fármacos Olanzapina y NMDA

presentaron valores superiores en ambas proteínas, con una marcada diferencia en hígado (Vehículo-Tween  $*p < 0.05$ ). Los compuestos herniarina y dimetilfraxetina a 1 mg/kg fueron capaces de aumentar de manera significativa los valores de IL-4 en ambos tejidos. Para los valores de IL-10, herniarina logró incrementar dicha proteína tanto en cerebro como en hígado, sin embargo, dimetilfraxetina sólo disminuye los valores en cerebro (Vehículo-Tween  $*p < 0.05$ )

### **8.6.2 Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la actividad antioxidante en ratones con MK-801.**

Como se puede observar en la Tabla 16, que los valores de glutatión reducido (GHS) en ambos órganos son significativamente menores en el grupo de daño en comparación a los animales sanos (Basal), así como con el grupo control NMDA a 5 y las cumarinas evaluadas a 1 mg/kg (Vehículo-Tween  $*p < 0.05$ ), sin embargo, la olanzapina a 1 mg/kg no es capaz de bloquear los efectos de MK-801 sobre este parámetro.

Las concentraciones de glutatión oxidado (GSSG) (Tabla 16) en los animales del grupo Veh-Tween aumentaron sus valores en comparación al grupo Basal en ambos órganos, así como también, los controles positivos y ambos compuestos de *T. lucida* con diferencia estadísticamente significativa (Vehículo-Tween  $*p < 0.05$ ). En cuanto a la relación del sistema redox GHS/GSSG los animales del grupo de daño presentaron concentraciones menores en comparación al grupo Basal para ambos órganos (Veh-Tween  $*p < 0.05$ ).

**Tabla 16.** Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la concentración GHS y GSSG en cerebro e hígado de ratones con estrés oxidante inducidos con MK-801.

Órgano	Tratamiento (mg/kg)	GHS ( $\mu\text{M}$ )	GSSG ( $\mu\text{M}$ )	GHS/GSSG
Cerebro	Basal	169.6 $\pm$ 6.86*	2.89 $\pm$ 0.36*	60.93 $\pm$ 10.64*
	Veh-Tween	40.67 $\pm$ 5.38	10.62 $\pm$ 0.77	4.03 $\pm$ 0.62
	NMDA 5	84.95 $\pm$ 4.14*	4.74 $\pm$ 1.04*	28.54 $\pm$ 7.79*
	Olanzapina 1	59.50 $\pm$ 6.00	2.53 $\pm$ 0.47*	27.18 $\pm$ 5.09*
	Herniarina 1	110.5 $\pm$ 6.78*	4.09 $\pm$ 0.77*	28.37 $\pm$ 6.30*
	Dimetilfraxetina 1	118.4 $\pm$ 7.12*	4.64 $\pm$ 0.19*	26.20 $\pm$ 0.93*
Hígado	Basal	100.4 $\pm$ 5.92*	1.48 $\pm$ 0.26*	63.05 $\pm$ 9.10*
	Veh-Tween	33.16 $\pm$ 4.39	3.92 $\pm$ 0.23	29.06 $\pm$ 2.21
	NMDA 5	73.59 $\pm$ 9.76*	0.87 $\pm$ 0.20*	49.78 $\pm$ 6.42
	Olanzapina 1	75.65 $\pm$ 4.81*	1.35 $\pm$ 0.3*	57.61 $\pm$ 5.21*
	Herniarina 1	107.2 $\pm$ 5.44*	1.52 $\pm$ 0.16*	64.27 $\pm$ 5.04*
	Dimetilfraxetina 1	97.28 $\pm$ 8.56*	2.09 $\pm$ 0.31*	60.20 $\pm$ 1.80*

GHS, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GHS/GSSG, relación. Los datos muestran la media  $\pm$  S.E.M. de 6 animales \* $p < 0,05$  indica diferencias estadísticamente significativas utilizando un ANOVA seguido de la prueba de Dunnett en comparación con el grupo VEH-Tween.

Así mismo los controles NMDA y olanzapina a 5 y 1 mg/kg respectivamente, en cerebro presentaron concentraciones con una diferencia estadísticamente significativa al grupo de daño, sin embargo, NMDA en hígado no modifica el daño causado por la administración crónica de MK-801. La relación GHS/GSSG se modifica por la administración de ambas cumarinas, con concentraciones superiores a las presentadas por los animales del grupo Veh-Tween en ambos órganos con diferencia estadística significativa (\* $p < 0.05$ ).

Se evaluó la liberación de óxido nítrico (ON) detectado como nitrito ( $\text{ON}_2^-$ ) y malonaldehído (MDA), marcador biológico resultante de la peroxidación lipídica presentada por el estrés oxidante. En la Tabla 17 se presentan los valores de dichos marcadores. Para los animales de grupo Veh-Tween se puede observar que tanto las concentraciones de  $\text{ON}_2^-$  como de MDA



fueron superiores a los valores presentados por los animales del grupo sano, con diferencia estadísticamente significativa en ambos órganos (Veh-Tween  $*p < 0.05$ ).

**Tabla 17.** Efecto de herniarina y dimetilfraxetina sobre la concentración ON<sub>2</sub> y MDA en cerebro e hígado de ratones con estrés oxidante inducidos con MK-801.

Órgano	Tratamiento (mg/kg)	ON <sub>2</sub> (μM)	MDA (nM)
Cerebro	Basal	0.51 ± 0.12*	112 ± 4.51*
	Veh-Tween	2.28 ± 0.20	168.5 ± 6.36
	NMDA 5	0.78 ± 0.13*	105.2 ± 7.78*
	Olanzapina 1	0.39 ± 0.08*	89.11 ± 7.58*
	Herniarina 1	1.06 ± 0.18*	80.08 ± 3.29*
	Dimetilfraxetina 1	0.50 ± 0.13*	118.3 ± 6.23*
Hígado	Basal	12.27 ± 0.53*	41.39 ± 5.28*
	Veh-Tween	17.75 ± 1.74	74.66 ± 5.52
	NMDA 5	13.23 ± 0.35*	15.43 ± 0.38*
	Olanzapina 1	12.60 ± 0.67*	74.24 ± 4.84
	Herniarina 1	13.74 ± 0.57*	48.89 ± 2.28*
	Dimetilfraxetina 1	12.73 ± 1.17*	36.46 ± 4.97*

Liberación de óxido nítrico (NO) detectada como nitrito ON<sub>2</sub>; MDA, Malondialdehído. Los datos muestran la media ± S.E.M. de 6 animales  $*p < 0,05$  indica diferencias estadísticamente significativas utilizando un ANOVA seguido de la prueba de Dunnett en comparación con el grupo VEH-Tween.

Este efecto se puede ver revertido en ambos órganos por el control NMDA y ambas cumarinas de *T. lucida* administradas a 1 mg/kg, ya que disminuyeron sus valores presentando una diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) como lo hicieron los animales del grupo Basal, por lo tanto, herniarina como dimetilfraxetina estarían indicando su actividad antioxidante en un modelo crónico inducido con MK-801. Para el antipsicótico atípico (olanzapina 1 mg/kg), aunque disminuyó los valores presentados en ambos órganos de ON<sub>2</sub> y en cerebro de MDA con diferencia estadística ( $*p < 0.05$ ) no logro presentar valores inferiores en hígado a los presentados por los demás grupos en MDA.

## 9 DISCUSIÓN

A pesar del uso ampliamente descrito en la medicina tradicional mexicana y reportes de actividades farmacológicas de *Tagetes lucida* sobre SNC, hasta el momento no se han realizado estudios que integren dichas actividades de extractos orgánicos y compuestos aislados de la especie, en enfermedades de fisiopatología complejas que generan diversos síntomas como lo son las enfermedades psiquiátricas. La esquizofrenia (EZQ) como ya se ha mencionado con anterioridad es una enfermedad multifactorial de la que se desconoce su etiología, sin embargo, hay varias hipótesis alrededor de ella como lo son la desregularización de diversos neurotransmisores específicamente en vía dopaminérgica y glutamatérgica relacionadas directamente sobre SNC y complementando éstas, la teoría que relaciona mecanismos de inflamación y estrés oxidante, que se presenta a nivel periférico y en SNC (Ruiz *et al.*, 2010) (Riegel *et al.*, 2010)(WHO | world health organization, 2022). De estas hipótesis se deriva la sintomatología variada de la EQZ, donde predominan síntomas como el aislamiento social y depresión (síntomas negativos), pérdida de memoria (síntomas cognitivos) y rasgos psicóticos (síntomas positivos), este último como principal síntoma de la enfermedad (Winship *et al.*, 2018).

*T. lucida* ha sido usada para el tratamiento de la “**locura**”, con esta base y los efectos farmacológicos de la planta demostrados en ensayos biológicos, se hizo la presente propuesta de investigación. En la que el propósito fue indagar sobre el efecto de diferentes tratamientos obtenidos de esta planta, en modelos de psicosis experimental a través de la interacción con dos vías de neurotransmisión que forman parte de la fisiopatología de la EQZ, el dopaminérgico y el glutamatérgico, medir si las acciones se basan también en la modulación del proceso

inflamatorio y oxidante. Se realizó una extracción química de *T. lucida* usando solventes orgánicos para la obtención de cuatro extractos que fueron evaluados en el ensayo agudo de catalepsia inducida con HAL. El HAL, es un fármaco potente, representativo de los antipsicóticos típicos con alta afinidad por los receptores D2 dopaminérgicos que causa catalepsia como efecto secundario adverso. Esta actividad es usada como herramienta farmacológica en el laboratorio, para inducir efectos extrapiramidales en roedores, incluida la rigidez y en particular, la catalepsia; efectos que están mediados por el bloqueo de los receptores D2 del cuerpo estriado (Matthysse, 1986).

En este modelo TIAq, en las dosis seleccionadas (12.5, 25 y 50 mg/kg), no cumple con un comportamiento típico dosis-respuesta, ya que la dosis media se comporta como el control negativo, mientras que la baja y el alta, disminuyen la catalepsia inducida con HAL, lo que se ajusta al fenómeno de hormesis, teniendo que a bajas dosis hay un efecto contrario al que se tiene en dosis más elevadas (Eizayaga & Nüdemberg, 2017). Los extractos de TIAEt a 50 mg/kg y TIAq a 25 mg/kg, son capaces de potenciar la catalepsia inducida con HAL. Por lo que, se puede suponer que algunos de los componentes de estos tratamientos pueden estar actuando a través de la vía dopaminérgica, y que como el HAL también pueden ser posibles antipsicóticos, sin presentar los efectos adversos motores que presentan normalmente este tipo de fármacos, lo que se fundamenta por el hecho de que los extractos *per-sé* no inducen catalepsia. Los extractos y las dosis que no presentaron un efecto potenciador de la catalepsia, pero si un comportamiento similar la CAF a 15 mg/kg indican que su mecanismo de acción podría estar vinculado con la adenosina ya que la CAF bloquea completamente el efecto cataléptico. Esta sustancia es un antagonista de los receptores A2 para adenosina los cuales se encuentran modulando la vía

dopaminérgica en el desarrollo de la EZQ inhibiendo la catalepsia generada por el HAL (Góngora-Alfaro, 2014).

Como ya se mencionó la vía glutamatérgica está involucrada en el mecanismo fisiopatológico de la EQZ, la KET es capaz de simular las conductas psicóticas asociadas, cuando es administrada a ratones. Los extractos TIAEt y TLHex a 50 mg/kg y TIAq a 25 mg/kg generaron un efecto nootrópico en prueba de EP, por lo que se infiere que disminuye los síntomas cognitivos. Esta prueba es una herramienta útil en la búsqueda de opciones de medicación para la psicosis, especialmente en el control de los síntomas cognitivos jugando un papel destacado en la investigación neurocientífica centrada en el papel de los neurotransmisores y señales moleculares en los procesos de aprendizaje y la memoria (McAllister-Williams *et al.*, 2010). La KET en este modelo induce disminución del proceso de aprendizaje mediante el antagonismo de NMDAr de glutamato y debido a su interacción directa o indirecta con otros sistemas de neurotransmisión como la vía colinérgica y sus receptores muscarínicos y nicotínicos generando una reducción del rendimiento cognitivo, estados disociativos, dificultad para recordar palabras y disminución de la memoria inmediata (Royo-Isacha *et al.*, 2004) (Neira & Ortega, 2004) por lo que estos extractos tuvieron la capacidad de generar un efecto nootrópico modificando el daño cognitivo causado por la KET.

Para medir el efecto de los extractos de esta especie medicinal, sobre los síntomas negativos de la EZQ, se utilizó NF, esta prueba es ampliamente usada para evaluar la eficacia de extractos vegetales y compuestos de síntesis, se evalúa la desesperanza aprendida, los animales tienen tendencia a escapar del agua, por lo tanto, el tiempo de inmovilidad es un marcador conductual de depresión. Los resultados mostraron que KET disminuye el tiempo de inmovilidad de los

ratones en el agua, lo que indica un efecto antidepresivo. El antagonismo de la KET en el receptor glutaminérgico NMDA es el primer paso en una cascada de eventos que incluye un rápido aumento en la liberación presináptica de glutamato, una estimulación de las conexiones excitatorias a nivel regional y un cambio importante en la plasticidad y conectividad sináptica. La capacidad antidepresiva, la liberación de glutamato y de sinaptogénesis inducida por ketamina se produce con dosis sub-anestésicas, lo que también estaría relacionada con una experiencia psicodélica de gran intensidad (McInnes *et al.*, 2017). La conducta de inmovilidad en NF, se incrementa en aquellos animales que no reciben tratamiento, es decir ante el estrés al que se somete a los individuos lo que genera un estado de inmovilidad que se traduce como desesperanza conductual o “depresión”, por lo que el grupo Basal sirvió de referencia de dicha conducta. Mientras que los ratones que sólo recibieron KET sin tratamiento, disminuyen este parámetro en comparación del grupo Basal. El NMDA, agonista glutamatérgico bloquea el efecto de la KET, un efecto similar al observado con el extracto TIMet. La coadministración de los extractos TIHex, TIAEt y TLAq de *T. lucida*, con KET, modifica su respuesta, ya que estarían potenciando el efecto, lo que nos indica que la actividad antidepresiva de estos extractos puede ser por otras interacciones como la inhibición de las interneuronas GABAérgicas en la corteza prefrontal, lo que permite la activación glutamatérgica de neuronas piramidales a través de receptores AMPA (Lamas-aguilar *et al.*, 2007).

Las interacciones sociales son un componente fundamental y adaptativo de la biología de numerosas especies. Para los animales, como los ratones, el reconocimiento de sus congéneres puede ser importante para mantener la jerarquía social y la elección de pareja, por lo tanto, las alteraciones en el comportamiento y reconocimiento sociales son característicos de una variedad

de trastornos neuropsiquiátricos como la EZQ. Por lo que la prueba IS y NF son útiles modelos para analizar posibles tratamientos farmacológicos para reducir síntomas negativos. (Ellenbroek & Cool, 2000) (Kaidanovich-beilin *et al.*, 2011) Además, la sociabilidad que es la propensión a pasar tiempo (olisqueando) con un ratón desconocido (Rn), esta prueba nos permite analizar el desarrollo cognitivo en roedores, debido a la propensión a pasar el tiempo con un ratón desconocido antes que con un ratón familiar (Rf) por lo que sumada a la EP nos permite analizar efectos mejoradores de memoria. En este modelo se observó que los animales del extracto TIMet presentaron una disminución en su capacidad cognitiva al pasar menor tiempo olisqueando al Rn, similar a los animales del grupo de daño administrados solo con KET, resultados opuestos a los presentados por los animales del grupo control positivo NMDA y los tres extractos restantes, que fueron capaces de generar una diferencia significativa, datos que coinciden con los resultados de la prueba de EP y confirmarían su actividad nootrópica. En cuanto los resultados obtenidos en el síntoma negativo “déficit social” en este modelo, se pudo observar que los animales del grupo TIMet 50 mg/kg no lograron aumentar la interacción social como si lo hicieron los extractos TIHex, TIAEt a 50 y TIAq 25 mg/kg, disminuyendo este síntoma negativo y contrarrestando los daños ocasionados por la KET. En este caso observamos que estos resultados contrastan con los obtenidos por la prueba de NF, Esto puede ser debido a la variabilidad y cantidad de compuestos que conforman cada uno de los extractos, que pueden hacer de ellos sustancias con diversos mecanismos de acción farmacológica que combinados con KET pueden producir diversas interacciones. Pese a la diferencia entre los dos modelos, los resultados obtenidos de los extractos TIHex, TIAEt y TIAq nos indican que en ambos casos sea

que actúen directa o indirectamente por vía glutamatérgica estos productos de *T.lucida* generan una disminución en los síntomas negativos de psicosis en los roedores.

Los síntomas positivos son las manifestaciones más evaluadas en los modelos de psicosis para simular la EQZ experimental, ya que representan los principales síntomas de la enfermedad. Mediante el análisis de los diferentes parámetros en la prueba de CA que nos permite observar la actividad general de los animales a un ambiente sin salida durante 30 min, se observó en CT y EV, que indican la conducta motora. Un incremento de ambos parámetros en el grupo que recibió solamente KET (Veh-Tween). Se ha mostrado que esta es una sustancia que induce un estado mental similar a la EQZ, reproduciendo los síntomas positivos de la enfermedad, por lo tanto exacerba la hiperlocomoción (Genis & López-rubacava, 2011), efecto que se pudo observar en el grupo sin tratamiento. Los efectos de este antagonista de receptores NMDA, fueron bloqueados por los extractos provenientes de *T. lucida* (TIHex, TIAEt, y TIAq) los resultados fueron estadísticamente diferentes al grupo de KET. El grupo de animales que fue administrado con el extracto TIMet, sólo antagonizó la hiperlocomoción sobre la variable de CT; los EV no se modificaron con este extracto. Por otro lado, el auto-cuidado en los animales es un comportamiento innato que está involucrado en la higiene, mantenimiento y procesos fisiológicos importantes como la termorregulación y la comunicación social. Es una de las conductas más frecuentemente observadas en roedores despiertos. El autocuidado cefalocaudal es notablemente similar en todas las especies. Los seres humanos dedican parte de su tiempo a este comportamiento, como rutina normal de higiene personal y esta muestra cierta similitud con el observado en otros animales. Sin embargo, en el humano la conducta del aseo personal puede volverse patológica, por ejemplo, durante condiciones estresantes o en ciertos trastornos

neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, aumentando este deseo de limpieza con el número de veces y el tiempo invertido en este (Kalueff *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en los parámetros de Ac y TAc muestran que los animales de daño y el extracto TIMet presentaron un mayor número de conductas de limpieza y así mismo, el tiempo en el grupo de daño (Veh-Tween) y el extracto TIHex fue mucho mayor, esto en comparación a los animales del grupo sano (Basal). Los extractos TIAEt y TIAq mantuvieron un comportamiento normal al generado en el grupo Basal.

Las conductas estereotipadas (CE) consisten en una o varias secuencias de movimiento de carácter reiterativo, que no configuran un programa de acción específica. Estas señales son rasgos característicos de las personas con EZQ, debido a las alucinaciones visuales y auditivas que presenta la enfermedad (Fadel & Zieher, 2001). Los resultados mostrados en este ensayo evidenciaron que los animales del grupo de daño y el extracto TIHex y TIMet presentaron comportamientos poco habituales, como movimientos de cabeza repetitivos, querer atraparse la cola e intentar huir arriesgando su bienestar. Sin embargo, los animales del TIMet presentaron menos conductas y permanecieron menos tiempo en dicho parámetro (TCE) siendo estadísticamente diferente al grupo Veh-Tween. Por otro lado, los animales del grupo Basal no presentaron dicho síntoma, como se esperaba. Mientras que los extractos TIAEt y TIAq disminuyen el daño ocasionado por la KET.

La KET es un anestésico disociativo de acción ultracorta, derivado de la fenciclidina, antagonista del receptor NMDA para glutamato (Cruz Mario *et al.*, 2009) y que en individuos sanos a dosis diferentes a las recomendadas para su uso, genera tanto los síntomas positivos de la psicosis, como trastornos del pensamiento e ideas delirantes; síntomas negativos similares a



los asociados con la EQZ como el déficit social; síntomas cognitivos debido al deterioro de la memoria y déficit de atención.(Castrejón *et al.*, 2015) (Santillán-urquiza *et al.*, 2018)

Por lo que la integración de todos los resultados obtenidos en EP, NF, IS y CA sobre síntomas positivos, negativos y cognitivos de la psicosis experimental inducida con KET y la catalepsia inducida por HAL nos indican que los extractos TIAEt a 50 y TIAq 25 a mg/kg que presentaron actividad tanto mejoradora de la memoria, antidepresiva como antipsicótica podrían estar actuando mediante vía glutamatérgica en la regulación de los receptores NMDA de tipo ionotrópico y mediante vía dopaminérgica potenciando el HAL mediante los receptores D2.

Si bien la utilización de plantas medicinales como *T. lucida* por su connotación cultural y antecedentes etnomédicos sobre SNC, son ampliamente usadas por la población de distintas áreas de nuestro país, estas pueden generar cuadros tóxicos derivados de su administración. Los resultados obtenidos en la prueba de *Irwin* realizados a los extractos TIAEt y TIAq a 1000, 500 y 300 mg/kg evidenciaron que a dosis de 300 mg/kg ninguno de los dos extractos induce signos neurotóxicos. Además, TIAq no provocó algún signo a 500 mg/kg y TIAEt hizo que los animales manifestaran sólo síntomas leves. Ambos extractos a la dosis más alta probada (1000mg/kg), generaron diversos síntomas neurotóxicos desde los primeros 30 minutos. Sin embargo, se presentaron de forma leve y/o moderada la cual fue evidenciada por la presencia de pelos erizados, ptosis palpebral, amontonamientos e inmovilidad. Los animales administrados con LPS a 2.5 mg/kg presentaron los mismos síntomas, sin embargo, incrementaron su nivel de manera moderada a severa, además también presentaron ligera diarrea. El LPS o endotoxina es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeñan una

importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias. Durante el proceso infeccioso por LPS se induce la inflamación sistémica, generar sepsis y shock tóxico en animales. Debido al daño endotelial es capaz de afectar la BHE y con ello causar daño al SNC generando deterioro neurológico con consecuentes síntomas descritos en este ensayo (Aid *et al.*, 2008). Estas lesiones ocasionadas a nivel sistémico ocasionan un daño hepático por lo valores elevados de LPS de origen bacteriano (Clària *et al.*, 2008) como se observa en la representación fotográfica de los animales con LPS tomadas a las primeras 24 horas de administración. Sin embargo, debido a que el daño hepático fue limitado, se produjo una rápida respuesta regenerativa de los hepatocitos que reemplaza al tejido afectado y restablece la arquitectura normal de este órgano (Clària *et al.*, 2008), por lo que pasados 7 días de la administración los síntomas habían desaparecido completamente y para el final del ensayo los animales no mostraron daño alguno en el órgano. Para los animales administrados con los extractos no hay datos de un aparente daño hepático. Estos hallazgos dan lugar a afirmar que los extractos de *T.lucida* tiene un efecto depresor moderado en el SNC en una relación directa y dependiente de la dosificación; el cual después de 24 de administrado comenzaba a disminuir y los animales recuperaron su comportamiento normal a las 72 horas de la administración. Cabe resaltar que las dosis probadas en este ensayo fueron 5 veces mayores (300 mg/kg) a las dosis evaluadas en los modelos de catalepsia y psicosis, y que las dosis que inducen cambios en las variables medidas, de forma moderada, fueron 9 veces mayores que las usadas en los modelos de psicosis. Díaz-Samayoa y Brenda informaron que el extracto acuoso (1-5 g/kg), administrado por vía oral a ratas, no indujo signos de toxicidad gástrica o hemorragia digestiva, y administrado por vía oral a ratones en la prueba de toxicidad aguda, no mostró

ningún efecto tóxico. Newary *et al.*, evaluaron la toxicidad por el método de Bruce a 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g/kg, reportando que la especie era segura a la dosis máxima. Asimismo, Guadarrama-Cruz *et al.*, informaron que el extracto acuoso de *T. lucida* no muestra signos de toxicidad o mortalidad en las pruebas de toxicidad aguda, por lo que este extracto proporciona un nivel de seguridad combinado con la ausencia de efectos secundarios graves informados en su uso en la medicina tradicional (Brenda and Diaz, 1998), (El-Newary *et al.*, 2021)(Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008).

Aunado a los resultados obtenidos para los extractos, en los modelos agudos de catalepsia por HAL y de psicosis por KET; La caracterización química de TIAEt y TIAq, fue fructífera y llevo al aislamiento y/o identificación por métodos cromatográficos de algunos metabolitos secundarios del tipo de terpenos, cumarinas y flavonoides, los cuales pueden ser en parte responsables de la actividad farmacológica encontrada en este estudio y que han sido reportados como familia en la especie, en diversas investigaciones (BDMTM, 2009) (Xu *et al.*, 2012) (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020).

Los compuestos tipo flavonoide fueron aislados del extracto TIAq debido a su naturaleza polar. Se encontraron una gran variedad entre los que se lograron aislar dos flavonoides, los cuales mediante métodos de elucidación estructural se identificaron como Quercetagetina 7-O-glucopiranosido y Quercetagetina 7-O- $\beta$ - (6"- cafeoil) glucopiranosido, reportados para el género Tagetes y otras familias de plantas, aunque no para *T.lucida*, y un nuevo flavonol identificado como Quercetagetina 7-O- $\beta$  -(6"protocatecol) glucopiranosido. Los compuestos tipo flavonoides como la quercetina y canferol tienen actividad sobre SNC, específicamente

con actividades como antidepresivos, mejoradores de la memoria, neuroprotectores y ansiolíticos (Mata-Pinzón *et al.*, 2018). Además de los flavonoides se identificaron tres compuestos tipo cumarinas (dimetilfraxetina, herniarina y escoporona) reportados para la especie en el 2020 por Monterrosas-Brison *et al.* Las cumarinas tienen diferentes efectos farmacológicos. Se le han reportado propiedades como antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotectoras, antivirales, citotóxicas, antitumorales y anticancerígenas (Mejia-barajas *et al.*, 2012); además, actividades sobre SNC como antidepresivos, ansiolíticos y sedantes (Martinez Vazquez *et al.*, 2015) (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Por lo que los compuestos aislados de los dos extractos que corresponden a cumarinas, dimetilfraxetina y herniarina podrían estar formando parte de los activos en los extractos de TIAEt y TLAq. Para determinar su efecto se evaluaron estos dos metabolitos en los ensayos de actividad aguda con HAL y KET.

Como se observa en los resultados de catalepsia ambas cumarinas lograron potenciar el efecto cataléptico del HAL a dosis más bajas, presentado un fenómeno de hormesis como el reportado por el extracto TIAq. Estos resultados nos indican que dichos compuestos a dosis de 1mg/kg pueden estar actuando mediante vía dopaminérgica específicamente por receptores tipo D2 en el estriado. Mientras que la herniarina a 5 mg/kg, podrían estar actuando como antagonistas de estos receptores bloqueando los efectos del HAL como lo hace el control positivo la CAF.

Así mismo en los ensayos agudos sobre los síntomas negativos en NF e IS se observa que en ambos compuestos a 1mg/kg, generan un efecto antidepresivo como lo hace la KET, además un efecto pro-sociabilidad contrarrestando los daños ocasionados por dicho inductor. Estos resultados indican que ambas cumarinas pueden presentar estos efectos, ya sea porque *per sé*

tenga dicha actividad, ejerciendo una actividad antagónica de la KET o bien porque estén actuando mediante otros mecanismos neurológicos ligados a la vía glutamatérgica. La dimethylfraxetina, ha demostrado su actividad sobre SNC como antidepresivo, ansiolítico y sedante, involucrando la neurotransmisión serotoninérgica y GABAérgica (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Aparentemente, con los resultados aquí mostrados, se infiere que probablemente la cumarina también actúa, por lo menos en parte, en los receptores glutamatérgicos involucrados en el mecanismo de acción de la KET, ya que ésta actúa como un antagonista no-competitivo de los receptores NMDA en la prueba de IS (Salat *et al.*, 2015). En el 2015 se realizó un estudio sobre el método de aislamiento y síntesis de la herniarina a partir de *Casimiroa pubescens* y su uso como antidepresivo. Esta cumarina tiene actividad antidepresiva y ansiolítica en un modelo de NF y CA por lo que se considera útil como agente terapéutico en trastornos emocionales actuando sobre SNC (Martinez Vazquez *et al.*, 2015). (Nazari Barchestani & Rafieirad, 2021a)

Cabe señalar que la KET ha sido usada como antidepresivo en pacientes resistentes a los fármacos recetados para ello, como son los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores selectivos y no-selectivos de la recaptura de serotonina, entre otros (Fava *et al.*, 2018).

En cuanto a los efectos sobre la memoria de las cumarinas, los resultados de las pruebas de IS y EP evidencian que ambos compuestos generan un efecto mejorador de la memoria, actividad que ha sido reportada para compuestos cumarínicos por Jameel *et al.*, en 2016, donde compuestos de tipo cumarina derivados de plantas como el decursinol mesuagenina, escopoletina, hidroxí-7-metoxibergamotina, bergapteno, bergapten, 4-metilumbeliferona, feroniellosido, marmesina y columbianetina han demostrado poseer actividad antiAChE en el

sistema colinérgico, particularmente implicado en los circuitos de memoria. Se ha demostrado que la escopoletina potencia la potenciación a largo plazo (LTP) en rodajas de hipocampo de rata. Mejoró la LTP del hipocampo y las propiedades cognitivas en ratones con deterioro colinérgico a través de la vía dependiente del NMDA. La ensaculina inhibe la AChE, regula la función dopaminérgica, serotoninérgica y adrenérgica y es un antagonista del receptor NMDA (Jameel *et al.*, 2016). En un reciente estudio se evaluó el efecto de la herniarina en memoria, mostrando que el uso de esta cumarina por 14 días podía mejorar la memoria y el deterioro cognitivo en un modelo de isquemia por hipoperfusión cerebral permanente usando prueba de EP y de laberinto en Y (Nazari Barchestani & Rafieirad, 2021)

En cuanto a los síntomas positivos la dimetilfraxetina induce una diferencia con el grupo que sólo fue administrado con KET en todos los parámetros evaluados, también la herniarina logró antagonizar el efecto ocasionado por la KET en la mayoría de los parámetros. Sin embargo, los animales que recibieron este compuesto permanecieron un mayor tiempo acicalándose (TAc). Como se ha mencionado uno de los parámetros más importantes en la evaluación de los síntomas positivos son las CE que reflejan el estado psicótico en los roedores, conducta que no presentaron los grupos de ratones que recibieron estas cumarinas y que sumados a los resultados de los demás parámetros nos pueden estar indicando que ambos ejercen actividad antipsicótica a como lo hacen los extractos y que posiblemente estarían actuando como lo hace el grupo control positivo NMDA bloqueando los NMDAr de tipo ionotrópico. Estos resultados concuerdan con los reportado para la especie y los compuestos tipo cumarina desde la etnomedicina y farmacología a través de los años, ya que su interacción con el SNC ya sea por

la regulación indirecta o directa con las vías en estudio genera un efecto positivo sobre la mayoría de los síntomas de enfermedades mentales complejas como la EZQ.

Si bien la ketamina puede desencadenar una psicosis temporal, debido a su vida media corta y su potencia más baja en modelos psicóticos agudos, sustancias como el MK-801 suelen usarse con más frecuencia en modelos animales para simular la psicosis crónica con fines experimentales debido a sus características de acción más duradera (Kovacic & Somanathan, 2010). Anudado a los resultados obtenidos en el modelo agudo, la administración crónica de MK-801 en los roedores administrados con los compuestos aislados de *T.lucida* no presentaron diferencias con lo reportado anteriormente en el modelo con KET. Sin embargo, debido a las características de acción duradera y la administración diaria (0.5 mg/kg/ 28días) de este inhibidor de los receptores tipo NMDA si se generó un efecto potenciador de la depresión *per se* el modelo de NF. Resultados que concuerdan con lo reportado por Langen *et al.*, en 2012, estos autores proponen un modelo de inmovilidad en NF con el tratamiento prolongado (0.2 and 0.3 mg/kg/15días). Los autores muestran que MK-801 fue capaz de incrementar el tiempo de inmovilidad en NF (Langen *et al.*, 2012). Por lo que ambas cumarinas presentaron un efecto antidepresivo y mejorador de la capacidad social en prueba IS con diferencia estadísticamente significativa al grupo Veh-Tween.

Por otro lado, Es evidente que el diseño experimental durante 28 días a 0.5 mg/kg de administración de MK-801, induce una disminución cognitiva en prueba de IS y perdida de la memoria en EP, y como se esperaba el control positivo NMDA logro revertir este efecto en ambas pruebas. Para este modelo crónico además del uso del NMDA se usó un antipsicótico atípico de uso comercial, la olanzapina se prescribe ampliamente para trastornos mentales como

la EZQ, es un antagonista de los receptores de serotonina y de receptores de DA. Se ha demostrado afinidad frente a receptores colinérgicos muscarínicos, receptores alfa-1-adrenérgicos y receptores histamínicos. Por lo que son efectivos para los síntomas de la EZQ como se pudo observar en los resultados de la prueba de NF, sin embargo, presenta efectos secundarios comunes como cambios en el peso, somnolencia entre otros, que afectan a 1 de cada 10 pacientes y otros como la pérdida de memoria u olvidos que afectan a 1 de 100 pacientes. (Ortiz & De la Mata, 2001) (Tajima *et al.*, 2009). Por lo que dicho fármaco no logro revertir el daño cognitivo como se esperaba, como si lo hicieron ambas cumarinas a 1mg/kg.

Así como la KET el MK-801 genero conductas psicóticas en los roedores aumentado los parámetros evaluados en CA, generando hiperlocomoción, y conductas estereotipadas. De acuerdo con otros informes, donde se observó que una sola administración de MK-801 indujo incremento de la conducta motora y agitación como conductas estereotipadas en la prueba de CA. (Jin *et al.*, 2014). Los controles positivos NMDA y Olanzapina redujeron los síntomas psicóticos con la disminución de los parámetros de CT, EV, Ac, TAc y CE y así como en el tiempo invertido en estos TCE. Las cumarinas, así como los controles positivos presentaron diferencias en Ac, TAc, CE y TCE, en cambio, para las conductas locomotoras dimetilfraxetina solo presento diferencia en CT y la herniarina en los EV, no obstante, presentaron un efecto favorable en la mayoría de los parámetros con una mejoría evidente en los síntomas psicóticos en un modelo crónico de 28 días.

Como es bien sabido la administración de MK-801 se encuentra estrechamente relacionado con la vía glutamatérgica, sin embargo, la hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica no son mutuamente excluyentes como se describió en las vías cortico-tronco-encefálicas. Estos efectos



cruzados en sinapsis complejas en las que en una misma dendrita coinciden contactos de neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas, así como serotoninérgicas y GABAérgicas mediante la hipofunción en la actividad de receptores NMDA en diferentes inervaciones dan como resultado cambios en la morfología de las neuronas y en la remodelación de circuitos. (Giménez, 2012) (Gibert-Rahola, 2014). Por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio respaldan las propiedades ansiolíticas y antipsicóticas de *T. lucida* en la medicina tradicional al involucrar la neurotransmisión serotoninérgica y GABAérgica y de sus constituyentes cumarínicos como antidepresivos, mejoradores de la memoria anteriormente reportados disminuyendo los síntomas negativos y cognitivos, además de los síntomas positivos reportados por primera vez en este estudio. Lo que nos indicaría también su participación por vía glutamatérgica y dopaminérgica.

Complementando la interacción sináptica antes mencionada, el alto nivel de deterioro social y un curso de deterioro crónico, se sugiere que la EZQ probablemente tiene características neurodegenerativas. Los marcadores inflamatorios como las citocinas proinflamatorias son factores etiológicos bien conocidos de los trastornos psiquiátricos, incluida la EZQ. La inflamación en el sistema nervioso central está estrechamente relacionada con la neurodegeneración por lo que se ha considerado como un importante factor causante y/o mediador de la esquizofrenia (Na *et al.*, 2012) Algunas de las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-6) juegan un papel clave en los procesos de modulación de las funciones del sistema nervioso relacionadas con alteraciones afectivas, emocionales y sociales en sujetos con esquizofrenia (Ramírez-jirano *et al.*, 2019). La cuantificación de citocinas en cerebro e hígado de ratones con psicosis experimental inducida con MK-801 evidencio, que los animales

administrados sólo con MK-801 bajo un estado psicótico presentaron niveles elevados de todas las citocinas proinflamatorias y una disminución de citocinas antiinflamatorias evaluadas en ambos órganos en comparación a los datos obtenidos para los animales sanos. Estos datos concuerdan con lo reportado en varios estudios donde la IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estuvieron consistentemente elevadas en pacientes con EQZ en fase aguda y remitida, y por otro lado, se demostró que IL-1 $\beta$ , IL-6 y TGF- $\beta$  estaban elevados solo durante el período de exacerbación aguda (Na *et al.*, 2012) y la IL-17 aumento las concentraciones en pacientes psicóticos que nunca habían recibido antipsicóticos (Fang *et al.*, 2017). Para el grupo positivo NMDA se presentaron niveles altos de ambas citocinas antiinflamatorias en ambos órganos y niveles bajos en cerebro y altos en hígado de las proinflamatorias. El antipsicótico atípico disminuyó los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17, para la IL-6 e IL-12 este no presentó efecto antiinflamatorio como si lo hizo el NMDA en cerebro. Para hígado al igual que el NMDA no induce cambios en ninguna citocina evaluada, en cuanto a las antiinflamatorias se elevó la concentración en ambos órganos con respecto al grupo con sólo MK-801. Varios estudios han investigado los efectos de los antipsicóticos en inflamación, dada la asociación con la esquizofrenia, se esperaría que los antipsicóticos tuvieran un efecto sobre esta afección. Sin embargo, los efectos antiinflamatorios de los antipsicóticos varían según el tipo (típico o atípico). Los fármacos típicos como el haloperidol disminuyen citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF- $\alpha$ ) en pacientes con esquizofrenia. Un estudio en animales ha demostrado que el haloperidol inhibe significativamente la producción estimulada de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de manera dependiente de la dosis. Por el contrario, los atípicos se asocian con respuestas inflamatorias aumentadas. La administración repetida in vivo de antipsicóticos atípicos como clozapina aumenta

significativamente las concentraciones plasmáticas de citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-6 y TNF- $\alpha$ . La administración repetida *in vivo* de atípicos (clozapina o risperidona) también aumenta significativamente las concentraciones plasmáticas de los receptores de IL-12. Hasta la fecha, hay informes contradictorios sobre los efectos de estos fármacos en los niveles de citocinas, y no se ha demostrado ningún antipsicótico tener una acción antiinflamatoria consistente; esto pueden surgir de los efectos metabólicos adversos antes mencionados. Varios antipsicóticos como la clozapina y la olanzapina se asocian tanto con la obesidad como con la intolerancia a la glucosa. Estas condiciones están estrechamente asociadas con la inflamación crónica y los niveles elevados de citocinas proinflamatorias (Na *et al.*, 2012) (Ramírez-jirano *et al.*, 2019).

Como se ha mencionado con anterioridad las cumarinas aisladas de *T.lucida* tienen acciones como antiinflamatorios en modelos agudos (Monterrosas-brisson *et al.*, 2020). En este estudio ambas cumarinas tuvieron la capacidad de disminuir los niveles de todas las citocinas proinflamatorias en cerebro e hígado de ratones con respecto al grupo Veh-Tween, la herniarina aumento los niveles de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 en ambos órganos. Asgharzade *et al.*, reportaron que herniarina reducía significativamente los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los tejidos cerebrales de las ratas sometidas a oclusión de la arteria cerebral media (Asgharzade *et al.*, 2021). Dimetilfraxetina aumento en IL-4 e IL-10 en cerebro e IL-4 en hígado. Las cumarinas por sí mismas exhiben una excelente propiedad antiinflamatoria para la cura de edemas. Numerosas de estas sustancias (esculetina, escopoletina, marmín, umbeliferona y visnadina) tienen una potencia efectiva contra la inflamación. Un derivado etéreo de la cumarina, la imperatorina, también muestra una acción efectiva *in vitro*. Este compuesto elimina

el líquido del edema y las proteínas del tejido lesionado a través de la estimulación de los fagocitos, lo que conduce a la producción de enzimas que provocan la proteólisis. Imperatorin bloquea especialmente la expresión proteica del óxido nítrico sintasa inducible y la enzima ciclooxigenasa 2 (Jameel *et al.*, 2016).

Ligado al proceso inflamatorio, y como se ha descrito anteriormente, el estrés oxidante juega un papel importante en la fisiopatología de la EQZ. Existe evidencia de que el balance entre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante está alterado en la esquizofrenia. Debido a que los radicales libres pueden destruir los ácidos grasos polinsaturados y por lo tanto influenciar la calidad y cantidad de lípidos de membrana en la EQZ, estos pueden alterar la transducción de señales mediada por receptores de neurotransmisores y, consecuentemente, el procesamiento de información en el cerebro.

La cuantificación de biomarcadores es una herramienta útil para evaluar un posible estado oxidante en roedores. El ON es un mensajero intracelular e intercelular en el cerebro, está involucrado en la patogenia de la esquizofrenia, por lo que la producción excesiva de NO podría contribuir a la patología (Zoupa and Pitsikas, 2021). Las alteraciones en los lípidos de la membrana neuronal puede deberse a unas deficientes defensas del organismo frente al metabolismo oxidativo asociadas al aumento de radicales hidroxilos producidos por la no neutralización del ON o la molécula  $H_2O_2$ , lo que lleva a promover diversos procesos y finalmente un aumento de la peroxidación lipídica ocasionando alteraciones en la membrana celular y daños mitocondriales que incrementan las concentraciones de sus subproductos como el malondialdehído (MDA). Por otro lado, los mecanismos naturales de defensa frente a la

oxidación son muy importantes de cara a proteger la integridad celular. El sistema de defensa antioxidante incluye enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y reductasa (GPx y GR) y catalasa (CAT). Además, comprende vías no enzimáticas como la albúmina, ácido úrico, bilirrubina, ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno y glutatión (Soto-bernardini & Raventós-vorst, 2008). El glutatión pasa de la forma reducida (monomérico glutatión (GSH)) a su forma oxidada (disulfuro de glutatión (GSSG)) mediante el sistema enzimático compuesto por GR y GPx, neutralizando ROS y radicales libres de forma que fisiológicamente, a nivel intracelular, el glutatión está presente principalmente (~99%) en su forma reducida GSH en el cuerpo humano actuando como una reserva de defensa antioxidante ante cualquier situación de estrés a la que la célula se vea expuesta. (Prados, 2014). En situaciones patológicas, las células pre-apoptóticas y apoptóticas tienen un índice GSH/GSSG bajo, con relación a las células normales, lo que evidencia el papel señalizador de los niveles disminuidos de GSH o los niveles aumentados de GSSG, como parte de la regulación redox en la homeostasis celular (Cisneros *et al.*, 2013). Según los resultados obtenidos y de acuerdo con lo anterior, los animales del grupo que solo recibieron MK-801 como se esperaba, presentaron niveles elevados de NO (liberación de ON detectado como nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), siendo este un producto final estable de NO) y MDA, así como también, alteración del sistema GSH/GSSG debido a la baja concentración de GSH y alta GSSG con respecto a los animales sanos en ambos órganos. Como se ha mencionado con anterioridad el MK-801 actúa como inhibidor del receptor NMDA, a dosis bajas, lo que provoca una serie de cambios en el funcionamiento de las neuronas, entre ellos un aumento de la liberación de glutamato, que puede conducir a un aumento de la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y, en consecuencia, la muerte

celular. Diversos estudios han demostrado un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes (GPx, GR y SOD), así como en la alteración de biomarcadores de estrés oxidante ocasionado por MK-801 (Wąsik *et al.*, 2021) lo que concuerda con lo reportado en el presente estudio. En cuanto a los controles evaluados, los animales administrados con NMDA en ambos órganos, presentaron una disminución en los niveles de ON y MDA, además, de regular el sistema GHS/GSSG en cerebro aumentando sus valores a diferencia del MK-801. La Olanzapina indujo una disminución en la concentración de ON y GSSG en ambos órganos, disminuyó MDA en cerebro e incremento en GHS en hígado, así como también mejoró la relación GHS/GSSG con respecto al MK-801. Sin embargo, estos datos resultan ser poco consistentes, debido a que los niveles de MDA en hígado y GHS en cerebro no presentaron diferencias con los animales administrados con MK-801. Estos resultados sumados a la variada acción antiinflamatoria que presenta la olanzapina, debido a su naturaleza, y la estrecha relación entre el proceso inflamatorio y el estrés oxidante, nos indican que este tipo de fármaco es poco consistente al tratar estos procesos fisiopatológicos adyacentes a la esquizofrenia.

En cuanto a las cumarinas como se ha mencionado con anterioridad poseen una fuerte actividad antioxidante debido a su estructura química, por lo tanto, no es de sorprender que ambos compuestos presentaran actividad antioxidante mediante la disminución de los niveles de ON y MDA, así como un aumento en las concentraciones en relación GHS/GSSG por el aumento de GHS y disminución de GSSG en ambos órganos con respecto al grupo MK-801. Razaee *et al.*, en 2014 reportaron que herniarina presentaba una reducción en % el daño al ADN en cola de ratones inducida con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rezaee *et al.*, 2014). En 2021 se realizaron tres estudios confirmando la capacidad antioxidante de herniarina. Nazari & Rafieirad, reportaron que la

herniarina puede eliminar los radicales libres y las sustancias oxidantes del cerebro mediante la disminución de concentraciones de GPx y MDA en hipocampo y tejido estriado en cerebro de ratas (Nazari Barchestani and Rafieirad, 2021b), Shaibani demostró que el tratamiento con herniarina reducía significativamente el estrés oxidativo en el hipocampo de las ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. (Shaiban, 2021) y por último Asgharzade *et al.*, reportaron que el compuesto reducía significativamente los niveles de MDA y aumentaba simultáneamente el nivel de tiol total y la actividad de SOD en los tejidos cerebrales de las ratas sometidas a oclusión de la arteria cerebral media (Asgharzade *et al.*, 2021).

Se sabe que las moléculas a base de cumarina poseen un magnífico potencial terapéutico desde hace mucho tiempo, representan una clase sustancial de heterociclos condensados que manifiestan una variedad de actividades biológicas significativas que incluyen antioxidantes antiinflamatorios neuroprotectoras y antidepresivas, haciéndolas una excelente opción como representantes terapéuticos. Por lo que, los resultados en el presente trabajo, así como los antecedentes ampliamente descritos para este tipo de compuestos, son ampliamente compatibles con las características químicas predominantes que son favorables para los fármacos activos sobre el SNC (Na *et al.*, 2012).

## 10 CONCLUSIONES

1. Los extractos TIAEt a una dosis de 50 mg/kg y TIAq a 25mg/kg inducen una potenciación del efecto cataléptico inducido con HAL, por lo que se asume que actúan sobre la vía dopaminérgica principalmente sobre los receptores tipo D2 para dopamina. Además de contrarrestar los síntomas cognitivos (memoria), positivos (conductas estereotipadas) y negativos (depresión) provocados por la KET en un modelo de psicosis aguda, indicando la participación sobre la vía glutamatérgica.
2. Los extractos TIAEt y TIAq, inducen signos leves y/o moderados de neurotoxicidad evidenciada por la presencia de pelos erizados, ptosis pauperal, amontonamientos e inmovilidad, efectos que se observa a una dosis 10 veces mayor (500 mg/kg), para el primero, y 20 veces más alta para el segundo (1000 mg/kg).
3. Se aislaron 6 compuestos de los extractos activos TIAEt y TIAq, tres de ellos tipo cumarina (dimetilfraxetina, herniarina y escoporona), y tres compuestos tipo flavonoide (Quercetagetina 7-O-glucopiranosido, Quercetagetina 7-O-β-(6"-protocatecol) glucopiranosido y Quercetagetina 7-O-β-(6"-cafeoil) glucopiranosido)).
4. La dimetilfraxetina y hernierina a la dosis más baja utilizada, fueron capaces de potenciar el efecto cataléptico del HAL y contrarrestar síntomas cognitivos (memoria), positivos (conductas estereotipadas) y negativos (depresión) provocados por la KET.
5. La dimetilfraxetina y herniarina, fueron capaces de contrarrestar síntomas cognitivos (memoria), positivos (conductas estereotipadas) y negativos (depresión) provocados por la MK-801.



6. La dimetilfraxetina y herniaria, fueron capaces de modular la respuesta inflamatoria en cerebro e hígado de ratones administrados con MK-801.
7. La dimetilfraxetina y herniaria, fueron capaces de modular el estrés oxidante en cerebro e hígado de ratones administrados con MK-801.

## 11 PERSPECTIVAS

1. Investigación de la expresión de RNAm para el transportador a dopamina DAT mediante RT-PCR en cerebro de ratones.
2. Análisis del estado redox e inflamatorio mediante inmunohistoquímica, del cerebro de ratones
3. Estudios del mecanismo de acción de las cumarinas utilizando técnicas de electrofisiología en cerebro de ratones, en la zona cortico-tronco-cerebral.

## 12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adell, A. (2020) 'Brain NMDA receptors in schizophrenia and depression', *Biomolecules*, pp. 1–27. doi: 10.3390/biom10060947.
- Ahmed, H., Haider, A. and Ametamey, S. M. (2020) 'N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor modulators: a patent review (2015-present)', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Taylor & Francis, 30(10), pp. 743–767. doi: 10.1080/13543776.2020.1811234.
- Aid, S., Langenbach, R. and Bosetti, F. (2008) 'Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2', *Journal of Neuroinflammation*, 5, pp. 1–14. doi: 10.1186/1742-2094-5-17.
- Argueta, A. and Gallardo, V. M. C. (1994) *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Ilustrada. Edited by I. N. Indigenista. Mexico City, Mexico.
- Asgharzade, S., Khorrami, B. M. and Forouzanfar, F. (2021) 'Neuroprotective effect of herniarin following transient focal cerebral ischemia in rats', *Metabolic Brain Disease*, 35, pp. 2505–2510. doi: 10.1007/s11011-021-00841-1.
- Avila-Rojas, H. and Pérez-Neri, I. (2017) *Dopamine for beginners*, *Arch Neurocién (Mex) INNN*. Available at: <http://blogs.discovermagazine.com/neuroskeptic/2015/08/15/the-rise-and-fall-of-neurotransmitters/>.
- Aznar, J. A. *et al.* (2009) *Guía práctica clínica para el tratamiento de la esquizofrenia en centros de salud mental, Servicio Murciano de Salud*. Edited by J. C. M. García-Sancho. Murcia, Spain. doi: 10.1016/S1134-2072(07)71951-5.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G. and Arias-Montaño, J. a. (2000) 'Dopamina : síntesis , liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central', *Revista Biomédica*, 11(1), pp. 39–60. doi: 10.1016/j.taap.2007.02.002.
- BDMTM (2009) *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Available at: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> (Accessed: 15 September 2022).
- Bernardo, M. and Surgonà, M. (2008) 'Esquizofrenia y medicina de familia. Implicaciones en atención primaria', *Jano.Es*, pp. 37–44. Available at: [http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1714/37/00370044\\_LR.pdf](http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1714/37/00370044_LR.pdf).
- Bonilla-Jaime, H. *et al.* (2015) 'Antidepressant-like activity of *Tagetes lucida* Cav. is mediated by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors', *Journal of Natural Medicines*. Springer Japan, 69(4), pp. 463–470. doi: 10.1007/s11418-015-0909-5.
- Brenda, M. and Diaz, S. (1998) *Evaluación de la toxicidad subaguda de las partes aéreas de tagetes lucida [pericón] y hojas de Sansevieria guineensis [Curarina]*. Universidad de San Carlos Guatemala: Antigua, Guatemala.
- Callado, L. F., Ortega, J. E. and Horrillo, I. (2009) 'Bases neurobiológicas de la depression', *Salud y Ciencia*, 16(8), pp. 835–838. doi: 10.5093/cl2010v21n3a3.
- Castrejón Meregildo, D. V. Iparraguirre Caballero, L. (2015) 'Efecto del extracto seco de *passiflora incarnata* (maracuyá) en comportamiento psicótico inducido con ketamina en *rattus rattus* var. *albinus*.' , *Biblioteca de Farmacia y Química*.
- Ceruelo Bermejo, J. and García Rodicio, S. (2007) 'Antipsicóticos típicos. Antipsicóticos atípicos', *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 14(10), pp. 637–647. doi: 10.1016/s1134-2072(07)71951-5.
- Cisneros, R. *et al.* (2013) 'Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas

- diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*)', *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(2), p. 107. doi: 10.15381/anales.v72i2.990.
- Clària, J. *et al.* (2008) 'Mecanismos básicos de lesión hepatocelular. Papel de los mediadores lipídicos de inflamación', *Gastroenterología y Hepatología*, 31(10), pp. 682–692. doi: 10.1016/s0210-5705(08)75816-3.
- Cruz Mario, J. *et al.* (2009) 'CLINIC INDICATION AND PHARMACOLOGY OF THE KETAMINE', *revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 3(2), pp. 1–22.
- Díaz Camargo, E. A. *et al.* (2017) 'Perfil Neuropsicológico en un Paciente con Esquizofrenia Neuropsychological Profile in a Patient with Schizophrenia', *Rev. Chil. Neuropsicol*, 12(1), pp. 34–39. doi: 10.5839/rcnp.2017.12.01.01.
- Díaz, P. P., Martí, M. R. and Félix, C. V. (2018) 'Características epidemiológicas del paciente que ingresa en la unidad de hospitalización psiquiátrica del departamento de salud de Gandía.', *Revista Española de Enfermería de Salud Mental*, 1(3), pp. 24–28.
- Eizayaga, F. X., Nüdemberg, D. and Aguilar, C. (2017) 'Aspirina en dosis ultrabajas y hormesis', *La Homeopatía De México*, 86(708), pp. 5–12. Available at: [www.latindex.unam.mxperiodica.unam.mxlilacs.bvsalud.org/es/www.imbiomed.com](http://www.latindex.unam.mxperiodica.unam.mxlilacs.bvsalud.org/es/www.imbiomed.com).
- El-Newary, S. A. *et al.* (2021) 'Hepatoprotective effects of *Tagetes lucida* root extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Wistar albino rats through amelioration of oxidative stress', *Pharmaceutical Biology*. Taylor & Francis, 59(1), pp. 986–997. doi: 10.1080/13880209.2021.1949024.
- Ellenbroek, B. A. and Cools, A. R. (2000) 'Animal models for the negative symptoms of schizophrenia', *Behavioural Pharmacology*, 11(3–4), pp. 223–233. doi: 10.1097/00008877-200006000-00006.
- Fadel, D. and Zieher, L. M. (2001) 'Fisiopatología de la esquizofrenia', *Revista Argentina de Clínica Neuropsiquiátrica*, 9, pp. 3–10.
- Fang, X. *et al.* (2017) 'Interleukin-17 Alteration in First-Episode Psychosis : A Meta-Analysis', *Molecular Neuropsychiatry*, 3, pp. 135–140. doi: 10.1159/000481661.
- Fava, M. *et al.* (2018) 'ketamine as adjunctive therapy in treatment-resistant depression ( TRD )', *Molecular Psychiatry*. Springer US, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41380-018-0256-5.
- Fredholm, B. B. (1995) 'Adenosine, Adenosine Receptors and the Actions of Caffeine', *Pharmacology & Toxicology*, 76(2), pp. 93–101. doi: 10.1111/j.1600-0773.1995.tb00111.x.
- García-anaya, M., Apiquian, R. and Fresán, A. (2001) 'LOS ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS : UNA REVISIÓN', *Salud mental*, 24(5), pp. 37–43.
- Gejman, P. V. and Sanders, A. R. (2012) 'La Etiología de la Esquizofrenia', *Medicina (Argentina)*, 72(3), pp. 227–234. doi: 10.1007/BF02227108.
- Genis, A. D. and Lopéz-rubacava, C. (2011) '¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal?', *El Residente*, 6(2), pp. 120–126.
- Gibert-Rahola, J. (2014) 'Fármacos glutamatérgicos en tratamiento de la esquizofrenia', *Actas Esp Psiquiatr*, 42(5), pp. 234–41.
- Giménez, C. (2012) 'Bases moleculares de la esquizofrenia', *Anales de la Real Academia Nacional de la Farmacia*, 78(4), pp. 425–445.
- Girgis, R. R., Kumar, S. S. and Brown, A. S. (2014) 'The cytokine model of schizophrenia: Emerging therapeutic strategies', *Biological Psychiatry*. Elsevier, 75(4), pp. 292–299. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.12.002.

- Gómez Ayala, A.-E. (2006) 'Farmacoterapia de la esquizofrenia', *Farmacia Profesional*, 20(9), pp. 73–78.
- Góngora Alfaro, J. L. (2010) 'La cafeína como un fármaco preventivo de la enfermedad de Parkinson: evidencias epidemiológicas y sustrato experimental', *Revista de Neurología*, 50(04), p. 221. doi: 10.33588/rn.5004.2009563.
- Gould, T. D., Dao, D. T. and Kovacsics, C. E. (2009) 'The Open Field Test', in *Neuromethods*, pp. 1–20. doi: 10.1007/978-1-60761-303-9.
- Griess, P. (1879) 'Ueber einige Azoverbindungen', *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12(1), pp. 226–230. doi: 10.1002/cber.18790120165.
- Guadarrama-Cruz, G. *et al.* (2008) 'Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test', *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), pp. 277–281. doi: 10.1016/j.jep.2008.08.013.
- Guzmán, F. (2020) *Vías dopaminérgicas y antipsicóticos*, Instituto de Psicofarmacología. Available at: <https://psicofarmacologia.com/antipsicoticos/vias->.
- Hernández-Espinosa, D. R. *et al.* (2019) 'El papel de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas', *Revista de la Facultad de Medicina*, 62(3), pp. 6–19. doi: 10.22201/fm.24484865e.2019.62.3.03.
- Jablensky, A. (2010) 'The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects', *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(3), pp. 271–287. doi: 10.31887/dcms.2010.12.3/ajablensky.
- Jain, N. S., Tandi, L. and Verma, L. (2015) 'Contribution of the central histaminergic transmission in the cataleptic and neuroleptic effects of haloperidol', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Elsevier Inc., 139, pp. 59–66. doi: 10.1016/j.pbb.2015.10.004.
- Jameel, E., Umar, T. and Hoda, N. (2016) 'Coumarin : A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents', *Drug Design*, 87(1), pp. 21–38. doi: 10.1111/cbdd.12629.
- Jáquez-cabalceta, G., Mora-gallegos, A. and Trías, J. F. (2017) 'Animal Models in Rodents for the Study of Schizophrenia', *Revista Latinoamericana de Ciencia Psicológica*, 9(2), pp. 1–35. doi: 10.5872/psiencia/9.2.61.
- De Jesús Balleza, J. and Villaseñor, J. L. (2002) 'La familia Asteraceae en el estado de Zacatecas (México)', *Acta Botanica Mexicana*, (59), p. 5. doi: 10.21829/abm59.2002.893.
- Jin, S. *et al.* (2014) 'Oleanolic acid attenuates MK-801-induced schizophrenia-like behaviors in mice', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, (July), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.025.
- Jovel- Espinosa, C. A. and Mejía-Sobrino, F. E. (2015) 'Cafeína y cefalea: consideraciones especiales', *Neurología. SEGO*, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.nrl.2014.12.016.
- Kaidanovich-beilin, O. *et al.* (2011) 'Assessment of Social Interaction Behaviors', *Journal of Visualized Experiments*, 0(48), pp. 1–6. doi: 10.3791/2473.
- Kalueff, A. V *et al.* (2015) 'Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 17(1), pp. 45–59. doi: 10.1038/nrn.2015.8.
- Kovacic, P. and Somanathan, R. (2010) 'Clinical physiology and mechanism of dizocilpine', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(February), pp. 13–22.
- Lahera, G., Freund, N. and Sáiz-Ruiz, J. (2013) 'Asignación de relevancia (salience) y

- desregulación del sistema dopaminérgico', *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*. SEP y SEPB, 6(1), pp. 45–51. doi: 10.1016/j.rpsm.2012.05.003.
- Lamas-aguilar, R. M. *et al.* (2007) 'Ketamina , un nuevo agente terapéutico para la depresión', *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 14(1), pp. 45–65.
- Langen, B. *et al.* (2012) 'Effect of PDE10A inhibitors on MK-801-induced immobility in the forced swim test', *Psychopharmacology*, 221(2), pp. 249–259. doi: 10.1007/s00213-011-2567-y.
- Maldonado, S. *et al.* (2010) 'Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas', *Rev Med UV*, (272), pp. 32–39.
- Mané, A. (2013) 'Psiquiatría Biológica Transportador de la dopamina ( DAT ) y pronóstico de la esquizofrenia : estudio prospectivo de una cohorte evaluada mediante DaTSCAN , RM volumétrica y el polimorfismo – 67 A / T del gen del DAT', *Psiquiatría Biológica*. Elsevier España, S.L., 20(1–2), pp. 18–19. doi: 10.1016/j.psiq.2013.06.004.
- Manu, P. *et al.* (2014) 'Biomarcadores de inflamación en la esquizofrenia : conexión frente a causalidad', *World Psychiatry*, 12(2), pp. 189–192.
- Marco, S., Otaño, I. and Luanj, R. (2011) 'Artículo divulgativo: Los receptores de glutamato como dianas moleculares en la terapia de enfermedades neurológicas', *SICI The spanish ion channel initiative*, pp. 1–15.
- Marrero, A. (2017) 'Regulación del transportador de dopamina por autorreceptores', *Revista Portuguesa de Psicossomática*, 125(4), pp. 783–789. Available at: [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/6796/Regulacion del Transportador de Dopamina por autoreceptores..pdf?sequence=1](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/6796/Regulacion%20del%20Transportador%20de%20Dopamina%20por%20autoreceptores..pdf?sequence=1).
- Martinez Vazquez, M. *et al.* (2015) 'Method for the isolation and synthesis of 3-(1', 1'-dimethylallyl)-herniarin, as well as (e)-3-(1',1'-dimethyl-3'nitro-allyl)-herniarin, from *casimiroa pubescens*, and use thereof as an antidepressant'.
- Mata-Pinzón, S. *et al.* (2018) 'Plantas Medicinales Para El Tratamiento Del Susto Y Mal De Ojo. Análisis De Sus Posibles Efectos Sobre El Sistema Nervioso Central Por Vía Transdérmica E Inhalatoria', *Revista Etnobiología*, 16, pp. 30–47.
- Matthysse, S. (1986) 'Animal models in psychiatric research', *Prog.Brain Res*, 65, pp. 259–270.
- Mayo Castro, A., Pérez Sánchez, B. and Guzmán Sala, A. (2015) 'Financiar la salud mental en nuestro país es posible, solo tenemos que prevenir y planear.', *Hitos de Ciencias Económico Administrativas*, 20(58), pp. 113–120. doi: 10.19136/hitos.a0n58.976.
- McAllister-Williams, R. H., Bertrand, D. *et al.* (2010) *Passive avoidance*. doi: 10.1007/978-3-540-68706-1.
- Mccutcheon, R., Marques, T. R. and Howes, O. D. (2019) 'Schizophrenia—An Overview', *JAMA Psychiatry*, pp. 1–10. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2019.3360.
- McInnes, L. A., Leon, S. and Radulovich, M. (2017) 'El papel de la ketamina como antidepressivo, un artículo de revisión', *Revista Cúpula*, 31(1), pp. 8–17.
- Mejia-barajas, J. A. *et al.* (2012) 'Cytotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav .', *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(2), pp. 142–147.
- Mion, G. (2012) 'Ketamina', *Anestesia -Reanimacion*, 38(12), pp. 1–13. doi: 10.1016/S1280-4703(12)63385-4.
- Monji, A. *et al.* (2013) 'Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier

- Inc., 42, pp. 115–121. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.12.002.
- Monterrosas-brisson, N. *et al.* (2020) ‘Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav .’, *Natural Product Research*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–5. doi: 10.1080/14786419.2018.1553172.
- Monterrosas Brisson, N. *et al.* (2020) ‘Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav.’, *Natural Product Research*. Taylor & Francis, 34(22), pp. 3244–3248. doi: 10.1080/14786419.2018.1553172.
- Moscatelli, V. A. (2015) ‘Química y farmacología de una planta medicinal argentina : *Artemisia copa* Chemistry and Pharmacology of an Argentinian Medicinal Plant : *Artemisia copa*’, *Dominguezia*, 31(1), p. 6.
- Na, K., Jung, H. and Kim, Y. (2012) ‘The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia’, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 48, pp. 227–286. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.10.022.
- Nakazawa, K. and Sapkota, K. (2019) ‘The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia’, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107426.
- Nazari Barchestani, Z. and Rafieirad, M. (2021a) ‘The effect of herniarin on anxiety behaviors and depression following chronic cerebral ischemia hypoperfusion in male rats’, *Experimental animal Biology*, 9(3), pp. 93–103.
- Nazari Barchestani, Z. and Rafieirad, M. (2021b) ‘The Effect of Herniarin on Spatial Working Memory, Pain Threshold, and Oxidative Stress in Ischemic Hypoperfusion Model in Rats’, *Caspian Journal of Neurological Sciences*, 7(1), pp. 42–50. doi: 10.32598/CJNS.7.24.5.
- Neira, F. and Ortega, J. L. (2004) ‘Antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA en el tratamiento del dolor crónico’, *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 11(4), pp. 210–222.
- O’Leary, M. M., Loney, B. R. and Eckel, L. A. (2007) ‘Gender differences in the association between psychopathic personality traits and cortisol response to induced stress’, *Psychoneuroendocrinology*, 32(2), pp. 183–191. doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.004.
- Ortega-gutiérrez, S. (2013) ‘Avances en el estudio de receptores acoplados a proteínas G’, *Real Sociedad Española de Química*, 109(4), pp. 76–284.
- Ortiz, L. A. and De la Mata, R. I. (2001) ‘Nuevos antipsicóticos’, *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 25(1), pp. 1–8.
- Pérez-Ortega, G. *et al.* (2016) ‘*Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties’, *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 181(8), pp. 221–228. doi: 10.1016/j.jep.2016.01.040.
- Pichot, P., López-Ibor, A. J. and Miyar, V. M. (2002) *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, DSM-IV-TR Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*.
- Prados, A. B. (2014) *Tesis Doctoral Estrés Oxidativo y Esquizofrenia*. Universidad de Salamanca.
- Ramírez-jirano, L. J. *et al.* (2019) ‘Cytokines and nervous system: relationship with schizophrenia’, *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 57(2), pp. 1–13.
- Redolat, R., Carrasco, M. del C. and Simón, V. M. (1998) ‘Efectos de la administración aguda de mk-801, antagonista no competitivo de los receptores nmda, sobre la evitación activa en

- ratones', *Psicothema*, 10(1), pp. 135–141.
- Reyes, A. A. (2008) 'Cafeína, receptores de adenosina, memoria y enfermedad de Alzheimer', *memoria y enfermedad*, 00(00), pp. 1–6.
- Rezaee, R. *et al.* (2014) 'Antigenotoxic activities of the natural dietary coumarins umbelliferone, herniarin and 7-isopentenylxy coumarin on human lymphocytes exposed to oxidative stress', *Drug and Chemical toxicology*, 0545(2), pp. 144–148. doi: 10.3109/01480545.2013.834352.
- Rezaei, F., Jamei, R. and Heidari, R. (2018) 'Evaluation of Volatile Profile , Fatty Acids Composition and in vitro Bioactivity of *Tagetes minuta* Growing Wild in Northern Iran', *Tabriz University of Medical Sciences*, 8(1), pp. 115–121. doi: 10.15171/apb.2018.014.
- Riegel, R. E. *et al.* (2010) 'Intracerebroventricular ouabain administration induces oxidative stress in the rat brain', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(3), pp. 233–237. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.02.002.
- Romero, S., Carlos, H. and Iregui, A. (2010) 'El Lipopolisacárido 1', *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, pp. 37–45. doi: 10.19052/mv.783.
- Rossi- Mañón, W. (2016) 'Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante', *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2), pp. 62–83. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572122/>.
- Roux, S., Sablé, E. and Porsolt, R. D. (2004) 'Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function', *Current Protocols in Pharmacology*, 27(1), pp. 1–23. doi: 10.1002/0471141755.ph1010s27.
- Royo-Isacha, J. *et al.* (2004) 'La «keta» (ketamina): del fármaco a la droga de abuso. Clínica biopsicosocial del consumidor y algunas propuestas terapéuticas', *Atención Primaria*, 34(3), pp. 147–151.
- Ruiz, J. S. *et al.* (2010) 'The Neurobiological Basis of Schizophrenia Bases Neurobiológicas de la Esquizofrenia', *Colegio Oficial de Psicólogos de Madrid*, 21(3), pp. 235–254. doi: 10.5093/cl2010v21n3a3.
- Salat, K. *et al.* (2015) 'Neuropharmacology Antidepressant-like effects of ketamine , norketamine and dehydronorketamine in forced swim test: Role of activity at NMDA receptor', *Neuropharmacology*, 99, pp. 301–307. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.037.
- San Miguel-Zamora, M. T. *et al.* (1995) 'INCIDENCIA DE EFECTOS EXTRAPIRAMIDALES EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA TRATADOS CON HALOPERIDOL SOLO O ASOCIADO A BIPERIDENO', *Farmacia Hospitalaria*, 19(4), pp. 225–228.
- Santillán-urquiza, M. A. *et al.* (2019) 'Galphimia glauca and Natural Galphimines Block Schizophrenia-Like Symptoms Induced with Apomorphine and MK-801 in Mice', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1–11. doi: 10.1155/2019/8404258.
- Santillán-urquiza, M. A., Herrera-ruiz, M. and Zamilpa, A. (2018) 'interaction of Galphimia glauca extract and natural galphimines with Ketamine and Haloperidol on different behavioral tests', *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier, 103(1), pp. 879–888. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.082.
- Sedlak, J. and Lindsay, R. H. (1968) 'Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent', *Analytical Biochemistry*, 25, pp. 192–

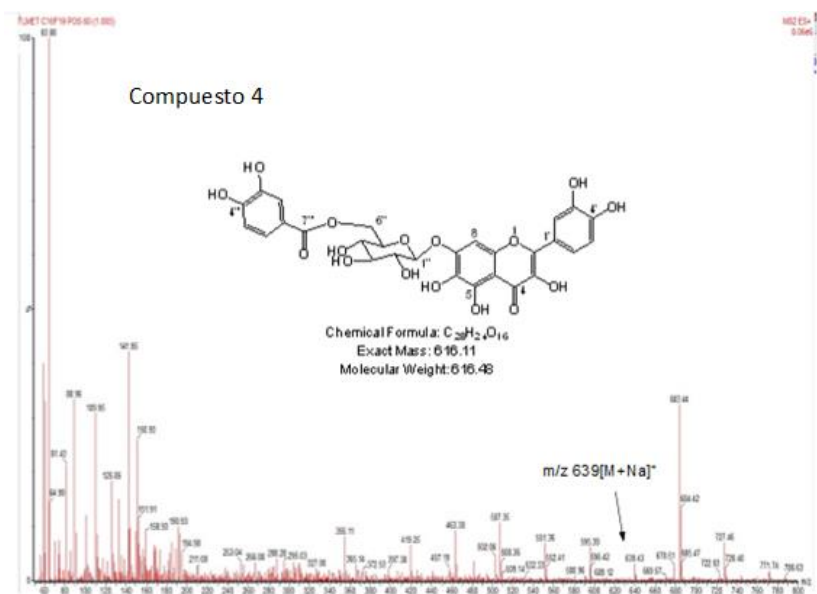
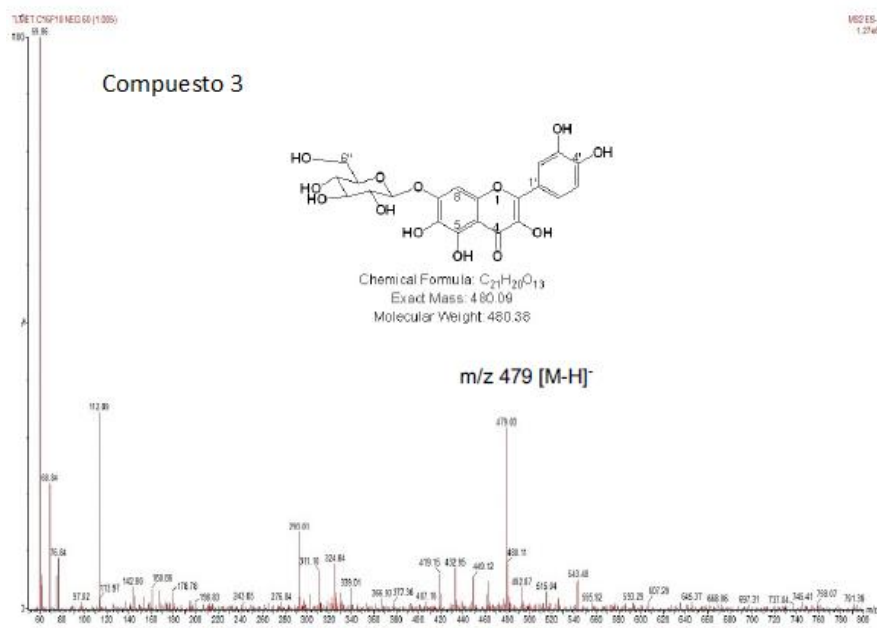


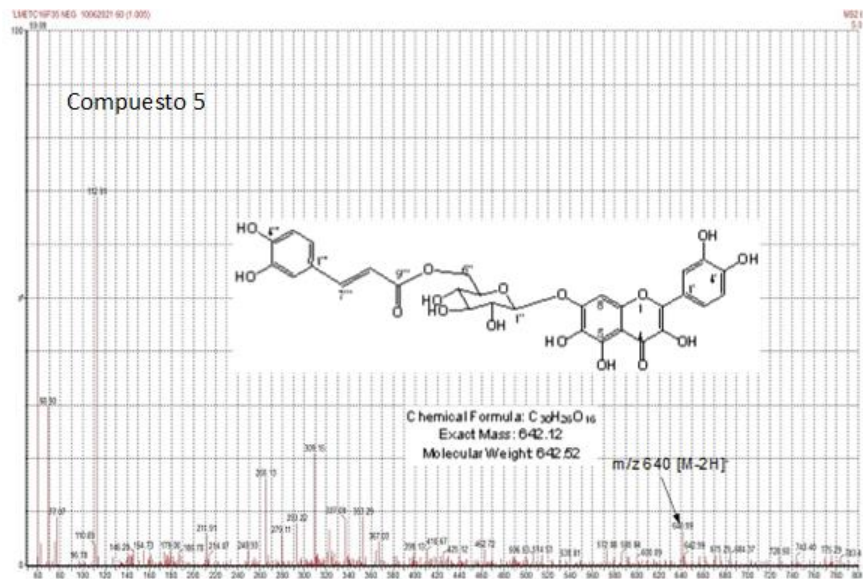
205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.
- Shahzadi, I. and Shah, M. M. (2015) 'Acylyated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity', 6(September), pp. 1–10. doi: 10.3389/fphar.2015.00195.
- Shaiban, Z. (2021) 'The Effect of Herniarin on Oxidative Stress in the Hippocampus in Streptozotocin-induced Diabetic Rats', *Journal of Animal Biology*, 14(1), pp. 55–63. doi: 10.22034/ascij.2021.684776.
- Soria, V., Uribe, J., Salvat-pujol, N., *et al.* (2018) 'Psiconeuroinmunología de los trastornos mentales', *Revista de Psiquiatría y Salud Mental (Barcelona)*. SEP y SEPB, 11(2), p. 10. doi: 10.1016/j.rpsm.2017.07.006.
- Soria, V., Uribe, J., Salvat-Pujol, N., *et al.* (2018) 'Psychoneuroimmunology of mental disorders', *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*. SEP y SEPB, 11(2), pp. 115–124. doi: 10.1016/j.rpsm.2017.07.006.
- Soto-bernardini, M. C. and Raventós-vorst, H. (2008) 'Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia', *Acta Médica Costarricense*, 50(4), pp. 197–202.
- Stepnicki, P. *et al.* (2020) 'Expert Opinion on Drug Discovery Multi-targeted drug design strategies for the treatment of schizophrenia', *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor & Francis, 00(00), pp. 1–14. doi: 10.1080/17460441.2020.1816962.
- Sureda, M. (2015) *Ketamina: Evaluacion de sus efectos comportamentales en dos modelos de memoria en rata*.
- Tajima, K., Fernández, H., *et al.* (2009) 'Tratamientos para la esquizofrenia. Revisión crítica sobre la farmacología y mecanismos de acción de los antipsicóticos.', *Actas Esp Psiquiatr*, 37(6), pp. 330–342.
- Tajima, K., Fernández, H., *et al.* (2009) 'Tratamientos para la esquizofrenia. Revisión crítica sobre la farmacología y mecanismos de acción de los antipsicóticos', *Actas Esp Psiquiatr*, 37(9), pp. 330–342.
- Tancara, I. and Uber, M. (2013) 'ESQUIZOFRENIA', *Revista de Actualización Clínica*, 35, pp. 1804–1809.
- Torres De Galvis, Y. (2018) 'Costos asociados con la salud mental', *Rev. Cienc. Salud. Bogota, Colombia*, 16(2), pp. 182–187.
- Valle, R. (2020) 'Schizophrenia in ICD-11: Comparison of ICD-10 and DSM-5', *Rev Psiquiatr Salud Ment*, 2, pp. 95–104.
- Vega Jiménez, J. *et al.* (2018) 'Factores cardioaterogénicos y riesgo cardiovascular en diabéticos tipo 2 hospitalizados', *Revista Cubana de Medicina Militar*, 47(2), pp. 133–145. Available at: <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/119/183>.
- Wąsik, A. *et al.* (2021) 'The Impact of the Combined Administration of 1MeTIQ and MK-801 on Cell Viability, Oxidative Stress Markers, and Glutamate Release in the Rat Hippocampus', *Neurotoxicity Research*. Springer US, 39(6), pp. 1747–1761. doi: 10.1007/s12640-021-00428-9.
- Watis, L. *et al.* (2008) 'Review Article Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review', *Journal of neural Trans*, 115, pp. 493–511. doi: 10.1007/s00702-007-0859-5.
- WHO | world health organization (2022) WHO. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/es/news/item/17-06-2022-who-highlights-urgent-need-to-transform-mental-health-and-mental-health-care> (Accessed: 10 August 2022).

- Winship, I. R. *et al.* (2018) 'An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia', *The Canadian Journal of Psychiatry*, pp. 1–13. doi: 10.1177/0706743718773728.
- Xu, L. *et al.* (2012) 'Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes L.*', *Chinese Herbal Medicines*. *The Chinese Herbal Medicines*, 4(2), pp. 103–117. doi: 10.3969/j.issn.1674-6384.2012.02.004.
- Yang, A. C. and Tsai, S. (2017) 'New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 18, p. 1968. doi: 10.3390/ijms18081689.
- Yankelevitch-yahav, R. *et al.* (2015) 'The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior', *Journal of Visualized Experiments*, 97, pp. 1–7. doi: 10.3791/52587.
- Zoupa, E. and Pitsikas, N. (2021) 'The nitric oxide (No) donor sodium nitroprusside (snp) and its potential for the schizophrenia therapy: Lights and shadows', *Molecules*, 26(11), p. 1396. doi: 10.3390/molecules26113196.

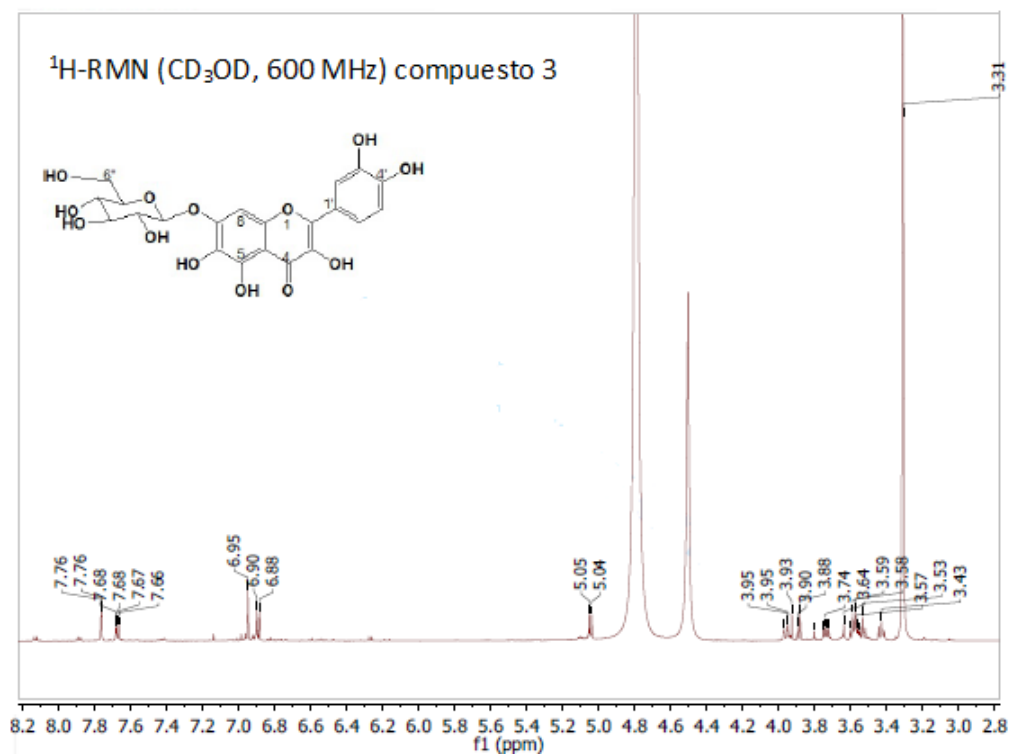
## 13 ANEXOS

### Anexo 1. Espectros Masa molecular m/z de los compuestos 3, 4 y 5

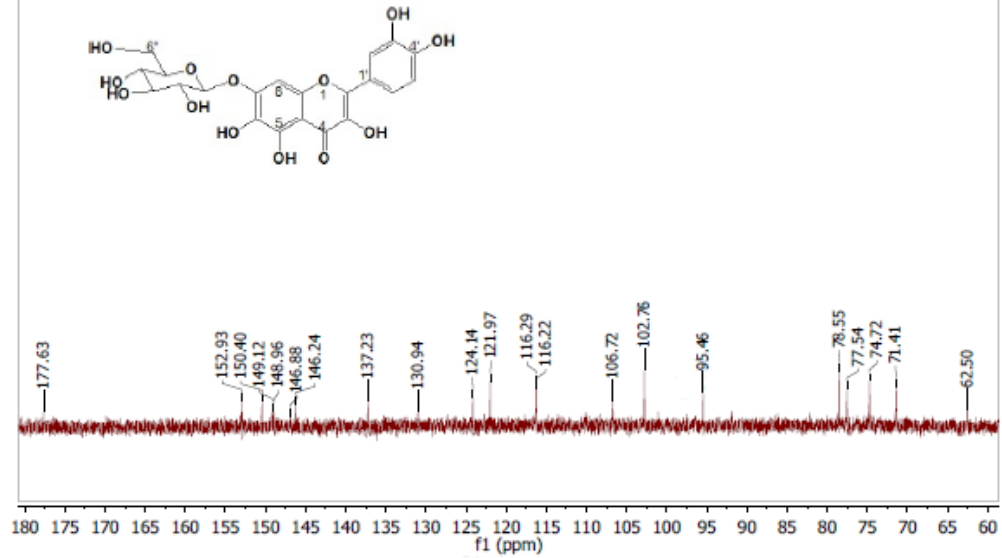




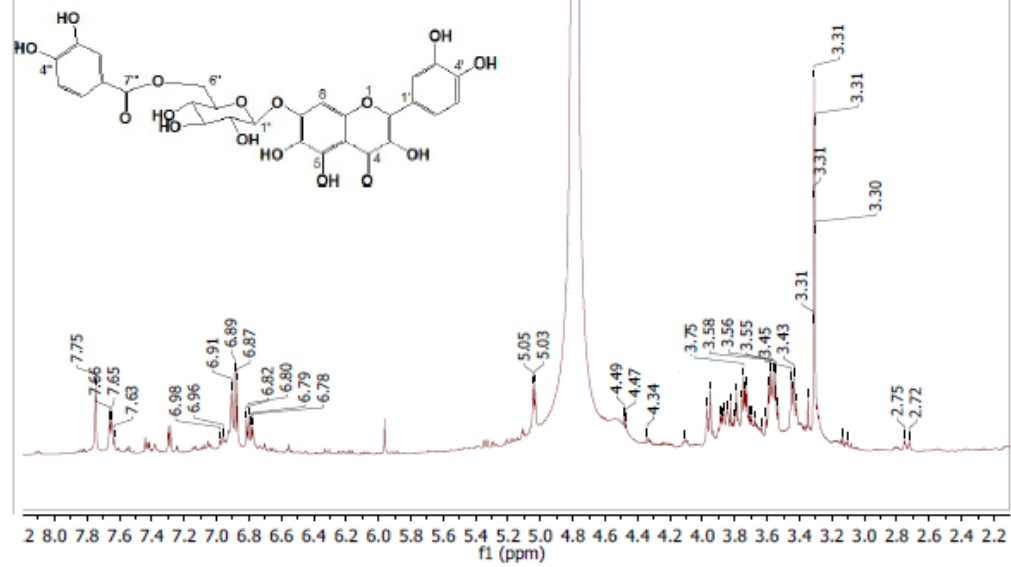
**Anexo 2.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN de los compuestos 3, 4 y 5

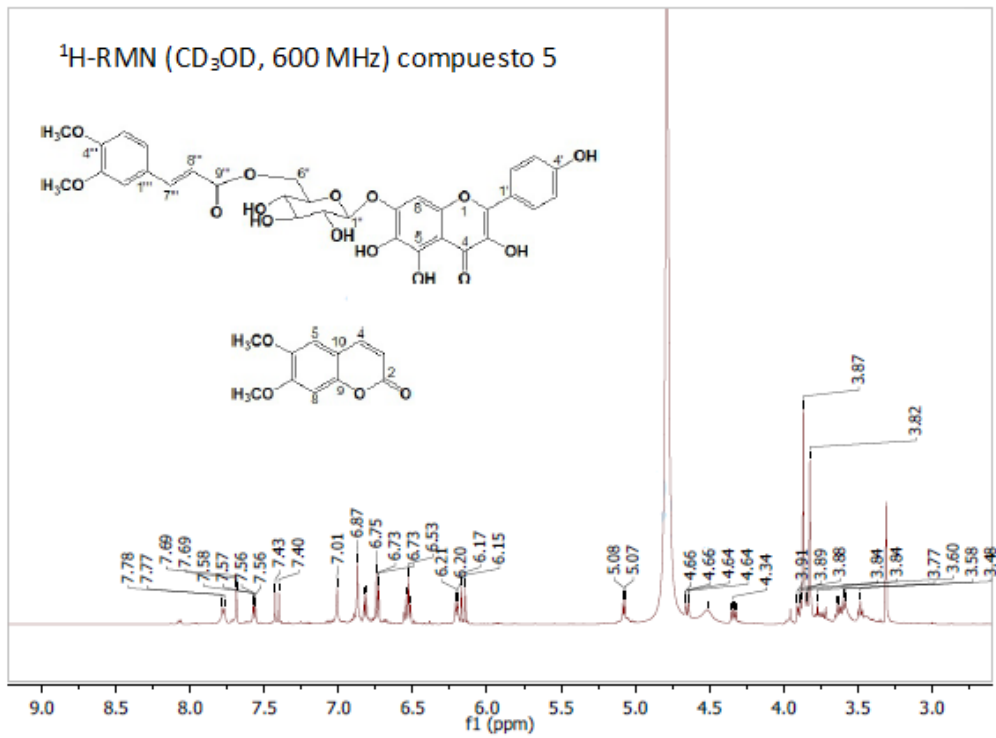
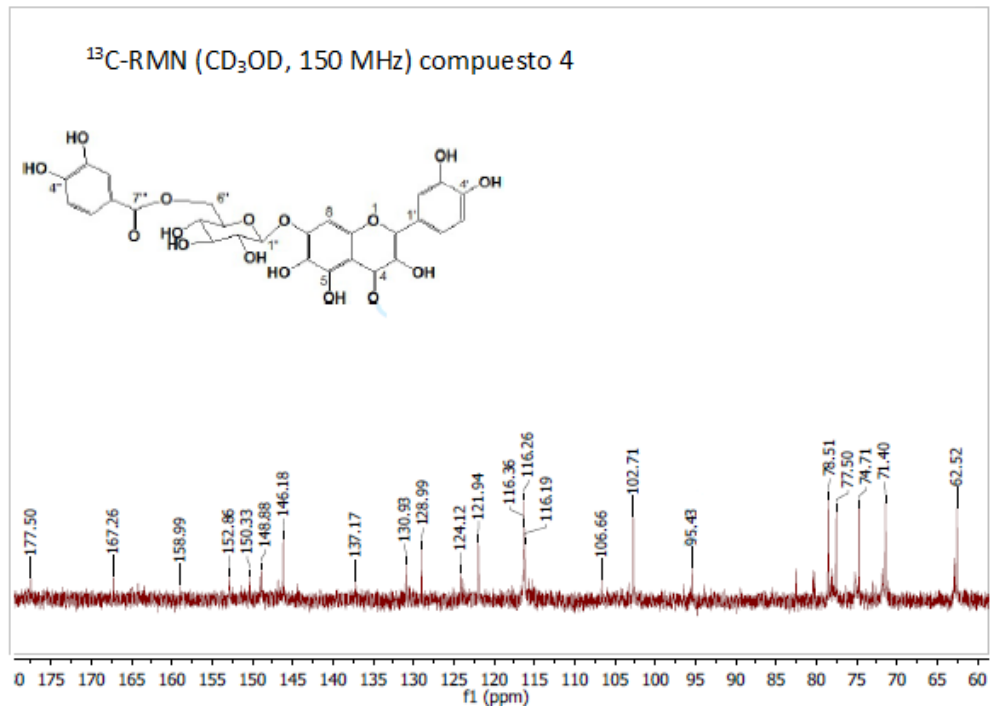


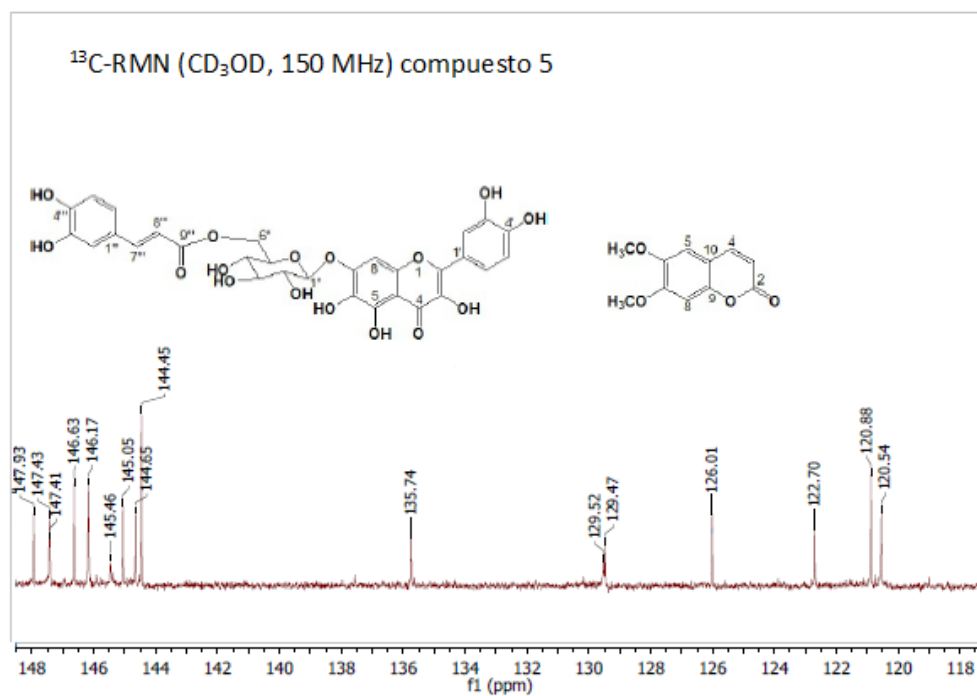
$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) compuesto 3



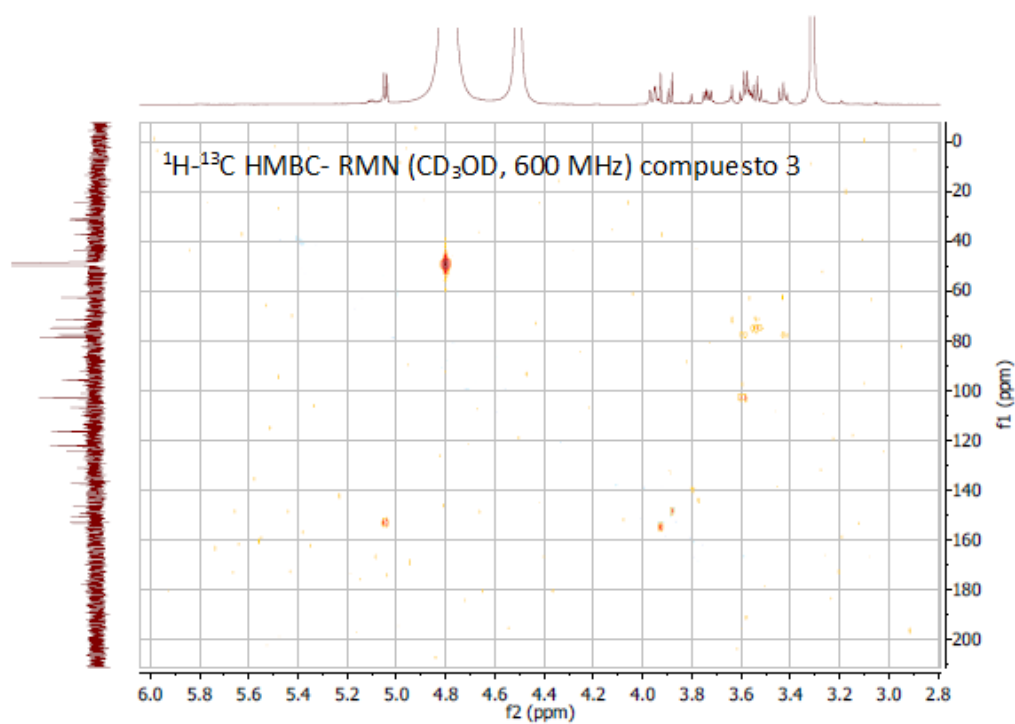
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) compuesto 4

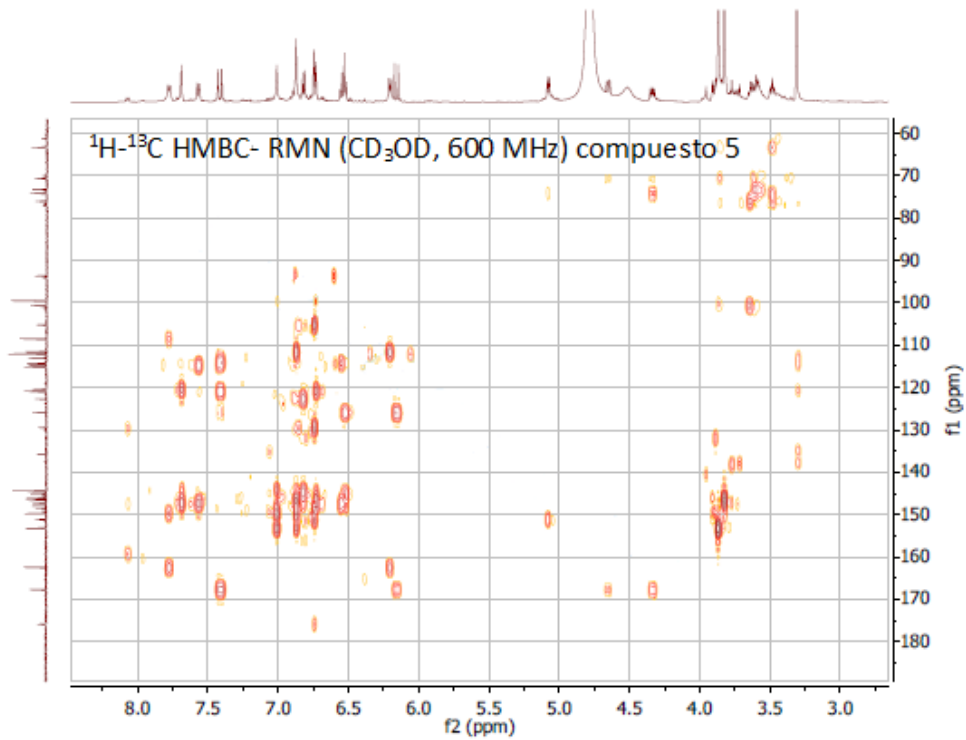
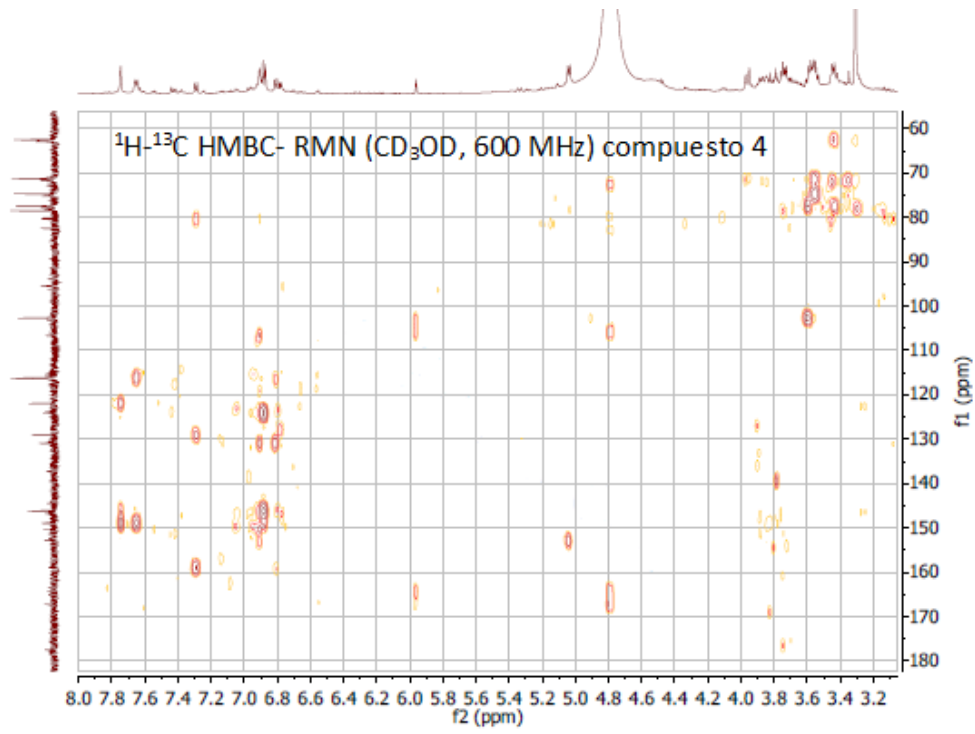






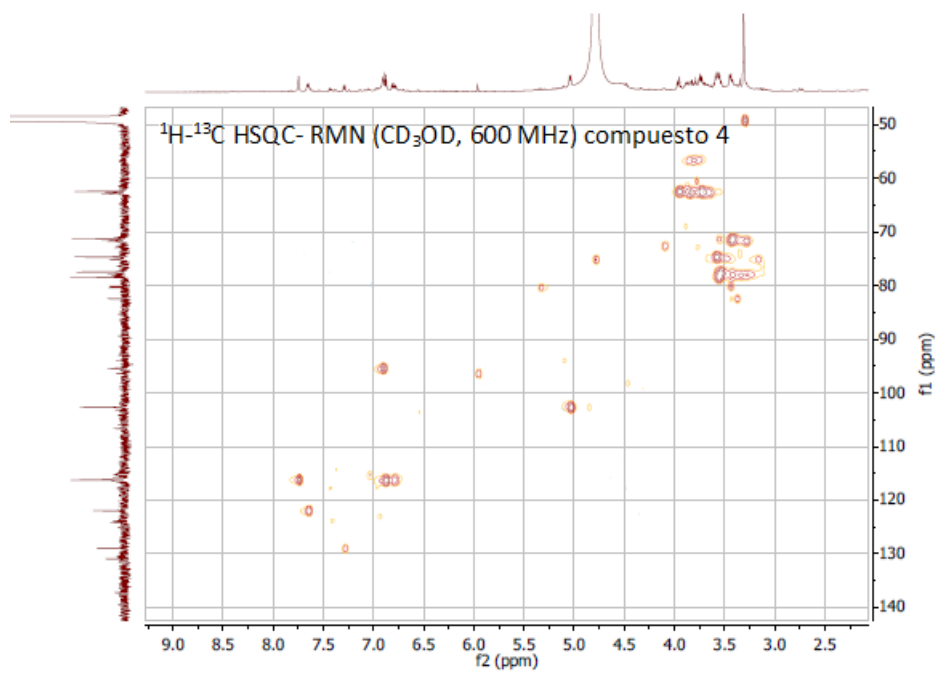
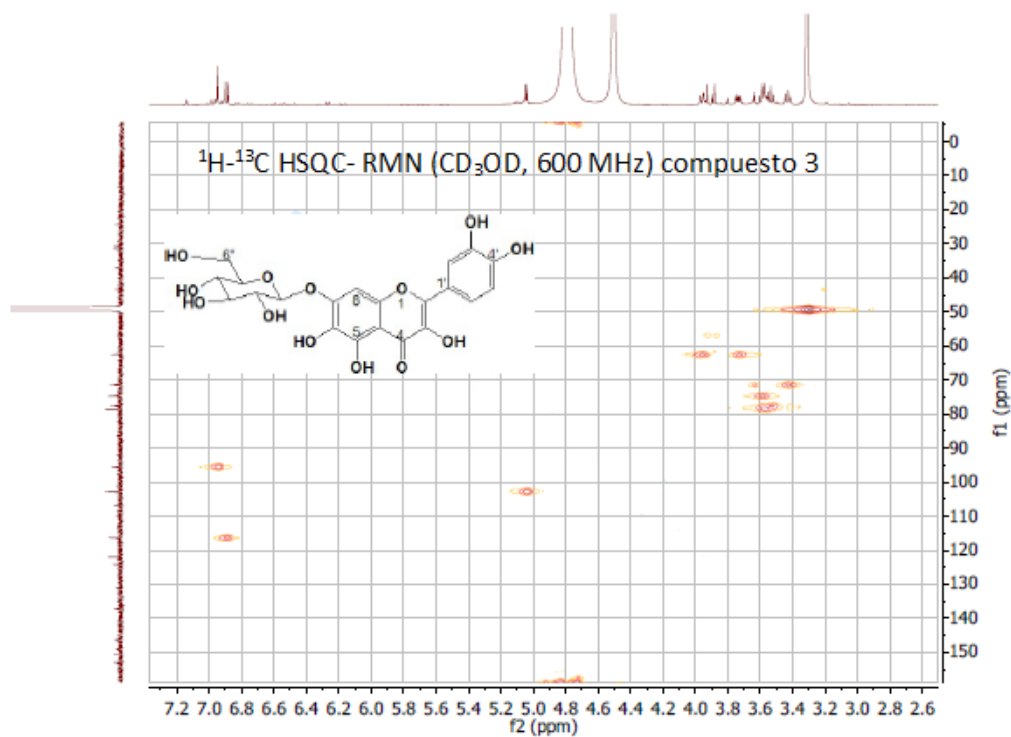
**Anexo 3.** Espectros de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMBC de los compuestos 3, 4 y 5

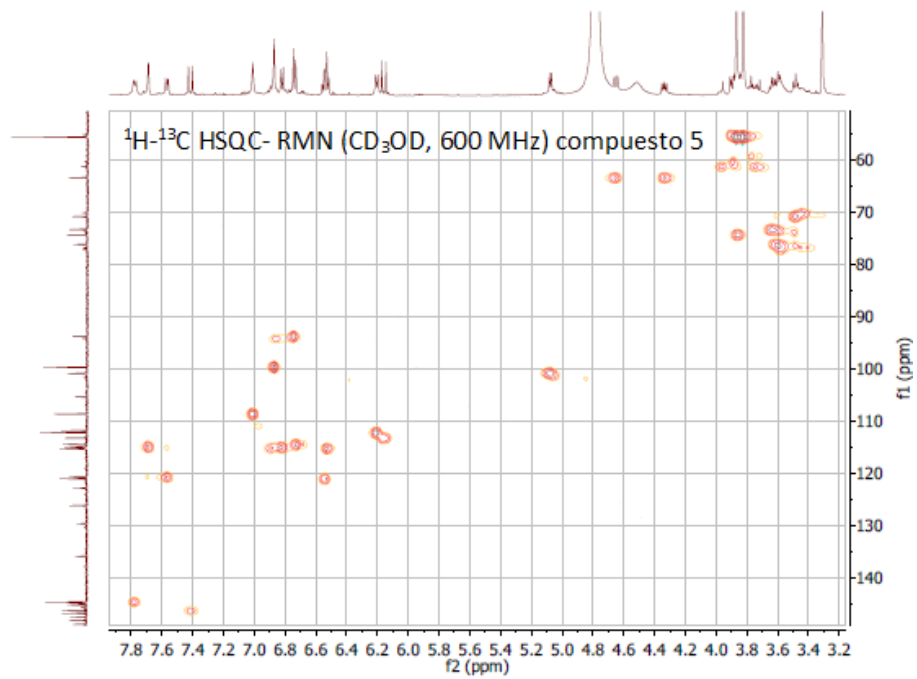




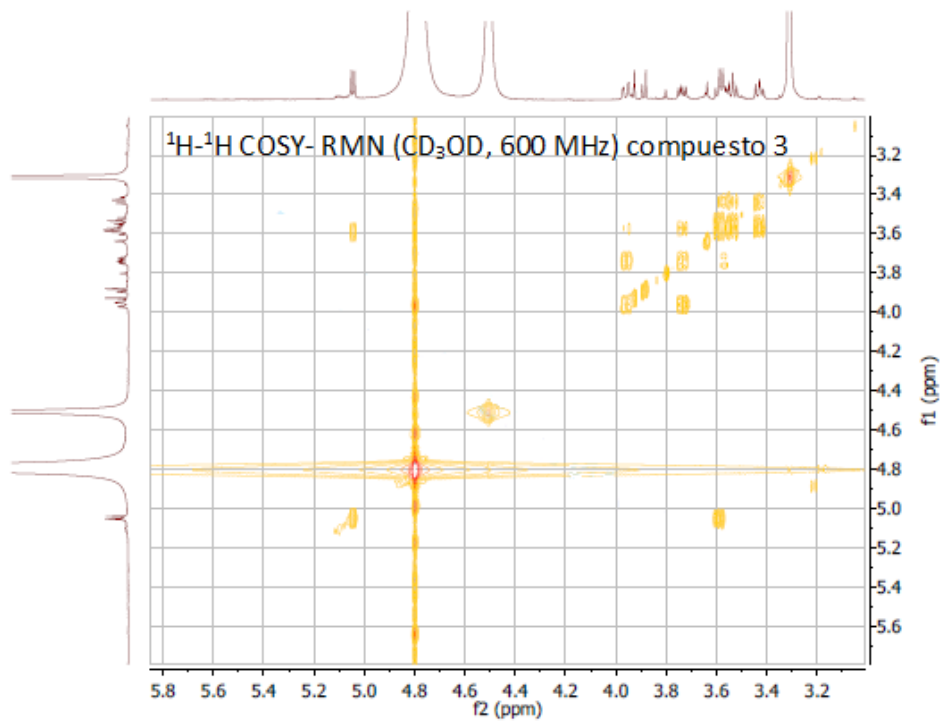


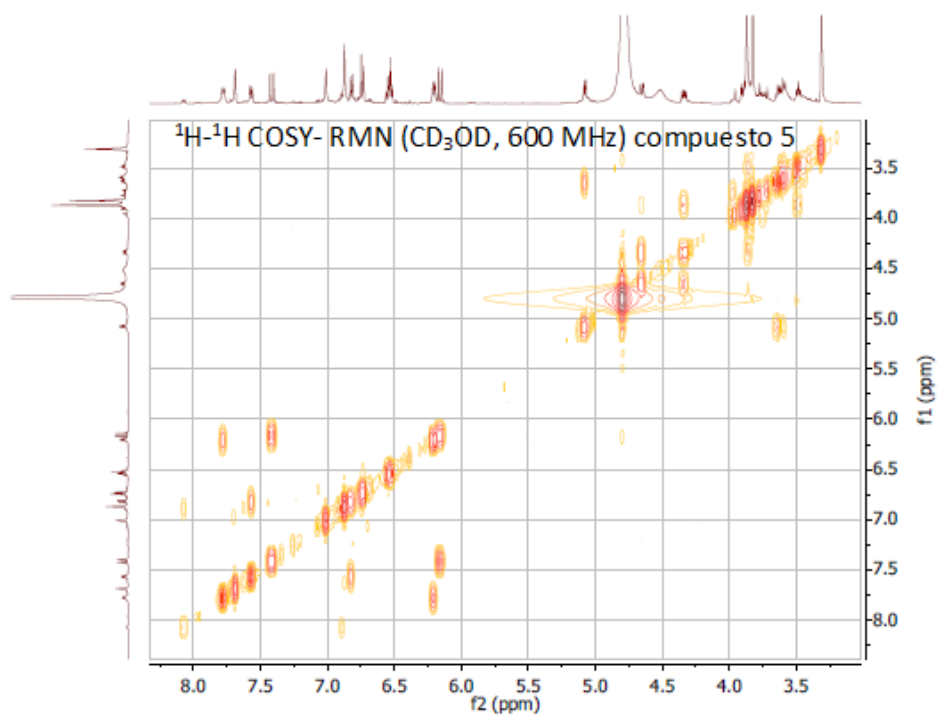
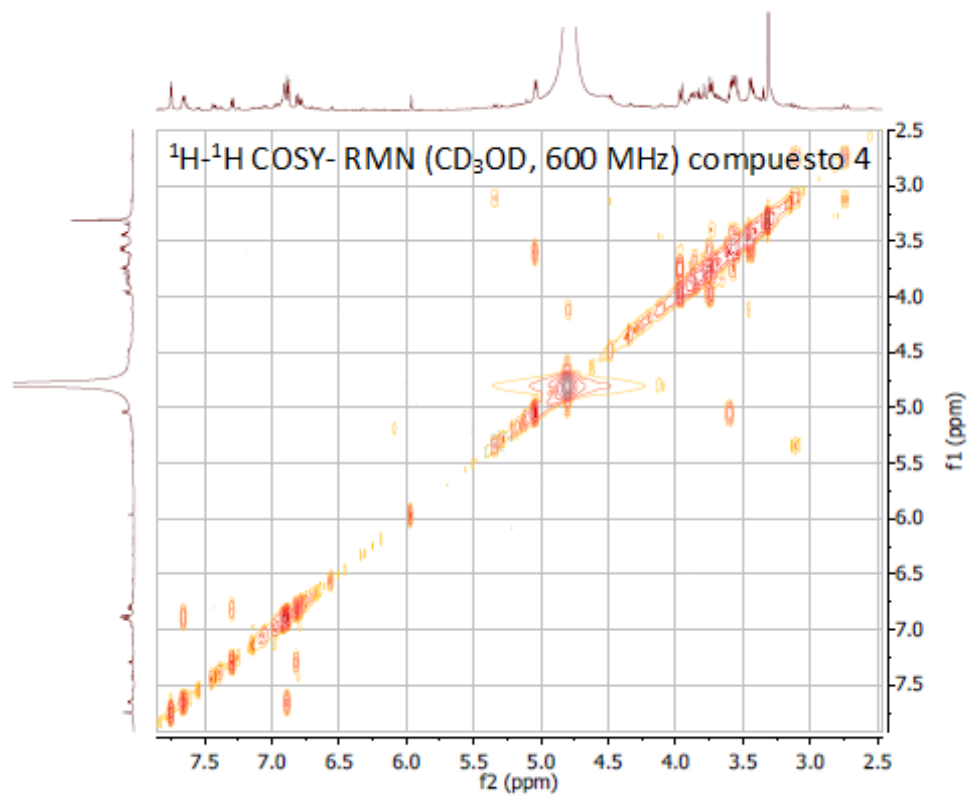
Anexo 4. Espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC de los compuestos 3, 4 y 5



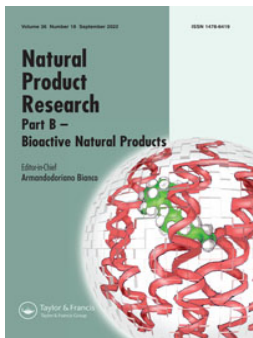


**Anexo 5.** Espectros de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  -COSY de los compuestos 3, 4 y 5





## PUBLICACIONES



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


## Isolation, chemical characterization, and anti-inflammatory activity of coumarins, flavonoids, and terpenes from *Tagetes lucida*

Porras-Dávila Sandra Liliana, González-Cortazar Manasés, Jiménez-Ferrer Enrique, Román-Ramos Rubén, Bello-Peralta Cinthya, Martínez-Hernández Gabriela Belen, Zamilpa Alejandro & Herrera-Ruiz Maribel


To cite this article: Porras-Dávila Sandra Liliana, González-Cortazar Manasés, Jiménez-Ferrer Enrique, Román-Ramos Rubén, Bello-Peralta Cinthya, Martínez-Hernández Gabriela Belen, Zamilpa Alejandro & Herrera-Ruiz Maribel (2022) Isolation, chemical characterization, and anti-inflammatory activity of coumarins, flavonoids, and terpenes from *Tagetes lucida*, *Natural Product Research*, 36:18, 4751-4756, DOI: [10.1080/14786419.2021.2005592](https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2005592)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2005592>

 View supplementary material 

 Published online: 17 Nov 2021.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 129

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



## Isolation, chemical characterization, and anti-inflammatory activity of coumarins, flavonoids, and terpenes from *Tagetes lucida*

Porras-Dávila Sandra Liliana<sup>a,b</sup>, González-Cortazar Manasés<sup>b</sup>, Jiménez-Ferrer Enrique<sup>b</sup>, Román-Ramos Rubén<sup>a</sup>, Bello-Peralta Cinthya<sup>b,c</sup>, Martínez-Hernández Gabriela Belen<sup>b</sup>, Zamilpa Alejandro<sup>b</sup> and Herrera-Ruiz Maribel<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), México City, México; <sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Xochitepec, Morelos, México; <sup>c</sup>Facultad de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

### ABSTRACT

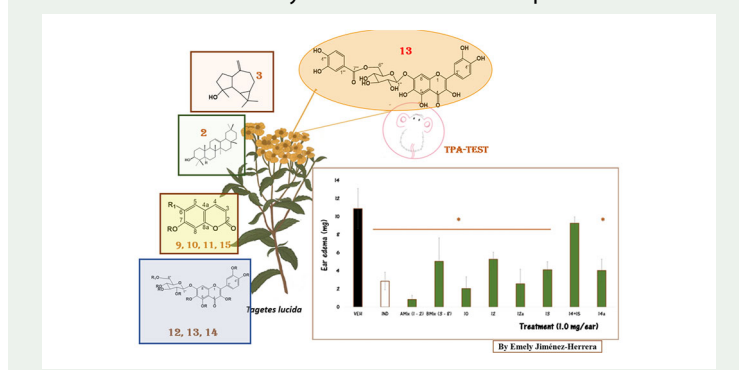
*Tagetes lucida* is widely used in traditional Mexican medicine for several disorders, including those associated with inflammation. In this work, fifteen compounds were identified (1–15) from *T. lucida*. Some of these compounds (1–8, 10, 12–14) were detected for the first time in the plant, and quercetagenin 7-O-β-(6"-Protocatecoyl) glucopyranoside (13) has been identified for any plant species. The inflammation inhibition effects of these compounds were as follows: Amix (1–2) > 10 > 12a > 13 > 14a > Bmix (3–9) > 12; 12 and 13 showed a dose-response behavior. The mixture of 14 and 15 was not active. This work contributes to the knowledge of the anti-inflammatory capacity of *T. lucida* and the chemical identity of their bioactive compounds.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 July 2021  
Accepted 1 November 2021

### KEYWORDS


*Tagetes lucida*; coumarins; flavonoids; terpenes; anti-inflammatory



## 1. Introduction

*Tagetes lucida* (Asteraceae) is a perennial herbaceous plant native to Mexico and Central America that has glossy leaves and aromatic yellow flowers. Since pre-Hispanic

**CONTACT** González-Cortazar Manasés ✉ [gmanases2000@gmail.com](mailto:gmanases2000@gmail.com); Herrera-Ruiz Maribel ✉ [cibis\\_her@yahoo.com](mailto:cibis_her@yahoo.com)

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2005592>.

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

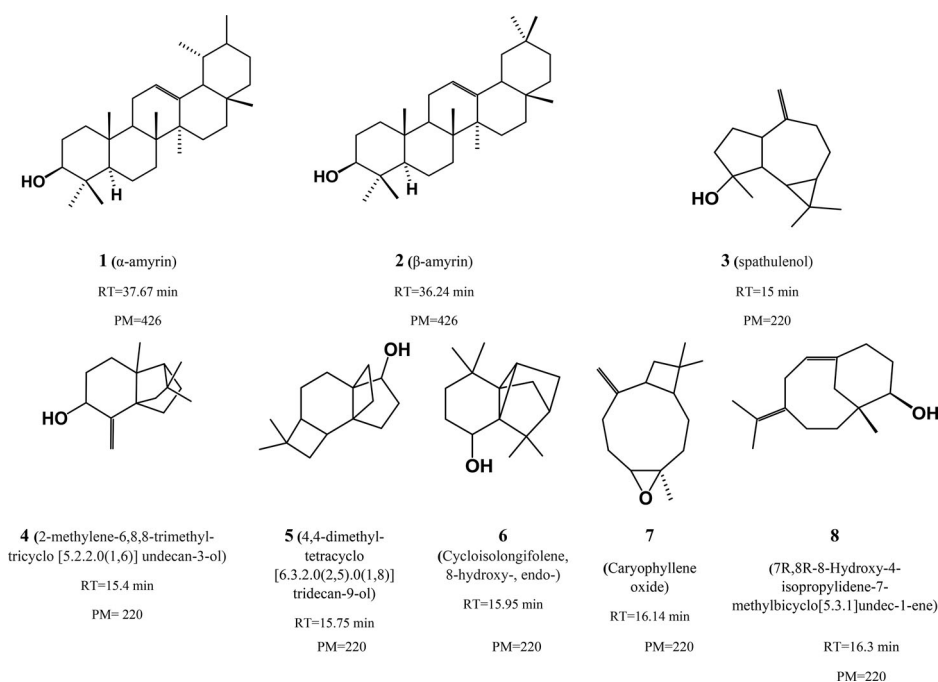
times, it has been used in a magical-religious context, as a food condiment, and to treat rheumatism and inflammation (Monroy-Ortiz and Castillo-España 2007). Antifungal and antibacterial activity of the dichloromethane and methanolic extracts has been reported, and there was a study that isolated and evaluated coumarin-type compounds, such as 7,8-dihydroxycoumarin, umbelliferone (7-hydroxycoumarin), esculetin (6,7-dihydroxycoumarin), 6-hydroxy-7-methoxycoumarin, herniarin (7-methoxycoumarin), scoparone (6,7-dimethoxycoumarin), and scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin), and flavonoids, such as patuletin, quercetin, and quercetagenin (Céspedes et al. 2006). The ethanol extract of this plant has been shown to have an analgesic effect that is attributed to the presence of quercetagenin 7-O- $\beta$ -D-glucoside and to coumarin 6,7 dimethoxycoumarin (González-Trujano et al. 2019) as well as to a known terpene  $\beta$ -caryophyllene (Hernández-Leon et al. 2020). Although *T. lucida* is widely used as an anti-inflammatory in Mexico, few studies have focused specifically on this activity. This plant species has been studied by our working group in recent years. Previously, the anti-inflammatory effect produced by the hexane extract obtained from *T. lucida* was demonstrated (Monterrosas-Brisson et al. 2020). Five coumarins were isolated, 7-isoprenyloxycoumarin being the most active. Therefore, the objective of this work was to continue with the chemical analysis of the hexanic extract (less polar) and the aqueous extract (polar compounds) for the isolation and chemical characterization of other compounds present in *T. lucida* with anti-inflammatory activity in the murine model of auricular edema induced with phorbol ester-TPA.

## 2. Results and discussion

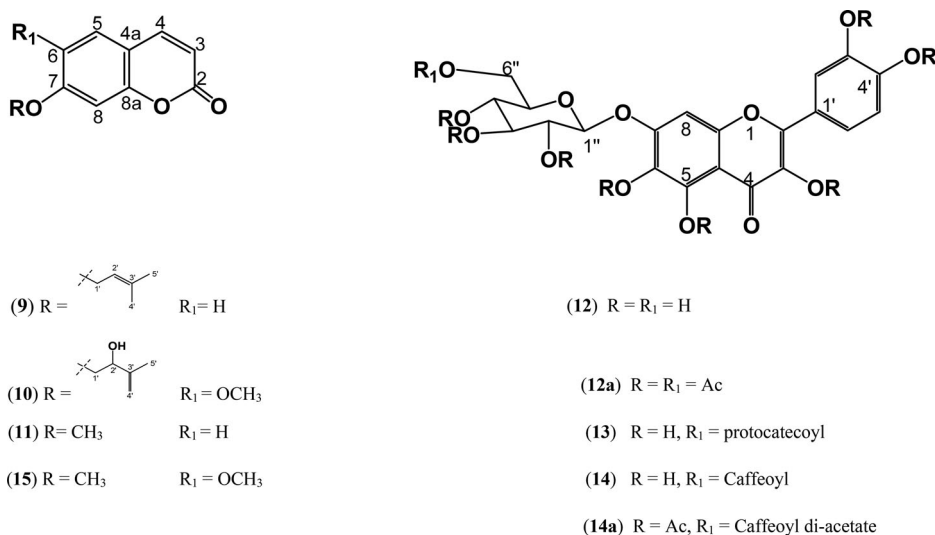
The GC-MS analysis of TIRbC1-F2 allowed for the identification of the amyryn mixture (AMix)  $\alpha$  and  $\beta$  in a proportion of 85.4% and 9.24%, respectively. In the fraction TIRbC1-F3, called BMix, a mixture of sesquiterpenes was identified (**3–8**); the proportion of these was 31.9%, 5.5%, 5.3%, 14.2%, 7.2%, and 17.9%, respectively (Figure 1). Compounds **9** and **11** (Figure 2) were identified by comparison with standards of 7-isoprenyloxycoumarin and herniarin using HPLC (Monterrosas-Brisson et al. 2020).

Compound **10** was obtained as an amorphous white precipitate. The mass spectrum (MS) gave a corresponding molecular peak in  $m/z$  276.9  $[M]^+$  to the molecular formula  $[C_{15}H_{16}O_5]^+$ . According to the analysis of one and two-dimensional NMR data (Table S3) and the comparison with those described (Heemann et al. 2006) in the literature, this compound was identified as 7-(2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enoxy)-6-methoxychromen-2-one, which is known as virgatenol (**10**, Figure 2).

Compound **12**, an amorphous yellow precipitate, was obtained, and after being developed with reagents specific for flavonoids, it turned orange and absorbed UV light. In the UV-vis spectrum, it showed a  $\lambda_{max}$  of 214, 260, and 357 nm, which are characteristic of flavonols. The MS gave a corresponding molecular peak at  $m/z$  479.03  $[M-H]^-$  to the molecular formula  $[C_{21}H_{19}O_{13}]^-$ . A comparative analysis of the spectroscopic data (Tables S1 and S2) with those described in the literature (Shahzadi and Shah 2015) indicates that this compound corresponds to the quercetagenin-7-O- $\beta$ -glucopyranoside (**12**). The one-dimensional NMR spectra of the peracetylated derivative (**12a**, white precipitate) were obtained, which was identified as quercetagenin-7-O-



**Figure 1.** GC/MS data and chemical structures of the compounds contained in the Amix (1, 2) and BMix (3–8) mixtures.



**Figure 2.** Compounds (9–15) isolated from the aqueous extract, TIAq.

$\beta$ -glucopyranoside nona-acetate (**12a**, Figure 2) according to the analysis of the spectroscopic data (Tables S1 and S2). The MS gave a molecular ion of  $m/z$  881.03  $[M + Na]^+$ , which corresponds to the molecular formula  $[C_{39}H_{38}NaO_{22}]^+$ .



Compounds **13** and **14** showed the same NMR signals as compound **12**, with the difference that in **13** and **14**, it showed additional signals characteristic of an aromatic ring with an ABX system at  $\delta$  6.82 (d, 1.8 Hz), 6.79 (d, 8.4 Hz) and 7.29 (dd, 1.8, 8.4) and  $\delta$  6.73 (d, 1.8 Hz), 6.52 (d, 8.0 Hz) and 6.55 (dd, 1.8, 8.4 Hz) assigned to H-2''', H-5''', and H-6''', respectively. Additionally, in **14**, a *trans* double bond signal was observed at  $\delta$  7.42 (d, 15.7, H-7''') and 6.16 (d, 15.7, H-8'''). The analysis of the NMR spectra of one and two dimensions and the comparison with the data described (Tables S1 and S2) identified the presence of protocatechuic and caffeic acids, respectively. Both **13** and **14** have quercetageitin-7-O- $\beta$ -glucopyranoside as their base structure, and acids are attached to carbon 6 of glucose. This was observed by the correlation in the HMBC of methylene H-6''a ( $\delta$  3.96) and H-6''b ( $\delta$  4.32) with carbonyl at C-7''' ( $\delta$  167.2) and H-6''a ( $\delta$  4.65) and H-6''b ( $\delta$  4.33) with carbonyl at C-9''' ( $\delta$  167.7), respectively. According to the analysis of the NMR data (Tables S1 and S2), **13** corresponded to the quercetageitin 7-O- $\beta$ -(6''-protocatecoyl) glucopyranoside and **14** to quercetageitin 7-O- $\beta$ -(6''-caffeoyl) glucopyranoside (Farshid et al. 2018). The MS of **13** gave a molecular ion of  $m/z$  640  $[M-2H]^-$ , which corresponds to the molecular formula  $[C_{30}H_{24}O_{16}]^-$ . One- and two-dimensional NMR data (Tables S1, S2, and S3) of the acetylated derivative of **14** allowed us to identify the mixture of quercetageitin 7-O- $\beta$ -(6''-caffeoyl) glucopyranoside deca-acetate (**14a**) and a coumarin known as scoporone (**15**, Figure 2). The MS gave a molecular ion of  $m/z$  1085  $[M+Na]^+$ , which corresponds to the molecular formula  $[C_{50}H_{46}NaO_{26}]^+$ .

In the present work, some of the identified compounds have already been isolated and reported in the species of the genus *Tagetes* (and other plant families), although not in *T. lucida*. This was the case of the amyryns. GC/MS showed a higher concentration of  $\alpha$ -amyrin than  $\beta$ -amyrin, the latter of which has been reported for *T. erecta* (Maity et al. 2011). For  $\alpha$ -amyrin, there are reports of a dose-dependent anti-inflammatory effect in the TPA assay, which is associated with the suppression of PGE2 by blocking the expression of COX-2 and the activation of NF- $\kappa$ B (Medeiros et al. 2007).

The application of TPA on the mouse ear caused an edema of 10.87 mg, which was inhibited by 77.5% by the administration of IND at 1 mg/ear (Table S4). The treatments obtained from *T. lucida* showed a significant inhibition of inflammation when compared to the VEH group ( $*p < 0.05$ ), with varied percentages. The order of edema inhibition was as follows: **AMix (1-2)** > **10** > **12a** > **13** > **14a** > **BMix (3-8)** > **12** > (**14** + **15**, which did not show anti-inflammatory activity). The compounds quercetageitin-7-O- $\beta$ -glucopyranoside (**12**) and quercetageitin 7-O- $\beta$ -(6''-Protocatecoyl) glucopyranoside (**13**) both decrease local inflammation at doses of 0.5 and 1.0 mg/ear, which were statistically different from the VEH group ( $*p < 0.05$ ). Figure S1 shows the dose-dependent behavior and the  $E_{max}$  and  $ED_{50}$  values for each treatment. The mechanism of TPA-induced edema is a series of cellular events, which includes the activation of phospholipase A2 proteins and protein kinase C (PKC), increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), which catalyzes the biosynthesis of prostaglandins (PGs), produces edema, stimulates migration of polymorphonuclear leukocytes, increases levels of pro-inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , and increases the expression of the enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2) and the transcription factor NF- $\kappa$ B (Chung et al. 2007).

### 3. Experimental

See [supplementary data](#).

### 4. Conclusion

The present work contributes to the knowledge of the chemical composition of *T. lucida*, which consists of flavonoids, terpenes, and coumarins that had not been previously isolated for this species, as well as the isolation and structural elucidation of a new flavonol called quercetageitin 7-O- $\beta$ - (6'' - Protocatecoyl) glucopyranoside (**13**). In addition, to show the anti-inflammatory activity of such compounds, we propose the plant as a candidate in the study of pharmacological models of chronic diseases associated with inflammation.

### Acknowledgments

Porras-Dávila SL is grateful for the fellowship from CONACyT 735062.

### Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

### Funding

This work was partially supported by Fondo de Investigación en Salud-IMSS FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/108.

### References

- Céspedes CL, Avila JG, Martínez A, Serrato B, Calderón-Mugica JC, Salgado-Garciglia R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem.* 54(10):3521–3527.
- Chung WY, Park JH, Kim MJ, Kim HO, Hwang JK, Lee SK, Park KK. 2007. Xanthorrhizol inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation and two-stage mouse skin carcinogenesis by blocking the expression of ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase through mitogen-activated protein kinases and/or the nuclear factor-kappa B. *Carcinogenesis.* 28(6):1224–1231.
- Farshid R, Rashid J, Reza H. 2018. Evaluation of volatile profile, fatty acids composition and in vitro bioactivity of *Tagetes minuta* growing wild in Northern Iran. *Adv Pharm Bull.* 8: 115–121.
- González-Trujano ME, Gutiérrez-Valentino C, Hernández-Arámburo MY, Díaz-Reval MI, Pellicer F. 2019. Identification of some bioactive metabolites and inhibitory receptors in the antinociceptive activity of *Tagetes lucida*. *Cav. Life Sci.* 231:116523.
- Heemann ACW, Miguel OG, Miguel MD, Sasaki CM, Monache FD. 2006. Phytochemical study of the species *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). *Braz J Pharm Sci.* 42(4):585–588.
- Hernández-Leon A, González-Trujano ME, Narváez-González F, Pérez-Ortega G, Rivero-Cruz F, Aguilar MI. 2020. Role of  $\beta$ -Caryophyllene in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tagetes lucida* Cav. essential oil. *Molecules.* 25(3):675.

- Maity N, Nema NK, Abedy MK, Sarkar BK, Mukherjee PK. 2011. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* 137(3):1300–1305.
- Medeiros R, Otuki MF, Avellar MCW, Calixto JB. 2007. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Eur J Pharmacol.* 559(2–3):227–235.
- Monroy-Ortiz C, Castillo-España P. 2007. *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos.* Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; p. 265.
- Monterrosas-Brisson N, Herrera-Ruiz M, Jiménez-Ferrer E, Bahena-Pérez R, Aviles-Flores M, Fuentes-Mata M, Martínez-Dunker I, González-Cortazar M. 2020. Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav. *Nat Prod Res.* 34:3244–3248.
- Shahzadi I, Shah MM. 2015. Acylated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity. *Front Pharmacol.* 6:1–10.

## Article

# Herniarin, Dimethylfraxetin and Extracts from *Tagetes lucida*, in Psychosis Secondary to Ketamine and Its Interaction with Haloperidol

Sandra Liliana Porras-Dávila <sup>1,2</sup> , Enrique Jiménez-Ferrer <sup>1</sup> , Rubén Román Ramos <sup>2,3</sup>,  
Manasés González-Cortazar <sup>1</sup> , Julio César Almanza-Pérez <sup>2,3</sup>  and Maribel Herrera-Ruiz <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano Del Seguro Social, Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, Mexico
- <sup>2</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Ciudad de México 04960, Mexico
- <sup>3</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1era Secc., Ciudad de México 09310, Mexico
- \* Correspondence: [cibis\\_herj@yahoo.com.mx](mailto:cibis_herj@yahoo.com.mx)

**Abstract:** *Tagetes lucida* Cav., is a medicinal plant used in Mexico to alleviate different disorders related to alterations of the central nervous system, such as behaviors associated with psychosis. The present work evaluated the effect of different extracts separated from this plant, TIHex, TIEA, TIMet, and TIAq, and of two isolated coumarins, herniarin (HN) and dimethylfraxetin (DF), on haloperidol-induced catalepsy (HAL), and psychotic behaviors provoked with a glutamatergic antagonist, ketamine (KET) on ICR mice. The extracts TIEA, TIAq, and the isolated compounds HN and DF, induced an increment of the cataleptic effect of HAL. Schizophrenia-like symptoms caused by KET were analyzed through the behavior of the animals in the open field (OFT), forced swimming (FST), passive avoidance test (PAT), and social interaction test (SIT). Treatments derived from *T. lucida* could interact with this substance in all tests except for FST, in which only TIMet blocks its activity. Mainly, TIEA, TIAq, HN, and DF, blocked the effects of KET on stereotyped behavior, hyperlocomotion, cognitive impairment, and detriment in the social interaction of rodents. *T. lucida* interacted with dopaminergic and glutamatergic systems.

**Keywords:** *Tagetes lucida*; psychosis; herniarin; dimethylfraxetin; ketamine; haloperidol



**Citation:** Porras-Dávila, S.L.; Jiménez-Ferrer, E.; Román Ramos, R.; González-Cortazar, M.; Almanza-Pérez, J.C.; Herrera-Ruiz, M. Herniarin, Dimethylfraxetin and Extracts from *Tagetes lucida*, in Psychosis Secondary to Ketamine and Its Interaction with Haloperidol. *Plants* **2022**, *11*, 2789. <https://doi.org/10.3390/plants11202789>

Academic Editor: Sebastian Granica

Received: 1 October 2022

Accepted: 18 October 2022

Published: 21 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

There is a wide variety of mental disorders, each with distinct manifestations, characterized by a combination of disturbances in thinking, perception, emotions, behavior, and relationships with others. These include psychosis, mainly schizophrenia [1], a psychiatric illness of genetic and environmental origin characterized by a variable set of classic symptoms of psychosis, the positive symptoms, which involve hallucinations and delusions. The negative symptoms include flat affect, alogia, anhedonia, social deficits, and cognitive symptoms, which reflect deficits in attention, memory, perception, and thinking [2,3]. This disease affects more than 21 million people worldwide. It is more common in men (12 million) than in women (9 million). Moreover, men generally develop schizophrenia at a younger age [1].

Despite advances in understanding the biological basis of behavior, the precise neurobiological mechanisms involved in schizophrenia remain largely unknown, so there are several hypotheses about the etiology of the development of this complex and multifactorial disease [4]. The dopaminergic hypothesis holds that the symptoms of this disease are due to an excess of dopamine or elevated sensitivity to this neurotransmitter system [5].

Furthermore, it postulates that hyperactivity of mesolimbic dopaminergic pathways and alterations of D1 and D2 family receptors and the pre-synaptic space are decisive for the clinical expression of psychosis, with the appearance of positive, negative, affective, and cognitive symptomatology [6].

On the other hand, the glutamatergic system is involved in psychosis symptoms. Therefore, there could be a decrease in the signaling of this pathway at the level of the ionotropic-NMDA receptors. Furthermore, the blockade of these NMDA receptors generates the positive, negative, cognitive, and affective symptoms typical of schizophrenia. Thus, the NMDA hypofunction may make the dopaminergic system more sensitive to psychosocial stress, and it has been argued that dopamine dysregulation in this disorder may even be secondary to glutamatergic impairment and that the prefrontal cortex and hippocampus are potential sites of regulation of dopaminergic neurons via glutamatergic projections to the midbrain [5].

Therapeutic management of this disease is based on the administration of antipsychotic drugs, which have a common (although not unique) mechanism of action: the anti-dopaminergic effect, since they act antagonistically on D2 receptors. These are classified into typical antipsychotics, such as haloperidol and atypical antipsychotics, such as olanzapine [7]. These are effective for negative (atypical) and positive (typical and atypical) symptoms, which results in a benefit for patients with schizophrenia, but which, in turn, as a consequence of prolonged treatment, leads to significant acute and chronic adverse side effects [8].

Therefore, it is necessary to research new therapeutic alternatives that are more secure and effective, as well as valuable and appropriate animal models for the treatment of schizophrenia; for this reason, several plants that have been essential instruments of traditional medicine in different pathologies are now being used as new alternatives.

*Tagetes lucida* Cav., is a plant native to Mexico commonly known in traditional Mexican medicine as “pericón”, among others. It belongs to the Compositae/-Asteraceae family, and its most frequent medicinal use is for digestive disorders. Moreover, for pain in general, inflammation problems, insomnia, anxiety, and depression [9]. It is also widely used to treat ailments such as “nerves” and “fright” for the “CRAZY” as it relieves the insane [10]. Among the pharmacological properties of *Tagetes lucida* are different studies that indicate its anti-inflammatory and antioxidant activity attributed to some of its compounds, such as coumarins, flavonoids, and essential oil [11,12]. Recent studies evaluated the anti-inflammatory activity of hexane and acetone extract of the species in a model of ear edema induced with TPA finding an inhibition of inflammation of 92.7 and 75.9% and from which five coumarins were isolated, among which found HN and DF [13]. Likewise, El-Newary et al. [14] reported the antioxidant effect of the species by modulating biomarkers of oxidative stress, such as malondialdehyde and activities of catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase in a CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity model. It has also been shown to have CNS effects by its antidepressant properties mediated by 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the forced swimming test in rats [15], anxiolytic and sedative effects in experimental models in mice such as open field, exploration cylinder, hole plate, maze plus and potentiation of barbiturate-induced hypnosis [16] and analgesic properties by involving the participation of receptors like opioids, benzodiazepines, and Serotonin 1A receptor 5-HT, as well as nitric oxide.

Due to the ethnomedicinal use of the species, several toxicity studies have been conducted in mice and rats, demonstrating its safety at high doses. Diaz-Samayoa and Brenda. [17] reported that the aqueous extract (1–5 g/kg), administered orally to rats, did not induce signs of gastric toxicity or digestive hemorrhage, and administered orally to mice in the acute toxicity test, showed no toxic effect. El-Newary et al. [14] evaluated toxicity by the Bruce method at 0.5, 1, 1, 1, 2, 3, 4, and 5 g/kg, reporting that the species was safe at the maximum dose. Likewise, Guadarrama-Cruz et al. [18] reported that the aqueous extract of *T. lucida* shows no signs of toxicity or mortality in acute toxicity tests, so

this extract provides an introductory level of safety when combined with the lack of severe side effects reported in its use in traditional medicine.

In addition, there are previous reports of the phytochemical compounds produced by *Tagetes lucida* Cav., which include flavonoids, tannins, essential oils and coumarins, which could have beneficial effects on CNS [9].

HN, or 7-methoxycoumarin, is one of the more common coumarins, occurring in several plant families, such as Caryophyllaceae, Gramineae, Labiatae, Leguminosae, Moraceae, Rosaceae, Rutaceae, Solanaceae, and Compositae. Furthermore, it has antifungal, antibacterial, antifungal [19], antigenotoxic [20], radical scavenging, antinociceptive, cytotoxic, antitumoral [21], anxiolytic, antidepressant [22] and also was found as nootropic [23]. On the other hand, DF or 6,7,8-trimethoxycoumarin is a coumarin obtained from species such as *Gomortega keule*. This compound is antioxidative [24], anxiolytic, and sedative-like activities, the last involving serotonergic and GABAergic neurotransmission [16]. These compounds were previously isolated and reported for the species *T. lucida* [13].

This study aimed to assess the effect of extracts and two compounds isolated from *Tagetes lucida* Cav., in mice exposed to potentiation of haloperidol (dopaminergic system)-induced catalepsy using the bar test. Moreover, on symptoms similar to schizophrenia induced with the acute administration of ketamine (glutamatergic system), in this last part, the effects were evaluated by employing behavioral tests, including the passive avoidance test for cognitive deterioration; open field test for positive symptoms; the forced swimming and social interaction test for negative symptoms.

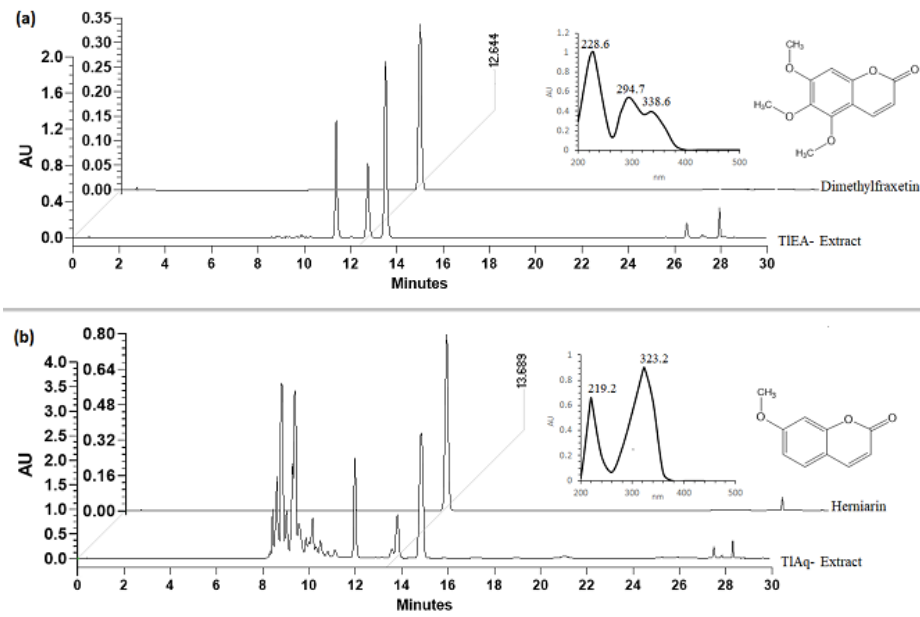
## 2. Results

### 2.1. Quantification and Chemical Identification of Dimethylfraxetine (DF) and Herniarin (HN)

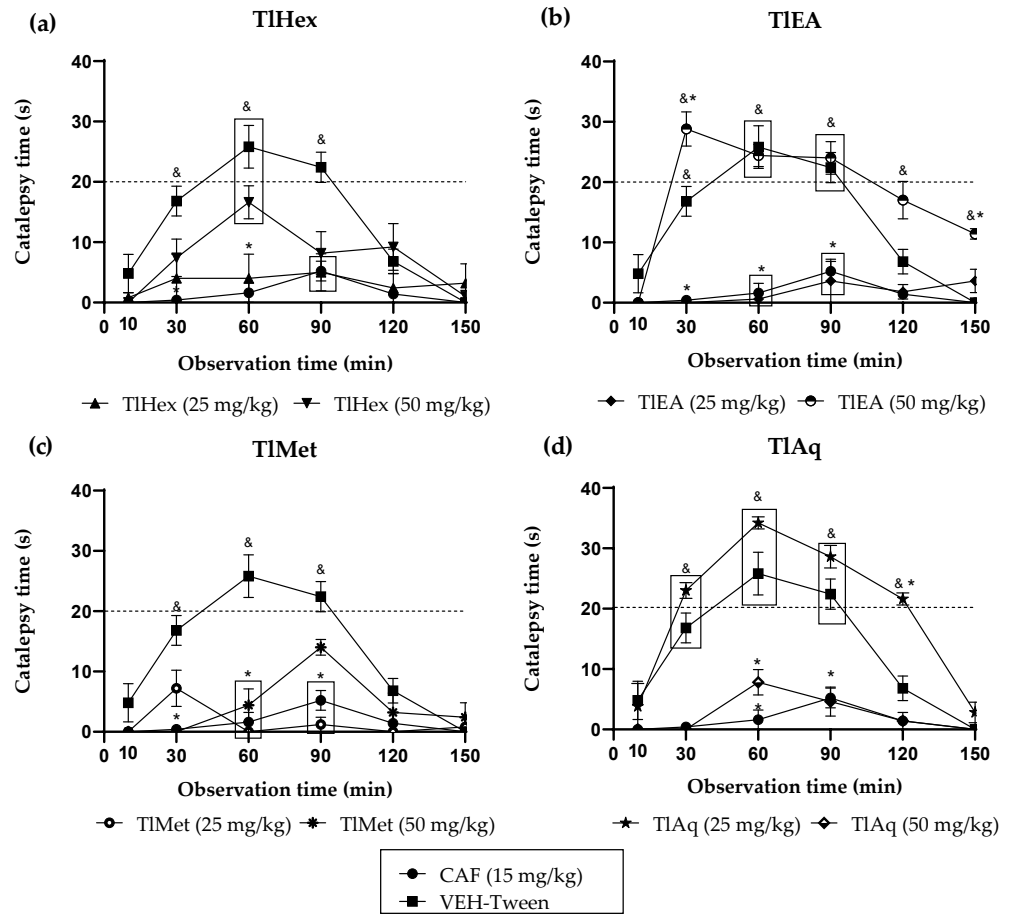
HPLC analysis (Figure 1) allowed us to obtain the concentration of DF in the ethyl acetate extract (TIEA), which was  $253 \text{ mg g}^{-1}$  of extract, and HN in the aqueous extract (TIAq) was  $204 \text{ mg g}^{-1}$  of extract. The identification of DF and HN was made by comparison with the isolated compounds in the retention times (RT) and UV absorption spectra. The HPLC chromatogram (Figure 1a) of the TIEA extract showed the presence of DF, with an RT of 12.64 min and a UV spectrum with  $\lambda_{\text{max}} = 228.6, 294.7, \text{ and } 338.6 \text{ nm}$ , and the TIAq extract showed HN with an RT of 13.68 min, and a UV spectrum with  $\lambda_{\text{max}} = 219.2 \text{ and } 323.2 \text{ nm}$ , characteristic of coumarin-like compounds (Figure 1b).

### 2.2. Catalepsy Induced by HAL. Catalepsy Induced by HAL of Four Extracts (TlHex, TIEA, TlMet and TIAq) and Two Compounds (HN and DF)

The results obtained in this test (Figure 2) show that the negative control VEH-Tween presented a tendency to increase the immobility time of the mice on the BT from minute 10, an effect that was progressive as time passed. At minute 30, a significant increase in the immobility time on the bar was already observed concerning the caffeine group (CAF  $15 \text{ mg/kg}$ ,  $\& p < 0.05$ ). Nevertheless, it was not until the 60 min and up to the 90 min that the cataleptic effect (staying on the bar without moving for more than 20 s) was present. These data were significantly different also to CAF, which blocked the cataleptic effect provoked by HAL. TlHex treatment at a dose of  $50 \text{ mg/kg}$  increases the time of immobile posture of the animal. It is presented as a trend from minute 30, with a maximum peak at minute 60, and this does not represent cataleptic activity. Although the administration of TIEA at  $50 \text{ mg/kg}$  induced a significant increase with respect to the caffeine group, in the time the mice remained in the immobile posture, showing catalepsy from minute 10 to minute 120, even at minute 150, the mice still had traits of this effect ( $\& p < 0.05$ ). It should be noted, for this treatment, that the cataleptic activity in minute 30 and minute 150 presented a significant difference with respect to the group of animals receiving only HAL ( $* p < 0.05$ ), and in minute 30, it occurs with a cataleptic time greater than 20 s enhancing HAL action. The lowest dose of TIEA,  $25 \text{ mg/kg}$ , could completely block the cataleptic state induced by the D2 agonist, behaving similarly to CAF.



**Figure 1.** HPLC chromatograms show the chemical profile. AU, absorbance units; (a) RT of the TIEA, UV spectrum, and chemical structure of dimethylfraxetin (DF); (b) RT of the TIEA, UV spectrum, and chemical structure of herniarin (HN).

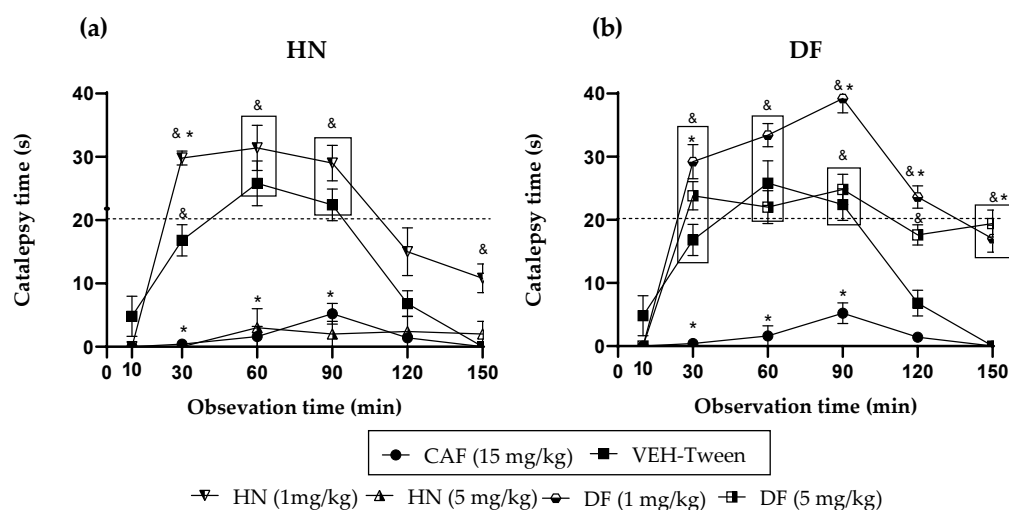


**Figure 2.** Effect of *T. lucida* extracts on cataleptic state induced with haloperidol (HAL) 0.5 mg/kg i.p., in Bar test (BT) in mice: (a) TIHex; (b) TIEA; (c) TIMet; (d) TIAq. ANOVA followed by Dunnett's Test ( $\bar{x} \pm S.E.M.$ ,  $n = 5$ ); \*  $p < 0.05$  in comparison with the VEH-Tween group, &  $p < 0.05$  in comparison with caffeine (CAF).



TIAq extract at 25 mg/kg, induces a significant increase compared to CAF (&  $p < 0.05$ ) in bar immobility posture, starting at minute 30, with the presence of catalepsy by minute 60 and up to 90, and by minute 120 in addition to the difference with caffeine there is a statistically significant difference over 20 s with the group that only received HAL (\*  $p < 0.05$ ), an effect that declines subsequently; a similar pattern as the negative control group is observed. However, the results presented at a dose of 50 mg/kg block the effect of HAL, at all the times analyzed. Both doses of 50 and 25 mg/kg of the TIMet extract decrease HAL-induced catalepsy, with greater blockade observed at the lower dose.

HN and DF, isolated from the active extracts, presented a potentiation of cataleptic effect at doses of 1 mg/kg. The results obtained in this assay (Figure 3) indicate that the group administered with DF, at a dose of 1 mg/kg, presents a positive cataleptic state at minute 30, with a statistically significant difference in comparison with the positive control group (CAF 15 mg/kg) (&  $p < 0.05$ ), this positive effect increased until minute 60 until minute 90 and 120 a cataleptic potentiation is observed with a statistically significant difference with respect to the animals administered only with HAL (\*  $p < 0.05$ ). At minute 150, there is a decrease in a catalepsy of fewer than 20 s; however, there is still a statistically significant difference when compared with the positive control group and the VEH-Tween group.



**Figure 3.** Effect of coumarins isolated from *T. lucida* on the cataleptic state (haloperidol-HAL-0.5 mg/kg i.p.), in Bar test (BT) on mice. (a) Herniarin (HN); (b) Dimethylfraxetin (DF). ANOVA followed by Dunnett's Test ( $\bar{x} \pm S.E.M.$ ,  $n = 5$ ); \*  $p < 0.05$  in comparison with the VEH-Tween group, &  $p < 0.05$  in comparison with caffeine (CAF).

For the dose of DF at 5 mg/kg, a positive cataleptic state can be observed from minute 30 to minute 90 with a significant difference compared with the positive control group CAF (&  $p < 0.05$ ); however, there was no difference with the VEH-Tween group. At minute 120, the cataleptic state decreased progressively, and this effect was maintained until minute 150 so that at these two points, there was a statistically significant difference with the positive control group (&  $p < 0.05$ ) or with the animals administered only with HAL (\*  $p < 0.05$ ).

Likewise, HN at 1 mg/kg induced in mice a behavior similar to that of DF at the same dose, with a positive cataleptic state from min 30 and a statistically significant difference with both the positive control group CAF (&  $p < 0.05$ ) and the group of animals only with HAL (\*  $p < 0.05$ ) above 20 s, thus generating a potentiation of the cataleptic effect. At minute 90, the cataleptic state increased with a statistically significant difference only with respect to the positive control group (CAF &  $p < 0.05$ ), and by minutes 120 and 150, it progressively decreased with no statistically significant difference with either group. However, at a dose of 5 mg/kg, a blockage of the HAL effect was observed at all times analyzed.

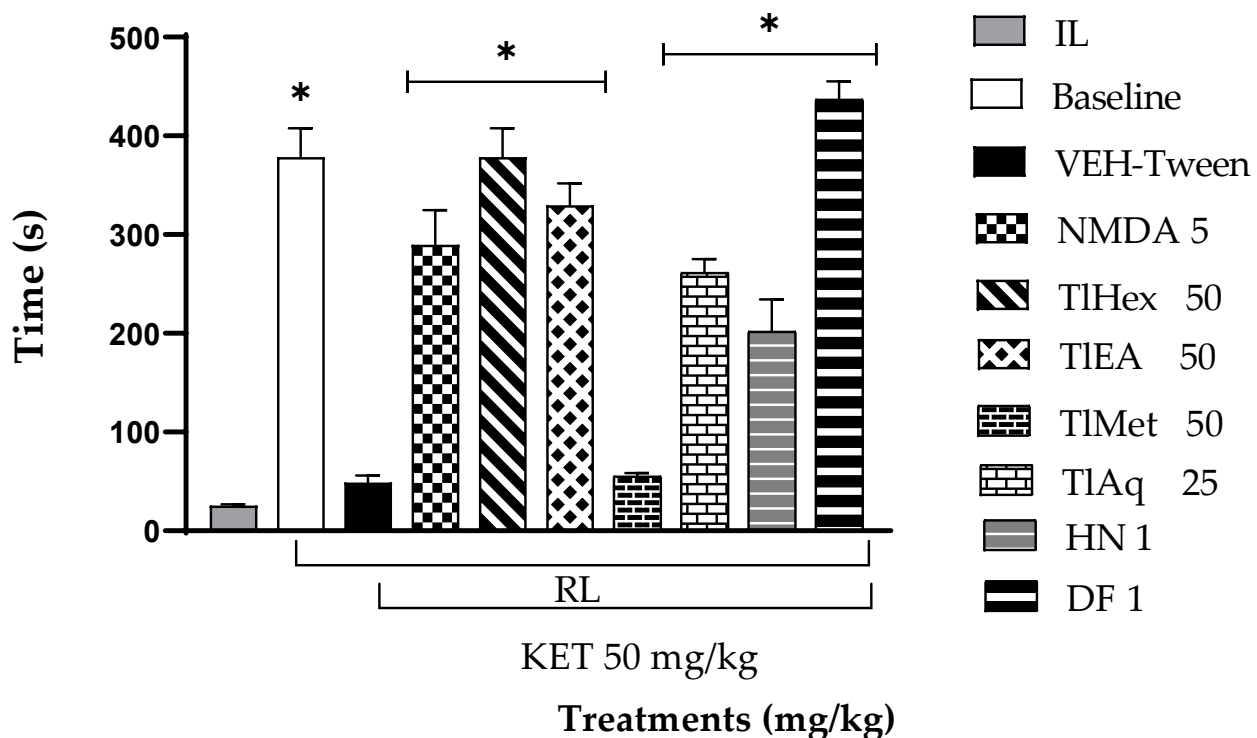


### 2.3. Interaction of *Tagetes lucida* Extracts, HN and DF, with KET in Different Behavioral Tests

According to the results obtained from the haloperidol-induced catalepsy assay, the extracts (TIHex, TIEA, and TIMet at 50 mg/kg and TIAq at 25 mg/kg) and the compounds (HN and DF, 1 mg/kg) evaluated in the ketamine-induced psychosis model according to their doses with the highest activity.

#### 2.3.1. Passive Avoidance Test (PAT)

The effect of *T. lucida* extracts on the cognitive activity of mice administrated with KET (50 mg/kg) and evaluated utilizing the PAT can be observed in Figure 4. The latency time during training, IL (20.85 s average), was the same for all groups, so there was no statistical difference between groups since the animals were in the same conditions at the beginning of the test. In the RL phase, latency time during the test, it can be observed that the VEH-Tween group (negative control) and TIMet 50 mg/kg presented a similar time to the IL. So, this extract did not generate any learning in the rodents; therefore, did not present a statistically significant difference with the damage group (\*  $p < 0.05$ ). On the contrary, the baseline group (healthy animals) did not generate any damage and showed normal learning behavior, so they all remembered the aversive stimulus.



**Figure 4.** Effect of *T. lucida* extracts, herniarin (HN), and dimethylfraxetin (DF) on acute schizophrenia-like symptoms induced with KET 50 mg/kg i.p., in the Passive avoidance test (PAT) in mice. ANOVA followed by Dunnett's Test ( $\bar{x} \pm S.E.M.$ ,  $n = 5$ ) with \*  $p < 0.05$  compared to the VEH-Tween group. RL = retention latency; IL = initial latency.

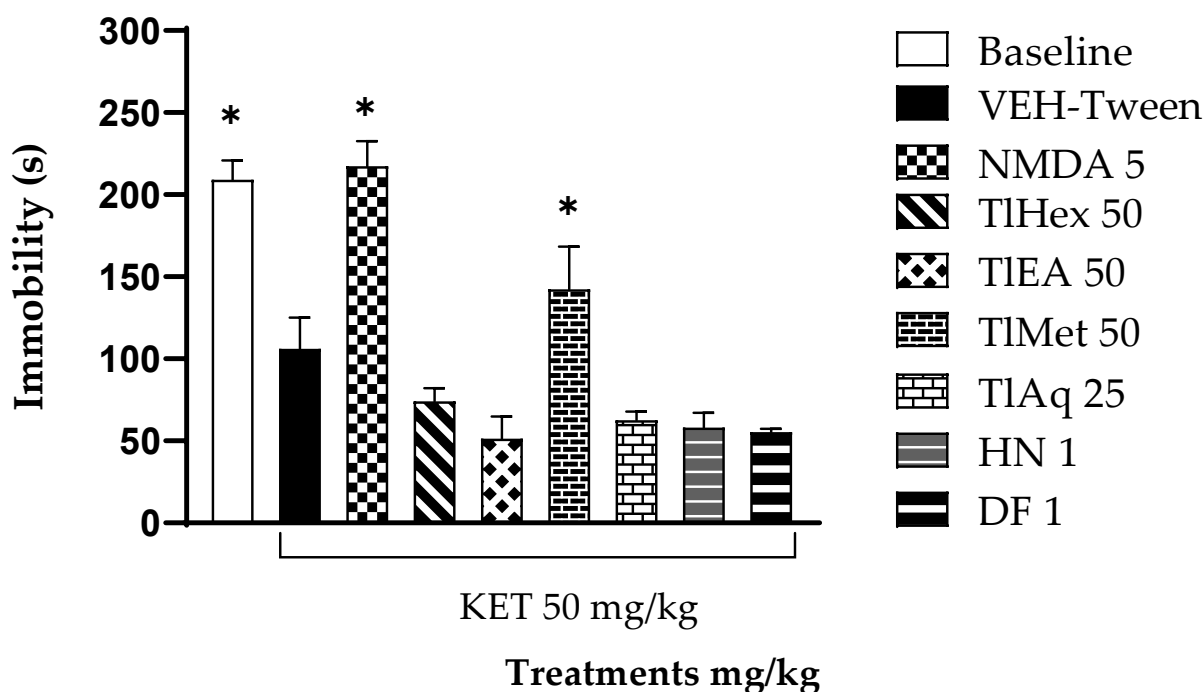
The administration of NMDA 5 mg/kg induced an increase in the RL, indicating a protective effect that translates into learning, since they were able to remember the aversive stimulus, and their response time, in this case, was more significant than in the initial stage and the KET alone group (VEH-Tween). Similar behavior was observed in the groups receiving TIHex, and TIEA extracts at 50 mg/kg and TIAq at 25 mg/kg. However, these data differed statistically from the VEH-Tween (\*  $p < 0.05$ ).

In the same way, it shows that the RL phase time of DF and HN at 1 mg/kg presented a significant difference in comparison with the VEH-Tween group ( $p < 0.05$ ). Both compounds

were able to reverse the damage caused by KET. However, DF presented higher values than the reference drug (NMDA 5 mg/kg) and animals in the baseline group, so a better protective effect translated into learning in rodents can be observed.

### 2.3.2. Forced Swimming Test (FST)

The results obtained in the acute administration of KET were made on animals subjected to FST. Figure 5 indicates that the animals in the baseline group presented a significant difference compared with the negative control group (VEH-Tween). Hence, a depressive effect was present in the animals, which was enhanced by KET increasing the depressive state in the VEH-Tween animals. For of TIHex and TIEA (50 mg/kg), and TIAq (25 mg/kg), it is observed that these induced a significant decrease in the immobility parameter compared with the VEH-Tween group ( $* p < 0.05$ ). As for HN and DF at 1 mg/kg induced a significant decrease in the immobility parameter with respect to the VEH-Tween group, to which no treatment was administered ( $* p < 0.05$ ), these coumarins had similar behavior as KET (VEH-Tween).



**Figure 5.** Effect of *T. lucida* extracts, herniarin (HN), and dimethylfraxetin (DF) on acute schizophrenia-like symptoms induced with KET 50 mg/kg i.p., in the Forced Swimming Test (FST) in mice. ANOVA followed by Dunnett's Test ( $\pm$ S.E.M.,  $n = 5$ ) with  $* p < 0.05$  when the comparison is with the VEH-Tween group.

### 2.3.3. Open Field Test (OFT)

In the acute KET induction trial, positive symptoms were evaluated in the OFT (Table 1), indicating that the parameters evaluated in the baseline group presented lower values than the animals that received KET and VEH-Tween, ( $* p < 0.05$ ). While the mice that received the NMDA drug at 5 mg/kg showed similar behavior to the baseline in TC, R, G, TSG, SB, and TSB, all showed statistical differences with VEH-Tween ( $* p < 0.05$ ). In addition, the administration of all the extracts induced a significant decrease in the number of TC compared with the negative control VEH-Tween ( $* p < 0.05$ ). Similarly, the R and G decreased significantly, except for the TIMet group at 50 mg/kg, in which the number of events increased in both parameters, surpassing the negative control without significant difference. Knotted to the results obtained with the different extracts in the Grooming, the animals invested less time in this activity (TSG) with a significant difference

in comparison with VEH-Tween (\*  $p < 0.05$ ). However, the TIMet group causes only a tendency to decrease that variable but fails to be significantly different from VEH-Tween. Regarding stereotyped behaviors (SB) and time spent in these (TSB), it can be observed that the VEH-Tween damage group presented higher values. TIMet and TIAq extracts were different (\*  $p < 0.05$ ), and the TIEA extract did not cause such behaviors, so no value was recorded. It should be noted that TIHex induced a significant decrease in the number of SB to such an extent that only  $1 \pm 0.63$  events were observed; however, the time in which it performed these behaviors (TSB) was similar to that of VEH-Tween ( $p > 0.05$ ).

**Table 1.** Effect of *T. lucida* extracts, herniarin (HN), and dimethylfraxetin (DF) on acute schizophrenia-like symptoms induced with KET 50 mg/kg in the Open Field Test (OFT) in mice. (Observation time 30 min).

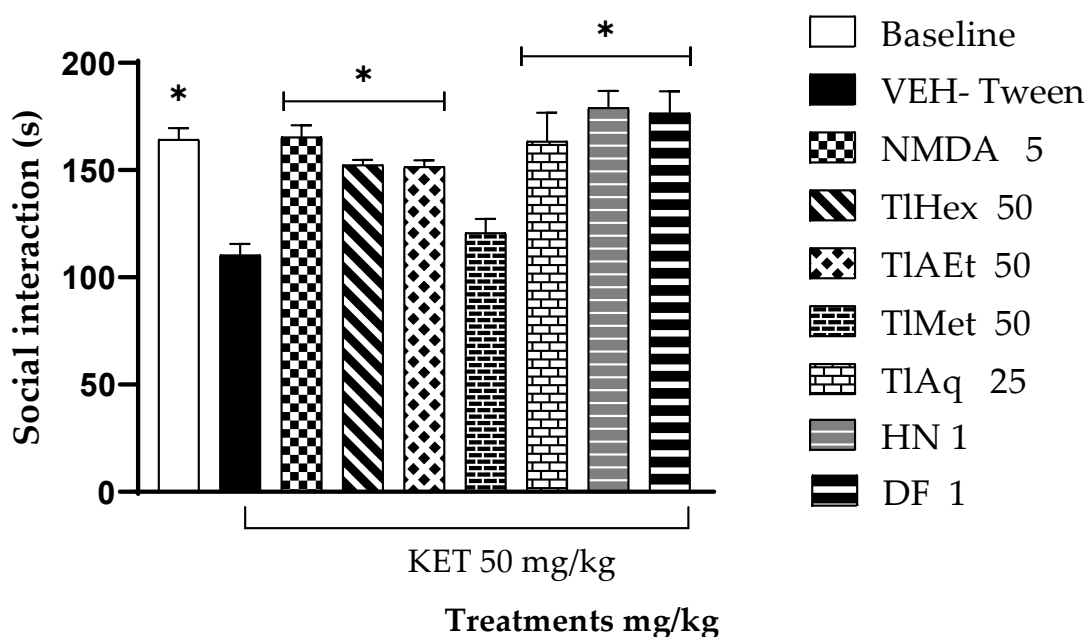
Treatments (mg/kg)	TC (Events)	R (Events)	G (Events)	TSG (sec)	SB (Events)	TSB (sec)
Baseline	235.0 ± 14.6 *	135.2 ± 11.4 *	27.8 ± 0.7 *	185.4 ± 9.7 *	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0 *
<b>KET (50 mg/kg)</b>						
VEH-Tween	435.6 ± 9.2	225.0 ± 15.3	42.2 ± 3.7	272.6 ± 8.0	13.8 ± 1.2	37.6 ± 5.5
NMDA 5	267.6 ± 14.9 *	71.6 ± 2.6 *	20.4 ± 3.6 *	190.0 ± 29.3 *	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0 *
TIHex 50	227.8 ± 23.3 *	144.2 ± 18.4 *	22.8 ± 2.8 *	223.4 ± 31.9	1.0 ± 0.6 *	33.2 ± 19.2
TIEA 50	216.4 ± 30.8 *	95.2 ± 17.7 *	24.4 ± 4.0 *	176.4 ± 7.8 *	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0 *
TIMet 50	238.6 ± 6.0 *	240.8 ± 11.3	49.2 ± 5.6	194.0 ± 3.4 *	4.0 ± 1.76 *	5.8 ± 1.5 *
TIAq 25	209.6 ± 34.9 *	124.8 ± 12.9 *	17.2 ± 2.2 *	105.0 ± 22.1 *	0.4 ± 0.4 *	2.0 ± 2.0 *
HN 1	169.6 ± 12.9 *	63.2 ± 7.6 *	27.2 ± 2.8 *	342.0 ± 75.2	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0 *
DF 1	246.6 ± 23.7 *	132.2 ± 12.8 *	20.2 ± 1.7 *	187.6 ± 47.6 *	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0 *

Total crossings (TC), rearings (R), groomings (G), time spent grooming (TSG), stereotyped behaviors (SB), and time spent stereotyped behaviors (TSB). ANOVA followed by Dunnett's Test ( $\bar{x} \pm S.E.M.$ ,  $n = 5$ ) with \*  $p < 0.05$  when the comparison is with the VEH-Tween group.

For DF and HN, it is observed that the administration of the compounds induced a significant decrease in the number of TC, R, and G with a statistically significant difference with the VEH-Tween group (\*  $p < 0.05$ ). Furthermore, DF presented TSG values similar to those of the baseline group and the NMDA reference drug. However, although HN presented G values similar to those of the baseline group, it increased the time in which the animals spent grooming per event (TSG), so that in this parameter it did not present a statistically significant difference with the VEH-Tween group (\*  $p < 0.05$ ). Stereotyped behaviors (SB) and time spent in these (TSB), it can be observed that both compounds at the dose administered did not cause such behaviors, so no value was recorded, and these results were statistically different from the group of animals administered only with KET (\*  $p < 0.05$ ), so there was no psychotic state in the animals, the main positive symptom of patients with schizophrenia.

#### 2.3.4. Social Interaction Test (SIT)

In Figure 6, it can be observed that the animals of the Baseline group, which did not receive ketamine, spent significantly more time smelling a new mouse than those in the group of damage with KET (VEH-Tween \*  $p < 0.05$ ). Animals administered with KET and with NMDA at 5 mg/kg, TIHex and TIEA at 50 mg/kg, and TIAq at 25 mg/kg, were able to significantly counteract the effect of KET on sociability, marked as sniffs (\*  $p < 0.05$ ). While TIMet does not modify that parameter compared to the group with VEH-Tween. The coumarins DF and HN induced a similar behavior and were able to increase the number of sniffs in comparison with the VEH-Tween group (\*  $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Effect of *T. lucida* extracts, herniarin (HN), and dimethylfraxetin (DF) on acute schizophrenia-like symptoms induced with KET 50 mg/kg in the Social Interaction Test (SIT) in mice. Data show mean  $\pm$  S.E.M. of 5 animals \*  $p < 0.05$  indicates statistically significant differences using an ANOVA followed by Dunnett's Test compared with the VEH-Tween group.

### 3. Discussion

Pharmacological potential for the possible management of psychotic-like symptoms. This plant has reports of ethnomedical uses and pharmacological activities in animal models, which are related to diseases of the central nervous system [15,16,25]

The results indicate that extracts and compounds from this medicinal plant can modify behavioral responses induced with HAL, a non-selective agonist of dopaminergic D2 receptors, and with KET, a glutamatergic antagonist. Both neurotransmission systems are involved in psychotic symptoms, such as positive-negative-cognitive ones.

These psychotic behaviors share similar symptomatologic characteristics with diseases of cultural order, such as "madness" (dementia), which is reported as a set of traumatic symptoms that originate from a strong and sudden impression, which can threaten the physical and emotional integrity of the patient, who manifests sadness, nervousness, inability to communicate, with undesirable behaviors such as yelling, whistling, singing and muttering incoherencies, which lead to social rejection, forcing the individual to wander and sleep anywhere. In addition, it is mentioned that some types of "madness" cause the patient to present aggressive and hallucinatory states [10].

*T. lucida*, with the reports of the antidepressant, anxiolytic, and sedative effects in mice [16,26], is the basis of the present investigation, whose aim was to evaluate the possible antipsychotic effect of this plant. The first treatment for psychosis is the prescription of typical antipsychotics, whose mechanism of action focuses on antagonizing dopaminergic transmission mainly through D2 receptors. Furthermore, although they are effective in reducing the positive symptoms, it is also true that they do not counteract the negative and cognitive ones, and they also cause extrapyramidal effects. The first treatment for psychosis is the prescription of typical antipsychotics, whose mechanism of action antagonizes dopaminergic transmission mainly through D2 receptors. Moreover, although they are effective in reducing the positive symptoms, it is also true that they do not counteract the negative and/or cognitive ones, and they also cause extrapyramidal effects [27]. The cataleptic effect of HAL was used to define whether *T. lucida* interacts with the dopaminergic system by enhancing such activity. The decrement of DA transmission at postsynaptic D2

receptors has been implicated in catalepsy produced by antipsychotic drugs. Disrupting DA transmission with low doses of a D2 receptor-preferring antagonist such as haloperidol [28]. This drug is a potent and representative antipsychotic substance with a high affinity for dopaminergic D2 receptors. It is widely used in the laboratory to induce extrapyramidal effects in rodents, including stiffness, and particularly cataleptic effects that are mediated by the blockade of D2 receptors of the striatum. Catalepsy is evaluated when animals are placed on a raised bar on their front legs, and the time to the first movement is measured [29]. While the drug used as a control, caffeine, is an adenosine A2 receptor agonist which modulates the dopaminergic pathway blocking the catalepsy produced by HAL [30].

The extracts and compounds of *T. lucida* exert effects that can be classified as bi-phasic. In the VEH-Tween group, it was observed that catalepsy (considered as such when the forced and immobile posture of the mouse lasts more than 20 s) begins at time 60 and extends even at time 90. TIEA at 50 mg/kg potentiates catalepsy, but only in time 30 because after that, there are no changes compared with the VEH-Tween. However, in a 25 mg/kg dose, this variable is blocked similarly to caffeine.

While treatment with TIAq (25 mg/kg) enhances it throughout the time course and up to 120 min, the effect starts from time 30; but again, a higher dose of this antagonized HAL. For the less polar extract, TIHex, none of the doses can enhance the cataleptic effect of the dopaminergic drug; beyond that, the 25 mg/kg dose blocks it, an action that decreases at a higher dose. Based on this behavior, which could be dose-dependent, it is then likely that catalepsy could be observed above 50 mg/kg. Something similar happens with TIMet, in which both doses block catalepsy, with a slight tendency for the high dose to have a lower capacity.

It is known that this plant has a significant secondary metabolism for the production of coumarins, which are widely described for this species. Coumarins are derivatives of 2H-1-benzopyran-2-one, widely distributed in nature; they are essential for their actions on different pharmacological systems since they have diverse activities, among which CNS disease models stand out. It is proposed that both natural and synthetic coumarins can be used to treat neurologic and neurodegenerative diseases. Such as Alzheimer's and Parkinson's disease, schizophrenia, epilepsy, nootropics, anxiolytics, or antidepressants, because they act on the neurotransmission systems involved in these diseases and are excellent anti-inflammatories [31]. In the present work and based on the results described by the research group [13], the isolation of DF and HN was achieved; they were evaluated at two different doses to investigate whether the effects of the extracts could fall on these substances.

For the catalepsy test, it was observed that DF at a dose of 1 mg/kg has the most significant potentiation effect on HAL, causing catalepsy. This effect appears from time 30, with a longer duration that lasts until time 120. At the same time, the 5 mg/kg dose has a lower activity level since the readings at times 60 and 90 are similar to the VEH group. Although catalepsy (considered for duration above 20 s) is no longer observed, the forced posture on the bar is longer than the VEH. The administration of herniarin provoked a biphasic effect; a low dose of 1 mg/kg is capable of potentiating HAL, increasing the onset, intensity, and time of catalepsy; but when the dose that is administered is 5 mg/kg, this coumarin now does completely block catalepsy, as caffeine does.

The difference between the effects caused by both coumarins may be based on small structural changes. For example, it can be seen that 1 mg/kg of the two coumarins potentiated the cataleptic effect of HAL. However, DF that is tri-methoxylated in positions 6, 7, and 8 exerts a more significant effect with a longer duration. When the dose was 5 mg/kg, a blockade of this activity was observed for herniarin, which has a methoxyl group in position 7. While the more complex structure (dimethylfraxetin) no longer presents a statistical difference with the VEH group throughout the time course and up to minute 90, the mice remain motionless on the bar longer. It is then observed that, at higher doses, the enhancing effect of catalepsy is lost and that the greater the chemical structure of coumarin, the behavior observed is lower.

With these considerations, we propose that extracts and coumarins of *T. lucida*, can interact with the receptors type D2 on which the HAL does so. That pharmacological association depends on the dose and chemical structure. Furthermore, although there are no reports in the literature of the effects of dimethylfraxetin (with three methoxyl groups in the coumarin structure at positions 6, 7, and 8) and herniarin (containing in its base structure a methoxy group at position 7) on the dopaminergic system, it is mentioned that other compounds of the same family modify this neurotransmission system. For example, scoparone, which has in its basic structure two methoxyl groups in positions 6 and 7, and that is also isolated from *T. lucida*, and whose anti-inflammatory activity has been described [13], is capable of inducing dopamine synthesis in PC12 cell cultures, as well as protecting them from L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-induced cytotoxicity [32].

Isosibiricin is coumarin, which has a keto group in position 8 of its structure instead of a methoxy, and which was isolated from the species *Murraya exotica* (Rutaceae). It increases the expression of dopaminergic D1/2 receptors in BV-2 microglia cell culture when stimulated with LPS through signaling mediated by NLRP3/caspase-1. Therefore, this coumarin is proposed as a modulator of the immune response mediated by dopaminergic receptors in the central nervous system [33]. Then herniarin and dimethylfraxetin, whose chemical structure is similar to those mentioned above, can interact with the dopaminergic system by modulating the HAL actions. In addition, the possibility that these coumarins may have a role in regulating other neurotransmission systems associated with psychoses is not ruled out.

Therefore, the next phase of the experiment consisted of evaluating the probable interaction of the products of this plant on the glutamatergic system. Since it has been demonstrated, for many years, that the classic theory of psychosis, based on dopamine, is only part of the constellation of neuronal intercommunication that leads to the triad of symptoms. The glutamate theory plays a fundamental role, specifically in the hypoactivity of the N-methyl-D-aspartate (rNMDA) receptor in the prefrontal cortex, which can cause psychosis [34]. So, to evaluate the antipsychotic effect of *T. lucida* and its possible interaction with rNMDA, KET was selected, a drug that acts mainly as an uncompetitive antagonist use-dependent of these receptors, among other targets on the central nervous system (CNS). It is valuable as a pharmacological tool to have an approach to the mode of action of treatments for schizophrenia. KET, widely used in psychiatry, has psychomimetic effects in humans and increases psychotic symptoms, such as dissociative states, altered perception, and schizophrenia-like positive and negative symptoms, in hospitalized patients [35]. This drug is used in many biological models, under different administration schemes, to reproduce some psychotic behaviors in rodents and mainly to identify possible treatments. The variability of pharmacological activities and even undesirable side effects that ketamine induces depend on factors such as the strain and species of rodent, the dose, the route of administration, and the dosage timing [36]. In the present work, and based Santillán-Urquiza et al. [37], the intraperitoneal route of administration was used in the scheme of a single dose of 50 mg/kg, which caused different behaviors in mice.

A passive avoidance test (PAT) was used to assess fear memory; this test is a valuable tool in searching for medication options for psychosis, especially in controlling cognitive symptoms. The present research observed that the administration of KET at 50 mg/kg causes cognitive deterioration in mice. This action was counteracted by N-methyl-D-aspartate and by extracts TIHex, TIEA, TIAq, herniarin, and dimethylfraxetin, isolated from *T. lucida*.

To measure the effectiveness of the treatments of this medicinal species on the negative symptoms of schizophrenia, the forced swimming test (FST) was widely used to evaluate the efficacy of synthetic drugs of natural origin. In this test, what is evaluated is the learned hopelessness; the animals tend to escape from the water, and thus the time of immobility is a behavioral marker of depression. The results here showed that KET decreases the immobility time of mice in the water cylinder, indicating an antidepressant effect of the drug, which is widely described. It was observed that the co-administration of treatments



from *T. lucida* with KET does not modify its response, noting that TIMet diminished the effect of KET no-significantly, and only its antagonist, NMDA, was able to block the antidepressant effect.

The non-sociality of animals is used as a model to analyze possible pharmacological treatments to reduce unique negative symptoms in humans, so the FST and social interaction test (three-chamber social test) are helpful. This last trial focuses on the degree of familiarity between two individuals, and it has been observed that KET causes a decrease in the social interaction of rodents [38]. In this series of trials, which made it possible to measure cognitive deficit and negative symptoms, it was observed that the methanolic extract behaves differently from the other treatments derived from *T. lucida*, as it does not cause significant changes compared with the Veh-Tween group.

TIEA and TIAq, TIHex, interacted with KET in the memory and social interaction tests because they blocked this glutamatergic drug's effect on the animals' behavior in both tests. However, in the FST test, none of these treatments cause changes when compared with KET (Veh-Tween). These results indicate that *T. lucida*, in addition to interacting with the dopaminergic system, also exerts pharmacological effects on glutamate. By improving the condition of experimental psychosis, reducing memory deficits, and increasing social interaction. These actions may be attributable to their coumarin content; in this sense, herniarin, isolated from TIAq, and dimethylfraxetin, from TIEA, had similar pharmacological behavior to the extracts from which they were obtained.

*T. lucida* also decreases hyperlocomotion and stereotyped behaviors observed in the OFT. Events that are attributed to the antagonism of NMDA receptors in mesolimbic GABAergic neurons, causing an increase in the excitability of these cells, and together with the ability of this substance to behave as a dopaminergic receptor agonist, it is an accessible model for the evaluation [39]. In the present work, it was possible to observe that the NMDA drug can block all these psychotic behaviors in mice. Furthermore, TIEA and TIAq extracts had the best effect since they block all the psychotic behaviors measured in the OFT (hyperlocomotion, the increase in rearings and groomings, time the mice spent grooming, the presence of stereotyped behaviors, and the time it took for them). Dimethylfraxetin and herniarin eliminate stereotypes and reduce the number of other behaviors.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant and Preparation of the Extracts

The aerial parts of *Tagetes lucida* Cav., were collected in 2018 in Xochitepec, Morelos, México. Margarita Aviles and Macrina Fuentes performed taxonomic identification. A voucher sample specimen was deposited at the Herbarium of the Instituto Nacional de Antropología e Historia Morelos (INAHM) and placed in the Medicinal Botanical Garden in Cuernavaca, Morelos, Mexico, with the code number INAHM-2086. The material was dried under dark conditions in a room-temperature ventilated place for two weeks. Afterward, to obtain particles 4–6 mm in size, the plant material was grounded in an electric grinder mill. The grounded material (4 kg) was placed in a glass flask for its first extraction with n-hexane for 24 h, and this procedure was carried out in triplicate. Then, the liquid extract was filtered and concentrated by distillation under reduced pressure in a rotary evaporator at 40 °C to obtain the hexane extract (TIHex). The residual plant material, once dry, was placed in a flask and was carried out in the same process to obtain the ethyl acetate (TIEA), methanol (TIMet), and aqueous (TIAq) extracts.

### 4.2. Isolation and Identification of Dimethylfraxetin (DF) and Herniarin (HN)

After the biological evaluation, extracts with the highest bioactivity were submitted to a chemical separation procedure for obtaining active compounds. TIEA and TIAq extracts were fractionated by open-column chromatography and carried out with successive columns of normal phase and reverse phase.

The TIEA extract (20 g) was separated following the described methodology by Porrás Davila et al. [40] to obtain a fraction containing the dimethylfraxetin coumarin (DF). TIAq

extract (277 g) was separated by chromatography in a column according to what is described to give herniarin (HN) [40].

The isolated compounds were selected for further evaluation in the biological model, identified as HN and DF, using HPLC (Waters, Milford, MA, USA) [13].

#### 4.3. HPLC Analysis

The qualitative and quantitative analyses of dimethylfraxetin and herniarin were performed using an Alliance 2695 separation module system (Waters, Milford, MA, USA) coupled with a Spectral System UV2996 PDA detector. Chromatographic separation was carried out using a Supelcosil™ LC-F column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). The mobile phase consisted of two solvent reservoirs: A (Trifluoroacetic acid–water, 0.5%, *v/v*) and B (acetonitrile). The gradient system was as follows: 0–1 min, 100–0% B; 2–3 min, 95–5% B; 4–20 min, 70–30% B; 21–23 min, 50–50%, 24–25 min, 20–80% B, 26–27 min, 0–100% B and 28–30 min 100–0% B. The flow rate was 0.9 mL·min<sup>-1</sup> with an injection volume of 10 μL. The photodiode array detector wavelength was set at 325 and 280 nm to identify and quantify DF and HN, respectively. Calibration curves for these compounds were prepared by injecting ascendant concentrations of previously isolated compounds (Herniarin-HN-: 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μg·mL<sup>-1</sup>; dimethylfraxetin-DF-: 40, 20, 10, 5, 2.5 and 1.75 μg·mL<sup>-1</sup>). Analytical parameters of linearity, limit of detection and limit of quantification were measured dimethylfraxetin ( $y = 23493x + 382.5$ , R<sup>2</sup> = 0.9995). for herniarin ( $y = 1575x - 86$ , R<sup>2</sup> = 0.9971).

#### 4.4. Treatments

The compounds, extracts, and substances utilized here, were administered orally (per os, p.o.) or intraperitoneally (i.p.) and included the following: TIHex, TIEA, TIMet, and TIAq extracts (25 and 50 mg/kg, p.o.); dimethylfraxetin, and herniarin (DF, HN 1 and 5 mg/kg, p.o.); haloperidol (HAL as catalepsy inducer 0.5 mg/kg, i.p.); caffeine (CAF, used as a positive control, to block catalepsy, 15 mg/kg, p.o.); vehicle (VEH, Tween 20, 1%, negative control, p.o.); ketamine (KET, schizophrenia-like symptoms inducer, 50 mg/kg, i.p.), and N-methyl-D-aspartate (NMDA, used as antagonist of KET, 50 mg/kg, i.p.). All drugs were purchased from Sigma-Aldrich, Co (St. Louis, MI, USA).

#### 4.5. Animals

Experiments were performed on male ICR mice weighing between 30 and 35 g under controlled conditions in a light/dark cycle (12/12 h), at a temperature of 20 ± 2 °C, with free access to a special diet for rodents (Labdiet) and purified water. Prior to the test, animals were randomly divided into groups of 5. The research was conducted following the internationally accepted principles for laboratory animal use and care found in the National Institutes of Health (NIH) guidelines. The assays were developed in a soundproofed room with a video recording system; the experimenter avoided using a scent and remained silent. The experiments were performed according to official Mexican Norm 062-ZOO-1999 (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals) and the international ethical guidelines for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was authorized by the local Health Research Committee [Mexican Institute of Social Security IMSS], with approval number: F-2019-1702-005.

#### 4.6. Pharmacologic Tests

##### 4.6.1. Haloperidol-Induced Catalepsy

Catalepsy is observed when animals are placed in abnormal or unusual postures and maintain these postures for some time. For example, a typical animal will correct its position within seconds and explore its environment, but a cataleptic animal will maintain this externally imposed posture for a prolonged period.

Before catalepsy induction, mice were fasted for 1 h before the test and then administered the treatments derived from *T. lucida*. After 2 h, all groups received HAL, 0.5 mg/kg,



i.p., and 10 minutes later, the test was started, and the cataleptic effect was evaluated at different time points (10, 30, 60, 90, 120, and 150 min). To measure the catalepsy, we employed the bar test (BT). The mice were placed for 1 min on a round glass bar (0.8 mm diameter) sustained by two wooden supports at a height of 4 cm and separated from 2.5-high horizontal support situated 2 cm from the middle portion of the glass bar. A positive response of catalepsy was considered when the mouse remained in a rigid position for 20 s or longer [37]. CAF (15 mg/kg, i.p.) was used as a standard drug in the catalepsy test. Therefore, it is expected that both the extracts and the isolated compounds can act potentiating the effects of haloperidol (cataleptic state), acting in this way through dopaminergic specifically via D2 receptors and not through A2 receptors as does the positive control group caffeine, considering that both heteroreceptors in a regulated manner diminish the excess of dopamine.

#### 4.6.2. Ketamine-Induced Psychosis

In order to study symptoms related to psychosis, mice were administered KET, which is an rNMDA antagonist. The study design lasted three days; on the first day, all treatments were administered; 24 h later, KET (50 mg/kg, i.p.) and treatments were administered, lastly, on the third-day test was carried out, and treatments were administered for the third occasion 1 h before that started the test, all treatments (*T. lucida* derivatives) and NMDA were administered as described above. On test day, different behavioral tests were used, as described below.

#### 4.6.3. Passive Avoidance Test (PAT)

This unidirectional assay allowed us to study acquired learning and memory. The animal was conditioned with an aversive stimulus, which is later evaluated if the mouse remembers the experience. The assay consisted of placing the mouse in the lighted compartment, allowing it to explore for 1 min, and permitting it to direct itself to the dark compartment (typically, the mouse spontaneously tends to move into dark spaces, in that direct light produces anxiety in it). The time the mouse delays getting into the dark compartment (Initial Latency, IL) is measured; once the mouse is inside, the door is closed, and the mouse receives an electric discharge (0.6 mA, during 2 s). After application of the discharge, the mouse is returned to its cage until the time of evaluation, which was carried out 24 h later to evaluate long-term memory. On the test day, the animals were placed in the lighted camera, and the door that separates the two compartments stayed open. The electric discharge is not applied at this stage, the mouse is observed for 8 min, and the time is measured that the mouse delays in entering the dark compartment; Retention Latency (RL) is an indicator of memory [37].

#### 4.6.4. Forced Swimming Test (FST)

FST is a widely used model to evaluate the antidepressant effect, which is a characteristic symptom of schizophrenia induced by KET (Takeda et al., 2002) [41]. In this test, a previous training session that consisted of placing the mice individually for 15 min in a glass recipient with water, with a depth of 15 cm, at a temperature of  $25 \pm 2$  °C, was carried out. To ascertain whether the mouse identified that there was no way for it to escape. Then, mice were placed in the glass recipient containing water for 5 min. Total immobility time was measured for each mouse [37].

#### 4.6.5. Open Field Test (OFT)

This test is used to measure the positive symptoms of schizophrenia. In this model, the reactions of rodents are observed in an environment without escape (Walsh and Cummins, 1976) [42]. It is currently used to study motor activity and allows us to analyze the excitatory or depressive effect of the locomotor system. Mice were placed on the OFT platform, and their behavior was videotaped by a digital camera fixed above the field. The observation was maintained for 30 min, and we measured the following parameters of locomotion

as Total Crossings (TC); Rearing (R); Stereotyped Behaviors (SB), which are repetitive, involuntary movements with no apparent purpose, such as head-spinning, Time Spend on Stereotyped Behaviors (TSB); Grooming (G), and Time Spend on Grooming (TSG) [37].

#### 4.6.6. Social Interaction Test (SIT)

This test focuses on the degree of familiarity of two individuals, allowing us to observe rodents' behavior on negative and cognitive symptoms of schizophrenia. It consists of a compartment divided into three spaces, 2 of which on the sides contain circular chambers. The test begins with habituation, placing the mouse in the main cage for 10 minutes to become familiar with the environment and leaving the circular chamber empty. Subsequently, in one of the compartments of the circular chamber, a mouse is placed that we will call "family" since it was previously in contact for five minutes with the experimental mouse. A new mouse is placed in the other compartment, which has never been exposed to the experimental mouse. The experience is performed four times in five-minute sessions. First, the animal is confronted with a familiar mouse, and during these sessions, the mouse gets used to this exposure and varies its social investigation (habituation). In the fourth exposure, the camera is rotated, and the new mouse is shown (dishabituation). The exploration time of the fourth day is recorded, defined as the time that the animal spends approaching or sniffing the mating window. Mice with unimpaired cognitive function will spend more time sniffing the new mouse than the familiar one; those with a cognitive deficit will not distinguish between the familiar mouse and the new one (their exploration time will be similar) [29].

#### 4.7. Statistical Analysis

The data were expressed as the means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.), and statistical significance was determined using an analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test compared with the tween group (Vehicle, Veh-Tween). Values considered significant at  $p < 0.05$  was employed to define significant differences among the groups. SPSS version number 11.0 (IBM SPSS, New York, NY, USA) software was used for graphing and statistical analysis.

### 5. Conclusions

The pharmacological activity of *Tagetes lucida* extracts can be attributed in part to the presence of coumarin-type compounds, such as HN and DF, which have activity as potentiators of catalepsy and blockers of psychotic observed behaviors, indicating that the plant and some of its components are capable of interacting with the dopaminergic and glutamatergic systems, both important mechanisms involved in psychosis and they can be attributed to this type of compounds as responsible for the activity of *Tagetes lucida* extracts. These coumarins behave pharmacologically similar to the extracts, so they have attributed activity. It is shown for the first time that *T. lucida* interacts with the dopaminergic and glutamatergic systems, both important mechanisms involved in psychosis.

**Author Contributions:** M.H.-R., S.L.P.-D. and E.J.-F. conceived and designed the experiments; S.L.P.-D., M.H.-R. and R.R.R. analyzed the biological data; M.H.-R., S.L.P.-D. and J.C.A.-P. investigation; M.G.-C. and S.L.P.-D. performed the chemical experiments; M.H.-R., E.J.-F., R.R.R. and S.L.P.-D. writing—review and editing; M.H.-R., R.R.R. and J.C.A.-P. project administration; M.H.-R. and E.J.-F. funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research had financial support provided by Fondo de Investigación en Salud (FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/108) of the Mexican Institute of Social Security. With a project registration number R-2019-1702-005.

**Institutional Review Board Statement:** The ethics and research committee of the Mexican Institute of Social Security-Mexico approved the research protocol and assigned the registration number R-2019-1702-005, which was resubmitted and reapproved on 30 March 2022.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** S.L.P.-D. is grateful for the fellowship from CONACyT (735062) for their PhD studies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. WHO | World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/es/news/item/17-06-2022-who-highlights-urgent-need-to-transform-mental-health-and-mental-health-care> (accessed on 10 August 2022).
2. Aznar, J.A.; Balanza, P.; Castillo, M.D.; Martín, J.; Martínez, I.; Moreno, J.; Puljante, M.L.; Salmerón, J.M.; San Llorente, C.; Sánchez, R.; et al. *Guía Práctica Clínica Para El Tratamiento de La Esquizofrenia En Centros de Salud Mental*; García-Sancho, J.C.M., Ed.; Subdirección de Salud Mental: Murcia, Spain, 2009; ISBN 11342072.
3. Gejman, P.V.; Sanders, A.R. La Etiología de La Esquizofrenia. *Medicina* **2012**, *72*, 227–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Paz, R.; Psiquiátrico, I.; José, H.; Barak, C. Modelos Fisiopatológicos de La Esquizofrenia; de Dopamina a Glutamato, de Glutamato a GABA Pathophysiological Models of Schizophrenia; from Dopamine to Glutamate, and Glutamate to GABA. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiat.* **2005**, *43*, 314–328. [[CrossRef](#)]
5. Callado, L.F.; Ortega, J.E.; Horrillo, I. Bases Neurobiológicas de La Depression. *Salud Cienc.* **2009**, *16*, 835–838. [[CrossRef](#)]
6. Lahera, G.; Freund, N.; Sáiz-Ruiz, J. Asignación de Relevancia (Salience) y Desregulación Del Sistema Dopaminérgico. *Rev. Psiquiatr. Salud Ment.* **2013**, *6*, 45–51. [[CrossRef](#)]
7. Bermejo, J.C.; Rodicio, S.G. The Treatment of Psychopathic and Antisocial Personality Disorders: A Review. *Int. Rev. Psychiatry* **2007**, *22*, 1–33. [[CrossRef](#)]
8. Leo, R.J.; Del Regno, P. Atypical Antipsychotic Use in the Treatment of Psychosis in Primary Care. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* **2000**, *2*, 194–204. [[CrossRef](#)]
9. UNAM Biblioteca Digital de La Medicina Tradicional Mexicana. Available online: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> (accessed on 15 September 2022).
10. Argueta, A.; Gallardo, V.M.C. *Atlas de Las Plantas de La Medicina Tradicional Mexicana*; Indigenista, I.N., Ed.; Ilustrada: Mexico City, Mexico, 1994; ISBN 9682961351.
11. Xu, L.; Chen, J.; Qi, H.; Shi, Y. Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes L.* *Chinese Herb. Med.* **2012**, *4*, 103–117. [[CrossRef](#)]
12. Aquino, R.; Cáceres, A.; Morelli, S.; Rastrelli, L. An Extract of *Tagetes Lucida* and Its Phenolic Constituents as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1773–1776. [[CrossRef](#)]
13. Monterrosas Brisson, N.; Herrera Ruiz, M.; Jiménez, F.; Enrique Bahena Pérez, R.; Avilés Flores, M.; Fuentes Mata, M.; Martínez Duncker, I.; González-cortazar, M. Anti-Inflammatory Activity of Coumarins Isolated from *Tagetes Lucida* Cav. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *34*, 3244–3248. [[CrossRef](#)]
14. El-Newary, S.A.; Ismail, R.F.; Shaffie, N.M.; Hendawy, S.F.; Omer, E.; Ahmed, M.M.; ElSayed, W.M. Hepatoprotective Effects of *Tagetes Lucida* Root Extract in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Wistar Albino Rats through Amelioration of Oxidative Stress. *Pharm. Biol.* **2021**, *59*, 986–997. [[CrossRef](#)]
15. Bonilla-Jaime, H.; Guadarrama-Cruz, G.; Alarcon-Aguilar, F.J.; Limón-Morales, O.; Vazquez-Palacios, G. Antidepressant-like Activity of *Tagetes Lucida* Cav. Is Mediated by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> Receptors. *J. Nat. Med.* **2015**, *69*, 463–470. [[CrossRef](#)]
16. Pérez-Ortega, G.; González-Trujano, M.E.; Ángeles-López, G.E.; Brindis, F.; Vibrans, H.; Reyes-Chilpa, R. *Tagetes Lucida* Cav.: Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology of Its Tranquilizing Properties. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *181*, 221–228. [[CrossRef](#)]
17. Brenda, M.; Diaz, S. *Evaluación de La Toxicidad Subaguda de Las Partes Aéreas de Tagetes Lucida [Pericón] y Hojas de Sansevieria Guineensis [Curarina]*; Universidad de San Carlos Guatemala: Antigua, Guatemala, 1998.
18. Guadarrama Cruz, G.; Aguilar, J.; Alarcón, F.; Vega Avila, E.; Vázquez Palacios, G.; Bonilla Jaime, H. Antidepressant-like Effect of *Tagetes Lucida* Cav. Extract in Rats: Involvement of the Serotonergic System. *Am. J. Chin. Med.* **2012**, *40*, 753–768. [[CrossRef](#)]
19. Paulsen, E.; Otkjær, A.; Andersen, K.E. The Coumarin Herniarin as a Sensitizer in German Chamomile [*Chamomilla Recutita* (L.) Rauschert, Compositae]. *Contact Dermatitis* **2010**, *62*, 338–342. [[CrossRef](#)]
20. Rezaee, R.; Behravan, E.; Behravan, J.; Soltani, F.; Naderi, Y.; Emami, B.; Iranshahi, M. Antigenotoxic Activities of the Natural Dietary Coumarins Umbelliferone, Herniarin and 7-Isopentenylxy Coumarin on Human Lymphocytes Exposed to Oxidative Stress. *Drug Chem. Toxicol.* **2014**, *0545*, 144–148. [[CrossRef](#)]
21. Bose, P.; Pattanayak, S.P. Herniarin, a Natural Coumarin, Inhibits Mammary Carcinogenesis by Modulating Liver X Receptor- $\alpha$ / $\beta$ -PI3K-Akt-Maf1 Pathway in Sprague—Dawley Rats. *Pharmacogn. Mag.* **2019**, *15*, 10–19. [[CrossRef](#)]
22. Nazari Perchestani, Z.; Rafieirad, M. The Effect of Herniarin on Anxiety behaviors and Depression Following chronic Cerebral Ischemia hypoperfusion in Male Rats. *Exp. Anim. Biol.* **2021**, *9*, 93–103. [[CrossRef](#)]
23. Nazari Barchestani, Z.; Rafieirad, M. The Effect of Herniarin on Spatial Working Memory, Pain Threshold, and Oxidative Stress in Ischemic Hypoperfusion Model in Rats. *Casp. J. Neurol. Sci.* **2021**, *7*, 42–50. [[CrossRef](#)]
24. Salehi, B.; Azzini, E.; Zucca, P.; Varoni, E.M.; Kumar, N.V.A.; Dini, L.; Panzarini, E.; Rajkovic, J.; Fokou, P.V.T.; Peluso, I.; et al. Plant-Derived Bioactives and Oxidative Stress-Related Disorders: A Key Trend towards Healthy Aging and Longevity Promotion. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 947. [[CrossRef](#)]

25. Mata-Pinzón, S.; Pérez-Ortega, G.; Reyes-Chilpa, R.; Hobompich, I.; Roo, Q. Plantas Medicinales Para El Tratamiento Del Susto Y Mal De Ojo. Análisis De Sus Posibles Efectos Sobre El Sistema Nervioso Central Por Vía Transdérmica E Inhalatoria. *Rev. Etnobiología* **2018**, *16*, 30–47.
26. Guadarrama-Cruz, G.; Alarcon-Aguilar, F.J.; Lezama-Velasco, R.; Vazquez-Palacios, G.; Bonilla-Jaime, H. Antidepressant-like Effects of *Tagetes Lucida* Cav. in the Forced Swimming Test. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 277–281. [[CrossRef](#)]
27. Marder, S.R.; Wirshing, W.C.; Van Putten, T. Drug Treatment of Schizophrenia. Overview of Recent Research. *Schizophr. Res.* **1991**, *4*, 81–90. [[CrossRef](#)]
28. Banasikowski, T.J.; Beninger, R.J. Haloperidol Conditioned Catalepsy in Rats: A Possible Role for D 1-like Receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2012**, *15*, 1525–1534. [[CrossRef](#)]
29. Santillán-urquiza, M.A.; Herrera-ruiz, M.; Zamilpa, A.; Jiménez-ferrer, E.; Román-ramos, R.; Alegr, E.Y.; Tortoriello, J. Galphimia Glauca and Natural Galphimines Block Schizophrenia-Like Symptoms Induced with Apomorphine and MK-801 in Mice. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 8404258. [[CrossRef](#)]
30. Góngora Alfaro, J.L. La Cafeína Como Un Fármaco Preventivo de La Enfermedad de Parkinson: Evidencias Epidemiológicas y Sustrato Experimental. *Rev. Neurol.* **2010**, *50*, 221. [[CrossRef](#)]
31. Skalicka-Woźniak, K.; Orhan, I.E.; Cordell, G.A.; Nabavi, S.M.; Budzyńska, B. Implication of Coumarins towards Central Nervous System Disorders. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 188–203. [[CrossRef](#)]
32. Yang, Y.J.; Lee, H.J.; Huang, H.S.; Lee, B.K.; Choi, H.S.; Lim, S.C.; Lee, C.K.; Lee, M.K. Effects of Scoparone on Dopamine Biosynthesis and L-DOPA-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 1929–1937. [[CrossRef](#)]
33. Wang, Y.H.; Lv, H.N.; Cui, Q.H.; Tu, P.F.; Jiang, Y.; Zeng, K. wu Isosibiricin Inhibits Microglial Activation by Targeting the Dopamine D1/D2 Receptor-Dependent NLRP3/Caspase-1 Inflammasome Pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 173–180. [[CrossRef](#)]
34. Snyder, M.A.; Gao, W.J. NMDA Receptor Hypofunction for Schizophrenia Revisited: Perspectives from Epigenetic Mechanisms. *Schizophr. Res.* **2020**, *217*, 60–70. [[CrossRef](#)]
35. Corlett, P.R.; Honey, G.D.; Fletcher, P.C. From Prediction Error to Psychosis: Ketamine as a Pharmacological Model of Delusions. *J. Psychopharmacol.* **2007**, *21*, 238–252. [[CrossRef](#)]
36. Choi, K.H.; Berman, R.Y.; Zhang, M.; Spencer, H.F.; Radford, K.D. Effects of Ketamine on Rodent Fear Memory. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Santillán-Urquiza, M.A.; Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; Jiménez-Ferrer, E.; Román-Ramos, R.; Tortoriello, J. Pharmacological Interaction of Galphimia Glauca Extract and Natural Galphimines with Ketamine and Haloperidol on Different Behavioral Tests. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 879–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ellenbroek, B.A.; Cools, A.R. Animal Models for the Negative Symptoms of Schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* **2000**, *11*, 223–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Irifune, M.; Shimizu, T.; Nomoto, M. Ketamine-Induced Hyperlocomotion Associated with Alteration of Presynaptic Components of Dopamine Neurons in the Nucleus Accumbens of Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1991**, *40*, 399–407. [[CrossRef](#)]
40. Porras Dávila, S.L.; González Cortazar, M.; Jiménez Ferrer, E.; Román Ramos, R.; Bello Peralta, C.; Martínez Hernández, B.G.; Zamilpa, A.; Herrera Ruiz, M. Isolation, Chemical Characterization, and Anti-Inflammatory Activity of Coumarins, Flavonoids, and Terpenes from *Tagetes Lucida*. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36*, 4751–4756. [[CrossRef](#)]
41. Takeda, H.; Tsuji, M.; Inazu, M.; Egashira, T.; Matsumiya, T. Rosmarinic Acid and Caffeic Acid Produce Antidepressive-like Effect in the Forced Swimming Test in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *449*, 261–267. [[CrossRef](#)]
42. Walsh, R.N.; Cummins, R.A. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychol. Bull.* **1976**, *83*, 482–504. [[CrossRef](#)]





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00135

Matrícula: 2191800096

Efecto de Tagetes lucida Cav sobre parámetros asociados con la esquizofrenia experimental en diferentes modelos de psicosis en ratón.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 31 del mes de enero del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
- DRA. HERLINDA BONILLA JAIME
- DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER
- DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR
- DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: SANDRA LILIANA PORRAS DAVILA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Sandra L. Porrás D.*

SANDRA LILIANA PORRAS DAVILA  
ALUMNA

**APROBAR**

REVISÓ

MTRA. ROSALVA CERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL

DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER

VOCAL

DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR

SECRETARIA

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ