



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

TESIS

**EFFECTO DE UN MICROENCAPSULADO DE JUGO
DE GRANADA (*Punica granatum* L.) SOBRE LA
CONDUCTA TIPO ANSIEDAD EN UN MODELO
ANIMAL DE RESPUESTA INCONDICIONADA**

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

PRESENTA

LE Tania Flores Bazán

Directora

Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez

Codirector

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Comité tutorial

Dr. Marco Antonio Becerril Flores

Dra. Claudia Velázquez González

Dra. Rebeca María Elena Guzmán Saldaña

Pachuca de Soto, Hgo., México., septiembre 2023



07/09/2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulada **"Efecto de un microencapsulado de jugo de granada (*Punica granatum L.*) sobre la conducta tipo ansiedad en un modelo animal de respuesta incondicionada"**, realizado por la sustentante **Tania Flores Bazán** con número de cuenta 467888 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

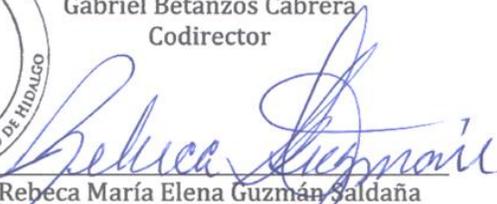
Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

"Amor, Orden y Progreso"

Pachuca, Hidalgo a 07 de septiembre de 2023

El Comité Tutorial

 Diana Patricia Olivo Ramírez Director		 Gabriel Betanzos Cabrera Codirector
 Claudia Velázquez González Miembro del comité		 Rebeca María Elena Guzmán Saldaña Miembro del comité
 Marco Antonio Becerril Flores Miembro del comité		

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo.
México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308.2361,4346,4310
medicina@uaeh.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), número de beca: 797865 y número de CVU: 1146771.

Al Dr. Héctor Hernández Domínguez, director del bioterio, quien me acondicionó un área especial para poder llevar a cabo el experimento, por sus enseñanzas, por su paciencia y el tiempo dedicado.

A la Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez por dirigir este proyecto y proporcionarme su apoyo, comprensión y cariño durante los años de maestría.

Al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por brindarme su apoyo, conocimientos y paciencia en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Claudia Velázquez González por hacerme observaciones puntuales y brindarme apoyo para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Rebeca María Elena Guzmán Saldaña por todo el apoyo brindado durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Marco Antonio Becerril Flores por brindarme conocimiento y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

DEDICATORIA

A Damián Guerrero Flores, eres mi más grande inspiración y cada uno de mis logros van dedicados a ti porque aguantaste las veces en que tuve que ausentarme y dedicarle tiempo a este posgrado. Te amo, por siempre.

A José Antonio, eres mi guía, mi apoyo, mi amor incondicional, le das luz a mi vida, gracias por la paciencia y todo el amor que me tienes, gracias por el esfuerzo de acompañarme en cada momento importante.

A mis padres y hermano por ayudarme cuando no tenía a quien acudir, por su apoyo moral y por motivarme a salir adelante frente a la adversidad.

A mis amigos: Sarahí y Álvaro por escucharme en los momentos de mayor angustia, por demostrarme su cariño y por apoyarme a cuidar de mi hijo cuando fue el proceso de redacción de esta tesis.

A la vida por permitirme cumplir un logro más, por darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Áreas cerebrales implicadas en la ansiedad	15
Figura 2: Funcionamiento del eje HPA	18
Figura 3: Ilustración esquemática de la vía dopaminérgica, mesolímbica y mesocortical	21
Figura 4: Representación esquemática del receptor GABA _A	23
Figura 5: Prueba OFT	61
Figura 6: Prueba EPM	62
Figura 7: Prueba HB	63
Figura 8: Distancia total recorrida en centímetros en OFT	68
Figura 9: Duración en el centro en segundos en OFT	69
Figura 10: Duración del acicalamiento en segundos en OFT	70
Figura 11: Posición vertical en segundos en OFT	70
Figura 12: Porcentaje del número de entradas en brazos abiertos en EPM	71
Figura 13: Porcentaje del tiempo de permanencia en brazos abiertos en EPM	72
Figura 14: Porcentaje del número de entradas en brazos cerrados en EPM	73
Figura 15: Número de entradas totales en brazos abiertos y cerrados en EPM	74
Figura 16: Índice de ansiedad en EPM	74
Figura 17: Porcentaje de efecto ansiolítico de acuerdo al índice de ansiedad	75
Figura 18: Número de inserciones de cabeza en HB	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los trastornos de ansiedad	3
Tabla 2: Fármacos más prescritos para los trastornos de ansiedad divididos por grupo farmacológico y mecanismo de acción	6
Tabla 3: Modelos experimentales en ansiedad de respuesta condicionada y respuesta no condicionada.	25
Tabla 4: Clasificación taxonómica de <i>P. granatum</i>	30
Tabla 5: Composición nutrimental del fruto	32
Tabla 6: Componentes fitoquímicos de diferentes partes del fruto	34
Tabla 7: Partes de la granada con propiedades funcionales	44
Tabla 8: Dosis calculadas para la curva dosis – respuesta	59
Tabla 9: Criterios de selección	65
Tabla 10: Definición operacional de las variables	66

ABREVIATURAS

AC	Adenilil ciclasa
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> : Hormona adrenocorticotrópica
AE-PG	Extracto acuoso de granada
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
BLA	Amígdala basolateral
BPR	Buspirona
BZPs	Benzodiazepinas
CA	Cuerno de Ammon
CEA	Amígdala central
CED	Cuerpo estriado dorsal
CFR	<i>Corticotropin releasing factor</i> : Factor liberador de corticotropina
CORT	Inyección subcutánea de corticosterona
CP	<i>Campomanesia pubescens</i>
CPF	Corteza prefrontal
CPFm	Corteza prefrontal media
CPJ	Combinación de jugo de limón con jugo de granada
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone signaling</i> : Hormona liberadora de corticotropina
CRS	<i>Chronic restraint stress</i> : Estrés de restricción crónica
CTP	Corticotropina
CuO-NPs	Nanopartículas de óxido de cobre
DA	Dopamina
DZP	Diazepam
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> : Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EPM	<i>Elevated plus maze</i> : Prueba de laberinto elevado en cruz
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> : Proteína quinasa regulada por señal extracelular

EROs	Especies reactivas de oxígeno
EESM	Extracto etanólico de semillas de granada
EEPG	Extracto etanólico de hojas de granada
GABA	<i>Gamma aminobutyric acid</i> : Ácido gamma-aminobutírico
GABA_A	Receptor ionotrópico de GABA subtipo A
GABA_B	Receptor metabotrópico de GABA subtipo B
GD	Giro dentado
GP	Sustancia gris periacueductal
GR	Receptores de glucocorticoides
HB	<i>Holeboard test</i> : Prueba de tabla de agujeros
HEPG	Extracto de cáscara de granada
HPA	Eje Hipófisis-pituitaria-adrenal
HPC	Hipocampo
HPT	Hipotálamo
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
IRSN	Inhibidores de la recaptación de serotonina - noradrenalina
ISRS	Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina
IL-1b	Interleucina 1b
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Kir3	<i>Internal rectifying potassium channels</i> : Canal rectificador interno de potasio 3
LC	Locus coeruleus
MeA	Amígdala medial
MLPG	Extracto metanólico de hojas de granada
MR	Receptores mielocorticoides
NAc	Núcleo accumbens
NE	Noradrenalina
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i> : Factor nuclear κB

NLET	Núcleo del lecho de la estría terminal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPV	Núcleo paraventricular hipotalámico
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid related factor 2</i> : Factor nuclear eritroide 2
NSF	<i>Novelty supressed feeding</i> : Alimentación suprimida por novedad
OBX	Bulbectomía olfatoria
OFT	Open field test: Prueba de campo abierto
PJ	Jugo de granada
PKA	<i>Protein kinase A</i> : Proteína quinasa A
PPARγ	<i>Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma</i> : Receptor de peroxisoma proliferador activado gamma
RPFE	Extracto de granada roja con gluconato de magnesio y vainillina
SIS	Sistema de información en salud
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TA	Trastornos de ansiedad
TCA	<i>Tricyclic antidepressants</i> : Antidepresivos tricíclicos
TM	<i>Transmembrane domain</i> : Dominio transmembrana
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i> : Factor de necrosis tumoral alfa
VTA	<i>Ventral tegmental área</i> : Área tegmental ventral
5-HT	5-Hidroxitriptamina
5-HT1_A	Autorreceptor de serotonina subtipo 1 $_A$
α_1-GABA$_A$	Subtipo de receptor alfa 1 GABA A
α_2-GABA$_A$	Subtipo de receptor alfa 2 GABA A

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. GENERALIDADES	1
1.1 <i>Ansiedad</i>	1
1.2 <i>Epidemiología de los trastornos de ansiedad</i>	2
1.2.1 <i>Internacional</i>	2
1.2.2 <i>Nacional</i>	2
1.3 <i>Clasificación</i>	3
1.4 <i>Cuadro clínico</i>	4
1.5 <i>Factores de riesgo</i>	4
1.6 <i>Tratamiento</i>	5
1.6.1 <i>Psicoterapia</i>	5
1.6.2 <i>Farmacoterapia</i>	5
1.7 <i>Estructuras neuroanatómicas involucradas en los trastornos de ansiedad</i> 9	
1.7.1 <i>Amígdala</i>	9
1.7.2 <i>Núcleo del lecho de la estría terminal</i>	10
1.7.3 <i>Núcleo accumbens</i>	10
1.7.4 <i>Hipocampo</i>	11
1.7.5 <i>Hipotálamo</i>	11
1.7.6 <i>Sustancia gris periacueductal</i>	12
1.7.7 <i>Corteza prefrontal</i>	12
1.7.8 <i>Locus coeruleus</i>	13
1.8 <i>Participación del eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal en los trastornos de ansiedad</i>	15
1.8.1 <i>Hormonas involucradas en el eje Hipófisis-Pituitaria-Adrenal</i>	16
1.8.2 <i>Respuesta del eje Hipófisis-Pituitaria-Adrenal</i>	17
1.9 <i>Neurotransmisores implicados en la ansiedad</i>	19
1.9.1 <i>5-HT</i>	19
1.9.2 <i>NE</i>	20
1.9.3 <i>DA</i>	20
1.9.4 <i>GABA</i>	22
1.10 <i>Modelos experimentales en ansiedad</i>	23

1.10.1	<i>Modelo de respuestas condicionadas</i>	26
1.10.2	<i>Modelo de respuestas incondicionadas</i>	26
1.11	<i>Fruto de granado</i>	29
1.11.1	<i>Generalidades</i>	29
1.11.2	<i>Clasificación taxonómica</i>	30
1.11.3	<i>Morfología</i>	31
1.11.4	<i>Composición nutrimental</i>	32
1.11.5	<i>Composición fitoquímica</i>	33
1.11.6	<i>Usos en la medicina tradicional</i>	43
1.12	<i>Toxicidad</i>	46
2.1	<i>Efecto ansiolítico de la granada</i>	46
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
IV.	JUSTIFICACIÓN	55
V.	HIPÓTESIS	56
5.1	<i>Hipótesis alterna H_1</i> :.....	56
5.2	<i>Hipótesis nula H_0</i> :.....	56
VI.	OBJETIVOS	57
6.1	<i>Objetivo general</i>	57
6.2	<i>Objetivos específicos</i>	57
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
7.1	<i>Microencapsulación de jugo de granada roja</i>	57
7.2	<i>Implicaciones éticas</i>	58
7.3	<i>Animales</i>	58
7.4	<i>Compuestos y dosis</i>	58
7.5	<i>Grupos experimentales y administración de los tratamientos</i>	59
7.6	<i>Medición del comportamiento tipo ansiedad en las pruebas conductuales</i>	59
7.6.1	<i>OFT</i>	60
7.6.2	<i>EPM</i>	61
7.6.3	<i>HB</i>	62
7.7	<i>Diagrama del diseño experimental</i>	64
7.8	<i>Contexto del estudio</i>	64
7.9	<i>Tipo de estudio</i>	64

7.10	<i>Tamaño de muestra y muestreo</i>	65
7.11	<i>Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión</i>	65
7.12	<i>Definición operacional de las variables (dependientes, independientes)</i> .	65
7.13	<i>Análisis estadístico</i>	68
VIII.	RESULTADOS	68
8.1	<i>OFT</i>	68
8.1.1	<i>Distancia total recorrida</i>	68
8.1.2	<i>Duración en centro</i>	69
8.1.3	<i>Acicalamiento</i>	69
8.1.4	<i>Posición vertical</i>	70
8.2	<i>EPM</i>	71
8.2.1	<i>Número de entradas en brazos abiertos</i>	71
8.2.2	<i>Tiempo de permanencia en brazos abiertos</i>	71
8.2.3	<i>Número de entradas en brazos cerrados</i>	72
8.2.5	<i>Índice de ansiedad</i>	74
8.2.6	<i>Curva dosis-respuesta</i>	75
8.3	<i>HB</i>	76
8.3.1	<i>Inserción de cabeza</i>	76
IX.	DISCUSIÓN	76
9.1	<i>El microencapsulado de jugo de granada disminuye la conducta ansiosa y aumenta la conducta exploratoria de las ratas en la batería de pruebas conductuales</i>	77
9.2	<i>Posibles mecanismos de acción que producen efecto ansiolítico en la granada</i>	81
X.	CONCLUSIONES	83
XI.	PERSPECTIVAS	83
XII.	RECOMENDACIONES	83
XIII.	REFERENCIAS	84
XIV.	ANEXOS	99

RESUMEN

Introducción: A nivel mundial se ha visto un incremento en la incidencia de trastornos de ansiedad (TA), principalmente durante la pandemia producida por el COVID-19. El enfoque de tratamiento farmacológico reduce significativamente su sintomatología, pero paradójicamente también genera efectos que ocasionan el abandono del mismo. La medicina complementaria ha demostrado ser una opción alternativa para el tratamiento de los TA. La granada es un fruto estacional cuyo jugo posee diversas propiedades bioactivas, debido a su contenido rico en fitoquímicos con propiedades ansiolíticas. En este contexto, se consideró de importancia evaluar si un microencapsulado de jugo de granada posee actividad ansiolítica. **Objetivo:** Evaluar el efecto de un microencapsulado de jugo de granada (*Punica granatum* L.) sobre la conducta tipo ansiedad en un modelo animal de respuestas incondicionadas. **Métodos:** Se formaron 9 grupos de ratas Wistar con un peso de 200 a 250 g (n=6), se administró por 21 días ininterrumpidos los tratamientos correspondientes: grupo control (agua estéril 4 ml/kg/día, vía intragástrica: i.g.), 4 grupos de microencapsulado (316, 562, 1000 y 1777 mg/kg/día, i.g.), 4 grupos diazepam (0.56, 1, 1.77 y 3.16 mg/kg/día, vía intraperitoneal: i.p). Al día 22, se aplicaron las pruebas conductuales: campo abierto (OFT), laberinto elevado en cruz (EPM) y tabla de agujeros (HB). Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA de una vía con un posttest de Tukey. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. **Resultados:** Comparado con el grupo control, el grupo de microencapsulado (1777 mg/kg), en OFT tuvo mayor locomoción y las entradas al centro; en el EPM mayores entradas en los brazos abiertos y el índice de ansiedad fue menor, mientras que en HB tuvo mayor número de inserciones de cabeza. La curva dosis – respuesta demostró que el efecto tipo ansiolítico del microencapsulado es dosis – dependiente. **Conclusión:** El microencapsulado de granada en una dosis de 1777 mg/kg posee efecto de tipo ansiolítico.

Palabras clave: *Punica granatum* L.; Conducta tipo ansiedad; Respuestas incondicionadas; Diazepam; Microencapsulado de jugo de granada.

ABSTRACT

Introduction: Globally, there has been an increase in the incidence of anxiety disorders (AD). The pharmacological treatment approach significantly reduces their symptomatology; however, paradoxically, it also generates effects that contribute to treatment abandonment. Complementary medicine has demonstrated itself as an alternative option for AD treatment. Pomegranate, as seasonal fruit, contains various bioactive properties, due to its phytochemical-rich composition with anxiolytic attributes. In this context, it was deemed important to assess whether microencapsulated pomegranate juice exhibits anxiolytic activity. **Aim:** This study aims to evaluate the effect of microencapsulated pomegranate (*Punica granatum* L.) juice on anxiety-like behavior using an animal model of unconditioned responses. **Methods:** Nine groups of Wistar rats weighing 200 to 250 g (n=6) were formed, and the respective treatments were administered for 21 consecutive days: control group (sterile water 4 ml/kg/day, intragastric route: i. g.), 4 groups of microencapsulated (316, 562, 1000 and 1777 mg/kg/day, i.g.), 4 groups of diazepam (0.56, 1, 1.77 and 3.16 mg/kg/day, intraperitoneal route: i.p). On day 22, behavioral tests were conducted: open field (OFT), elevated plus maze (EPM) and hole board (HB). The obtained data were analyzed using one-way ANOVA with a Tukey's posttest. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. **Results:** In comparison to the control group, the microencapsulated group (1777 mg/kg), exhibited increased locomotion and entries to the center in the OFT; more entries into the open arms and a lower anxiety index in the EPM; and a higher number of head insertions in the HB. The dose-response curve indicated that the anxiolytic-like effect of microencapsulation is dose-dependent. **Conclusion:** Microencapsulation of pomegranate at a dose of 1777 mg/kg demonstrates an anxiolytic-like effect. **Keywords:** *Punica granatum* L.; anxiety; unconditioned responses; diazepam; microencapsulate of pomegranate juice.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de TA ha incrementado en todo el mundo en los últimos años y con ello, los años vividos con discapacidad de quien lo padece. Este tipo de trastornos son tratados principalmente con fármacos, ya que han mostrado mayor efectividad al disminuir y eliminar sus síntomas, sin embargo, este tipo de tratamiento genera efectos secundarios de consideración clínica que algunas veces ocasionan el abandono del tratamiento y con ello el agravamiento del padecimiento. Los estudios en la medicina complementaria han reportado compuestos bioactivos antioxidantes presentes en los frutos que poseen actividad ansiolítica y a los cuales se les atribuye un efecto neuroprotector. Debido a que estos antioxidantes se han reportado abundantemente en el fruto de la granada podría ser un buen agente ansiolítico. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de un microencapsulado de jugo de granada (MEG) en la conducta similar a ansiedad en un modelo animal de respuesta incondicionada.

La presente tesis se divide en cinco secciones. En la primera se encuentran los antecedentes donde se abordan temas actualizados sobre la ansiedad, epidemiología a nivel internacional, nacional y estatal, los modelos experimentales en ansiedad, generalidades del fruto del granado, microencapsulación, antecedentes y planteamiento del problema. En la segunda se encuentra la justificación, las hipótesis y los objetivos planteados. En la tercera se detalla la metodología realizada en este estudio, el tipo de estudio, la selección de la población y el tamaño de muestra. En la cuarta se encuentra el diagrama de diseño experimental, se definen las variables y pruebas utilizadas, así como el análisis estadístico. En la quinta se encuentran la discusión, los resultados y las conclusiones obtenidas en este estudio, así como las recomendaciones a realizar para estudios posteriores. Finalmente se enlistan las referencias consultadas, así como los anexos donde se encuentran los formatos de aprobación por parte del comité de ética animal.

I. GENERALIDADES

1.1 *Ansiedad*

La ansiedad, como emoción, es una respuesta adaptativa que se presenta frente a un peligro potencial en el entorno cuya función principal es preparar al organismo a través de un estado de alerta que tiene como resultado alteraciones conductuales y fisiológicas que le permiten al sujeto, buscar estrategias de supervivencia adecuadas en función de la amenaza percibida (1-3). Esta amenaza se percibe por estímulos, que pueden ser innatos o aprendidos, que indican el peligro, los cuales, al retirarse, ocasionan que desaparezca el estado de alerta y se normalicen las funciones del organismo (4). Cuando la intensidad de la ansiedad es moderada, permite que se busquen mecanismos para la resolución de problemas e impulsa mayor desempeño físico e intelectual para que el sujeto pueda adaptarse a diversos contextos y situaciones novedosas, que se perciben como desagradables o inesperadas (5). Sin embargo, cuando la ansiedad se convierte en patológica, se considera una respuesta emocional desproporcionada y exagerada ya que se sobreestima la amenaza percibida o el peligro es valorado erróneamente, generando respuestas excesivas e inapropiadas que la vuelven desadaptativa (6). La ansiedad patológica se manifiesta de manera espontánea, recurrente e inesperada ante la ausencia de estímulos amenazantes o cuando estos estímulos resultan ser inofensivos, por lo que dificulta el manejo efectivo y adaptativo de estímulos aversivos o circunstancias difíciles, lo anterior ocasiona un deterioro del funcionamiento para realizar actividades cotidianas que les impide involucrarse plenamente en el ámbito social, laboral, familiar entre otras áreas (7, 8). Este tipo de ansiedad se considera un trastorno psiquiátrico muy común y requiere de atención clínica ya que engloba una sintomatología característica que se manifiesta como desajuste y disfunción a nivel físico, cognitivo y conductual (9). Dentro de la ansiedad patológica se encuentran los TA; estos son los trastornos mentales más comunes que implican una falla para elegir una respuesta adaptativa e inhibir una respuesta desadaptativa frente a diversas situaciones (10).

1.2 Epidemiología de los trastornos de ansiedad

El número de personas que padecen trastornos mentales va en aumento, tan solo en el año 2020, la Organización mundial de la salud (OMS) estimó que aproximadamente 1000 millones de personas en el mundo presentaban algún un trastorno mental, cifras que van en aumento (11). De manera preocupante, estos trastornos son un factor importante del crecimiento para el crecimiento de la morbilidad y discapacidad a nivel mundial. Los TA se encontraron en el séptimo lugar de una lista 20 principales causas de años vividos con discapacidad, en el 2013 (12). Se estima que alrededor del 20% de la población a nivel mundial, padecerá algún trastorno afectivo en algún momento de su vida el cual requerirá tratamiento médico (13).

1.2.1 Internacional

En el año 2020 la prevalencia de TA fue de 298 millones de personas, posteriormente se realizó un ajuste por la pandemia de COVID-19, y se encontró que este fenómeno afectó a la población, ocasionando un incremento en la prevalencia de aproximadamente 76.2 millones de personas (mujeres 51.8 millones y hombres 24.4 millones) (14, 15). Por otro lado, el estudio *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study* (GBD) en el 2019, mostró que los TA, son uno de los trastornos más discapacitantes a nivel mundial y los clasificó entre las 25 principales causas de carga global de enfermedad (14).

1.2.2 Nacional

Los TA ocupan el segundo lugar entre los trastornos mentales más discapacitantes en la Región de las Américas (16). El Instituto Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE) reportó que, en el 2021, aproximadamente el 19.3% de la población mexicana en edad adulta presenta síntomas de ansiedad severos, mientras que un 31,3% presenta síntomas de ansiedad mínima (17). De acuerdo con el Subsistema

de Prestación de Servicios de la Secretaría de Salud de Hidalgo, en el Sistema de Información en Salud (SIS) correspondiente al año 2020 se reportaron para ese año 65 casos de trastornos de ansiedad generalizada diagnosticados, menos de lo reportado en el año 2019 (85 casos) (18).

1.3 Clasificación

La Asociación Americana de Psiquiatría (APA, por sus siglas en inglés) publicó la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V, por sus siglas en inglés) donde se encuentran una serie de descripciones, síntomas y criterios para el diagnóstico de trastornos mentales. En este manual se incluye el capítulo denominado “Trastornos de ansiedad” donde se muestra su clasificación (Tabla 1) (19).

Tabla 1. Clasificación de los trastornos de ansiedad

DSM-V
Trastornos de ansiedad
Trastorno de ansiedad por separación
Mutismo selectivo
Fobia específica
Trastorno de ansiedad social (Fobia social)
Trastorno de pánico
Agorafobia
Trastorno de ansiedad generalizada
Trastorno de ansiedad inducido por sustancias/medicamento
Trastorno de ansiedad debido a otra afección médica
Otro trastorno de ansiedad especificado
Otro trastorno de ansiedad no especificado

Adaptado de: (19).

1.4 Cuadro clínico

Generalmente, los TA se diferencian del miedo o la ansiedad fisiológica por ser excesivos y comúnmente inducidos por periodos prolongados de estrés (20); suelen ser persistentes con una duración de 6 meses o más y pueden desembocar en cuadros de depresión mayor y riesgo de suicidio (19). Los síntomas más característicos de los TA involucran los siguientes componentes físicos, cognitivos y psicológicos tales como (6, 21, 22):

- Síntomas físicos: dolor de cabeza, dolor muscular, taquicardia, hipertensión, náusea, vómito, diarrea, sudoración, disnea, sensación de asfixia, mareos, temblores, hormigueo o entumecimiento de brazos y piernas, desmayo, boca seca, etc.
- Síntomas cognitivos: inquietud, preocupación, nerviosismo, irritabilidad, inseguridad, percepción de irrealidad o desapego, confusión, sensación de muerte, etc.
- Síntomas conductuales: evitación, huida, parálisis, escape, dificultad para hablar.

1.5 Factores de riesgo

La etiología de los TA es tan compleja que aún no se ha llegado a un consenso para su explicación, aunque se identifica que implica la interacción entre factores biológicos, ambientales y psicosociales. Así, entre los factores biológicos y ambientales se incluyen genes reguladores de la señalización de neurotransmisores (genes relacionados con la función monoaminérgica, estrés oxidativo, neuropéptidos o sistemas relacionados con el eje hipotalámico-pituitario-adrenal [HPA]), reactividad emocional hereditaria, hiperreactividad de la amígdala, o la administración de algunos medicamentos (23, 24). Entre los factores psicosociales, se encuentran el estrés continuo, los sucesos traumáticos y estresantes en la niñez y adolescencia, incluso durante la gestación (por ejemplo: maltrato, pérdida, abuso

continuo, rechazo e invalidación de los padres, etc.) (23, 25, 26).

Existe un predominio de los TA en las mujeres, cuya etiología incluye otros factores como la predisposición genética, los rasgos de personalidad y las hormonas sexuales (27) presentes durante las fases de reproducción. Estos periodos coinciden con fluctuaciones hormonales drásticas, lo que evidencia la importancia del papel de las hormonas gonadales en la aparición de los TA (28).

1.6 Tratamiento

Los TA se pueden tratar con psicoterapia, farmacoterapia o con ambos, estos tratamientos se deben tomar dependiendo la gravedad del trastorno, la preferencia del paciente informado, los efectos secundarios esperados, la duración del efecto del tratamiento y la disponibilidad del tratamiento en común (29).

1.6.1 Psicoterapia

La terapia cognitivo conductual se basa en un modelo psicoterapéutico centrado en la resolución tangible de problemas a partir de la modificación de pensamientos y creencias que generan un malestar emocional y/o una conducta disfuncional. Es idónea en todas las etapas del desarrollo, desde niños, personas jóvenes hasta adultos mayores que padecen algún TA y se conceptualiza típicamente como un tratamiento a corto plazo (30, 31)

1.6.2 Farmacoterapia

Esta terapia es la más utilizada ya que numerosos neurotransmisores intervienen en los TA, cada uno de estos sistemas es importante para la intervención farmacológica por ello se utilizan pocas clases de medicamentos para el tratamiento (32). Para una elección adecuada del fármaco deben tomarse en cuenta los efectos secundarios que producirá las interacciones farmacológicas y las comorbilidades presentes. Los medicamentos de primera elección por su seguridad en condiciones

de embarazo y lactancia son los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) principalmente el escitalopram y la sertralina. Los inhibidores de la recaptación de serotonina - noradrenalina (IRSN) se utilizan mayormente para los síntomas mixtos de depresión y ansiedad. Los antidepresivos tricíclicos (TCA) se administran mayormente en personas con trastornos del sueño y las benzodiazepinas (BZPs) que son los más recetados como tratamiento a corto plazo (33). La Tabla 2 muestra los fármacos más utilizados por grupo farmacológico, así como el mecanismo de acción.

Tabla 2: Fármacos más prescritos para los trastornos de ansiedad divididos por grupo farmacológico y mecanismo de acción.

Grupo farmacológico	Fármaco	Mecanismo de acción
ISRS Tratamiento de primera línea	Fluoxetina	Inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT
	Sertralina	
	Citalopram	
	Escitalopram	
	Paroxetina	
	Fluvoxamina	
IRSN Tratamiento de primera línea	Duloxetina	Inhibidor de la recaptación de 5-HT, NE y DA
	Venlafexina	
	Desvenlafexina	
TCA Tratamiento de segunda línea	Clomipramina	Inhibidor de la recaptación de 5-HT y NE
	Imipramina	
	Desipramina	
	Nortriptilina	
BZPs Tratamiento a corto plazo	Clonazepam	Agonista GABA _A
	Alprazolam	
	Lorazepam	
	Clordiazepóxido	
	Oxazepam	
	Diazepam	

ISRS, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina; IRSN, inhibidores de la recaptación de serotonina-noradrenalina; TCA, antidepresivos tricíclicos; BZPs, benzodiazepinas; 5-HT, serotonina;

NE, noradrenalina; DA, dopamina; GABA_A, receptor ácido gamma-aminobutírico A. **Adaptado de (34, 35).**

Los ISRS son un grupo farmacológico de antidepresivos con efecto ansiolítico que debido a su balance positivo de riesgos/beneficios, como ya mencionado, son los fármacos de primera elección para el tratamiento de los TA (36). El objetivo de los ISRS es inhibir de manera selectiva la recaptación presináptica de serotonina (5-HT) por su transportador, aumentando su disponibilidad en la membrana postsináptica, dosis más altas del rango terapéutico se asocian a una mayor mejoría de los síntomas (37). Los efectos de los ISRS a nivel de estructuras neuronales se dan por su acción en la corteza prefrontal media (CPFm), la amígdala, el cíngulo anterior, la ínsula, el cuerpo estriado y el tálamo para disminuir su actividad cuando se activan por emociones negativas. Este grupo de fármacos, también alteran los estados emocionales mejorando los procesos de información afectiva tanto positiva como negativa en el cuerpo estriado. La vida media depende del fármaco utilizado, se metabolizan por el citocromo P450 en el hígado y todos los ISRS inhiben el citocromo P2D6 (38, 39).

Los IRSN son utilizados después de un fallo o respuesta inadecuada a un ISRS ya que tienen una mejor tolerabilidad que éstos. Este grupo farmacológico además de ser un antidepresivo, genera efecto ansiolítico. Debido a su balance positivo de riesgos/beneficios son considerados de los fármacos de primera elección para el tratamiento de los TA. Su acción comienza a producirse a partir de dos a seis semanas posteriores a su consumo para empezar a presentar el efecto ansiolítico (36, 40). Funcionan al inhibir la recaptación de 5-HT y noradrenalina (NE) en la neurona presináptica, en consecuencia, hay una mayor estimulación del receptor postsináptico y una transmisión neuronal postsináptica adicional (41, 42).

Los TCA bloquean la reabsorción (recaptación) de los transportadores de 5-HT y NE. Son utilizados con menos frecuencia y como segunda opción ya que tienen alto riesgo de letalidad en caso de sobredosis y alta frecuencia de eventos adversos, mayor que los ISRS o IRSN por lo que deben usarse con precaución. Además, los

TCA no han demostrado tener una eficacia comparable a la de los ISRS y IRSN para el tratamiento de los TA. Al igual que los ISRS e IRSN, este grupo farmacológico proporciona el efecto ansiolítico de dos a seis semanas posterior a su consumo (43, 44).

Las BZPs se utilizan por sus potentes efectos a corto plazo para reducir la ansiedad durante las primeras semanas de un antidepresivo cuando aún no se producen los efectos ansiolíticos. En cuanto al ácido gamma-aminobutírico (GABA), se unen a su sitio receptor específico en el complejo del receptor ionotrópico GABA subtipo A ($GABA_A$) y facilita los efectos inhibidores del GABA al actuar sobre un canal de iones Cl^- (45). Las BDZs se unen a un sitio extracelular en la interfaz α/γ , la ocupación de este receptor no afecta directamente el canal iónico de Cl^- sino que modifica la función del canal y la conformación del receptor GABA para aumentar su afinidad por GABA y provocar una mayor afluencia de iones Cl^- y una mayor hiperpolarización neuronal por estas moléculas. Se ha sugerido que el efecto ansiolítico por parte de las BDZs es el resultado de la unión a la subunidad α_2 (46, 47).

1.6.2.1 Efectos secundarios

Los ISRS y los IRSN se toleran mejor que otros antidepresivos, aunque los efectos secundarios más comunes incluyen: cefaleas, boca seca, somnolencia, vómitos, náuseas, disminución de la libido, agitación e insomnio, mientras que los menos comunes con un consumo prolongado incluyen: síndrome serotoninérgico (agitación, confusión, taquicardia, hipertensión, rigidez muscular, diarrea, temblores), síntomas extrapiramidales (temblores, rigidez, parkinsonismo, inquietud, taquipneas), hematomas espontáneos, prurito, alopecia, urticaria, hiponatremia, cataratas, prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma (lo que puede generar arritmias) (38, 48, 49). Los TCA no deben ser recetados en personas con problemas cardiovasculares, además de ser los menos recetados ya que los efectos adversos son difíciles de soportar, los cuales incluyen: fatiga,

hipotensión ortostática, aumento del apetito, aumento de peso, alteraciones visuales, confusión, estreñimiento, síntomas de abstinencia, prolongación del intervalo QRS, retención urinaria (40, 50). Finalmente, las BZPs generan efectos secundarios que incluyen: sedación, somnolencia diurna, riesgo de caídas, debilidad, vértigo, deterioro del desempeño motor, ligera hipotensión, confusión, amnesia retrógrada y la muerte si se mezcla con otros depresores del sistema nervioso central (SNC), sobredosis y síndrome de abstinencia. La principal preocupación radica en que su consumo a largo plazo puede generar dependencia y tolerancia por lo que el tratamiento a corto plazo es imprescindible (33, 45, 51).

1.7 Estructuras neuroanatómicas involucradas en los trastornos de ansiedad

Las respuestas a la ansiedad se asocian a la activación de circuitos específicos en el cerebro. Durante mucho tiempo se supuso que las emociones eran procesadas exclusivamente en la amígdala, sin embargo, la ciencia ha determinado que la ansiedad se procesa en diferentes sustratos neuroanatómicos (52).

1.7.1 Amígdala

La amígdala es una estructura cuya forma es similar a una almendra, se ubica en la parte inferior del lóbulo temporal medial, está formada por el “complejo amigdalino” conformado por numerosos subnúcleos: el basolateral central y medial. El núcleo basolateral contiene a la región crítica para el desarrollo de la ansiedad y da forma a la amígdala basolateral (BLA). El núcleo central, que contiene a la amígdala central (CEA) es la principal estación de procesamiento y salida hacia otras regiones cerebrales que regulan las respuestas autonómicas y conductuales de la ansiedad (locus coeruleus (LC), la sustancia gris periacueductal (GP) y el hipotálamo (HPT). El núcleo medial contiene a la amígdala medial (MeA). Su función es intervenir en los estados de mayor excitación y en las respuestas al miedo y ansiedad. En la MeA atraviesan desde el tálamo anterior las fibras sensoriales de las vías auditivas, visuales, olfativas, viscerales y nociceptivas hasta llegar al BLA y de aquí se

transmite la señal relacionada con el estímulo al CEA. Este último actúa integrando la información para ejecutar respuestas autonómicas y conductuales. Sus eferentes se extienden al núcleo parabraquial que genera respuestas fisiológicas principalmente la taquipnea, al HPT lateral, que genera respuestas simpáticas, al LC, que genera aumento de la presión arterial y taquicardias, así como respuestas conductuales y al NPV donde se activa el eje HPA. Se ha encontrado que lesiones en la BLA y en la CEA ocasionan un déficit en las respuestas del eje HPA. Las respuestas inmediatas a las amenazas ocurren mediante la activación en la entrada directa del tálamo sensorial, mientras que las respuestas lentas se activan en las entradas tálamo-amigdalinas que permiten realizar evaluaciones relacionadas con amenazas. La función de la amígdala está mediada por neurotransmisores y moduladores como la 5-HT, dopamina (DA), GABA, acetilcolina, orexinas y neuropéptido Y. Los déficits en alguna de estas vías o en ambas, así como una desregulación en los neurotransmisores y/o moduladores propician la generación de ansiedad con o sin la presencia de alguna amenaza (53-55).

1.7.2 Núcleo del lecho de la estría terminal

El núcleo del lecho de la estría terminal (NLET), se considera una parte extendida de la amígdala y se conforma de 12 a 18 subnúcleos que contienen amplia variedad de neurotransmisores como GABA (mayor predominancia), glutamato, NE, 5-HT y la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Por tener conexiones densas con el NPV y el nodo principal del eje HPA, el NLET desempeña un papel clave en las respuestas frente al miedo y ansiedad para provocar señales de larga duración que provocan evitación o congelación, estados de hipervigilancia y sentimientos de ansiedad. La hiperactividad en este núcleo se asocia con la presencia de TA (56-58).

1.7.3 Núcleo accumbens

El núcleo accumbens (NAc) se divide en dos partes principales: el núcleo central

que está asociado con el sistema motor extrapiramidal y la envoltura periférica o corteza. Esta última se asocia con el sistema límbico pues tiene una entrada amplia de receptores dopaminérgicos, además recibe múltiples fuentes aferentes de la amígdala basolateral y medial, así como sus núcleos amigdaloides centrales. Las eferentes del NAc inervan el cuerpo estriado, el tálamo mediodorsal, CPF y las áreas dopaminérgicas mesolímbicas. El principal neurotransmisor de esta zona es la DA por lo que ésta involucrada en la participación de varias funciones neuroconductuales (59, 60).

1.7.4 Hipocampo

El hipocampo (HPC) se encuentra en el lóbulo temporal con un extremo anterior en la amígdala y un extremo posterior cerca del esplenio del cuerpo caloso. El HPC está formado por tres áreas distintas: el giro dentado (GD), el cuerno de Ammon (CA) y el subículo. El GD que contiene neuronas de células granulares las cuales reciben entradas excitatorias de la capa II que se encuentran en la corteza entorrinal a través de axones de la vía perforante y se proyectan a una parte de la región del HPC. El CA se conforma con cuatro campos (CA₁, CA₂, CA₃ Y CA₄) donde se reciben células de la región CA₃ y que posteriormente se proyectan a la región CA₁ y luego al subículo. Este último es la etapa final donde se combina información de la proyección de CA₁ y la capa III de la corteza entorrinal cuya finalidad es enviar información a lo largo de las vías de salida del HPC. En esta zona se encuentra una alta densidad de receptores serotoninérgicos tipo 1A (5-HT_{1A}) y receptores GABA_A subtipos α 1 y α 2 (α 1-GABA_A y α 2-GABA_A). Una falla en el HPC, así como un desequilibrio en sus receptores, ocasionarán que se dificulte la modulación de la actividad amigdalina, contribuyendo a la patogenia de los TA (61, 62).

1.7.5 Hipotálamo

El HPT se encuentra en el prosencéfalo ventral, posee un complejo de núcleos neuronales, el más importante en temas de ansiedad es el NPV. Este núcleo está

ubicado en el diencéfalo ventral, en ambos lados del tercer ventrículo y se relaciona con procesos fisiológicos como el comportamiento, las emociones, la actividad cardiovascular, la secreción de hormonas, entre otros. Está conformado por tres tipos de neuronas: neuronas parvocelulares, neuronas magnocelulares y neuronas de proyección larga, las neuronas parvocelulares con axones en la eminencia media secretan principalmente CRH en la vasculatura portal para iniciar la activación del eje HPA (63). Las neuronas magnocelulares transmiten señales de estrés a través de una regulación dinámica a regiones no neurohipofisarias, las neuronas de proyección larga contactan a múltiples regiones del cerebro donde liberan neuropéptidos localmente desde las dendritas para regular la motivación, las emociones y el comportamiento. La sinapsis del NPV utiliza glutamato o GABA como neurotransmisores comunes, además está rodeada de botones axonales del subículo ventral, la CPF, la MeA, el tabique lateral y el núcleo supraquiasmático. Estas regiones se posicionan para modular la salida paraventricular a través de excitación o inhibición de las proyecciones interneuronales en el NPV (64, 65).

1.7.6 Sustancia gris periacueductal

La sustancia GP es una estructura de materia gris que rodea el acueducto de Sylvius en el mesencéfalo, se extiende al LC en su primer nivel. Tiene diversos neurotransmisores como 5-HT, GABA, DA y encefalina, en esta zona hay una fuente de sensaciones desagradables como la ansiedad, que se genera mediante la estimulación química a través de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Además, participa en la evaluación de respuestas a amenazas, así como a la regulación de comportamientos defensivos. Esta vía da lugar a reacciones emocionales, respuestas motoras y simpáticas (66, 67).

1.7.7 Corteza prefrontal

La CPF se encuentra en el lóbulo frontal, es conocida como corteza de asociación y está implicada en procesos cognitivos de alto nivel denominadas funciones

ejecutivas que incluyen la organización de la información procedente de diversas áreas sensoriales, el seguimiento de la información en la memoria de trabajo y la coordinación de conductas dirigidas a objetivos. La CPF está formada por sectores lateral, orbital y medial, sin embargo, los que tienen conexiones directas con las estructuras límbicas implicadas con la ansiedad son la corteza prefrontal medial y la lateral. El sector medial incluye a la corteza cingulada anterior la cual influye con las expresiones conductuales y autonómicas asociadas con la ansiedad mediante conexiones con sistemas motores que permiten la contextualización de la amenaza, está asociada con el hipocampo. La CPFm en su porción ventral se asocia a centros interoceptivos como la ínsula anterior y el tronco encefálico, estos se relacionan con las emociones y el afecto, mientras que su porción rostral y en su porción dorsal se encargan de la evaluación de las amenazas. Finalmente, en la CPF lateral ayuda a generar estrategias que permitan la regulación de emociones, en dirigir la atención y manipular tareas que permitan el logro de objetivos (2, 68, 69).

1.7.8 *Locus coeruleus*

El LC comprende una red de proyección que está presente en todo el SNC, es el principal productor de NE actuando como un regulador global, LC inerva el HPT en la porción lateral en el NPV y el núcleo supraóptico, también inerva el núcleo ventral y central de la amígdala, el septo medial, el HPC, el cuerpo calloso hasta el cíngulo. La actividad de LC es alta en estados de angustia y ansiedad puesto que las amenazas activan el sistema nervioso simpático, lo que se expresa como respuestas conductuales de lucha-huida. Lo anterior junto con la elevación de glucocorticoides, que actúan en el eje HPA para provocar una respuesta fisiológica y conductual coordinada, son fundamentales para generar una respuesta adaptativa al entorno dinámico (respuestas ascendentes), que inervan el HPT, la amígdala, el HPC y el córtex.

Las respuestas descendentes vienen de sistemas corticales frontales de orden superior, alcanzan el GP, la médula espinal y otros núcleos del tronco encefálico

cuya finalidad es regular o atenuar la respuesta a una amenaza cuando el entorno se percibe seguro, junto con la respuesta ascendente excesiva se genera una desregulación cortical en las estructuras subcorticales y en el mesencéfalo lo que lleva a una incapacidad para regular las respuestas fisiológicas y conductuales frente a una amenaza. La respuesta adaptativa frente a una amenaza genera una respuesta rápida y ordenada que prepara y activa al organismo para generar una respuesta fisiológica, por lo que se activa el eje HPA, se libera corticotropina (CTP) y el LC comienza a liberar NE el cual llegará a sus dianas en el córtex, amígdala y CPFm para permitir la modulación de la excitación, el aprendizaje de amenazas y la atención. Sin embargo, el estrés crónico ocasiona cambios en la respuesta mediada por el LC ocasionando una hiperactividad y por lo tanto un aumento de NE, en la amígdala, en el LC, el HPC, el CPFm e incrementa la actividad del eje HPA, a consecuencia se eleva el cortisol y la NE generando síntomas fisiológicos inadaptados (70-73).

De la información anterior referente a las estructuras neuroanatómicas, la Figura 1 resume un esquema de los efectos que ocasiona el estimular las diferentes regiones cerebrales que están asociadas con la ansiedad, así como sus proyecciones las cuales muestran un papel fundamental en la ansiedad y aquellas que tienen un efecto basado en los neurotransmisores microinyectados en esas regiones.

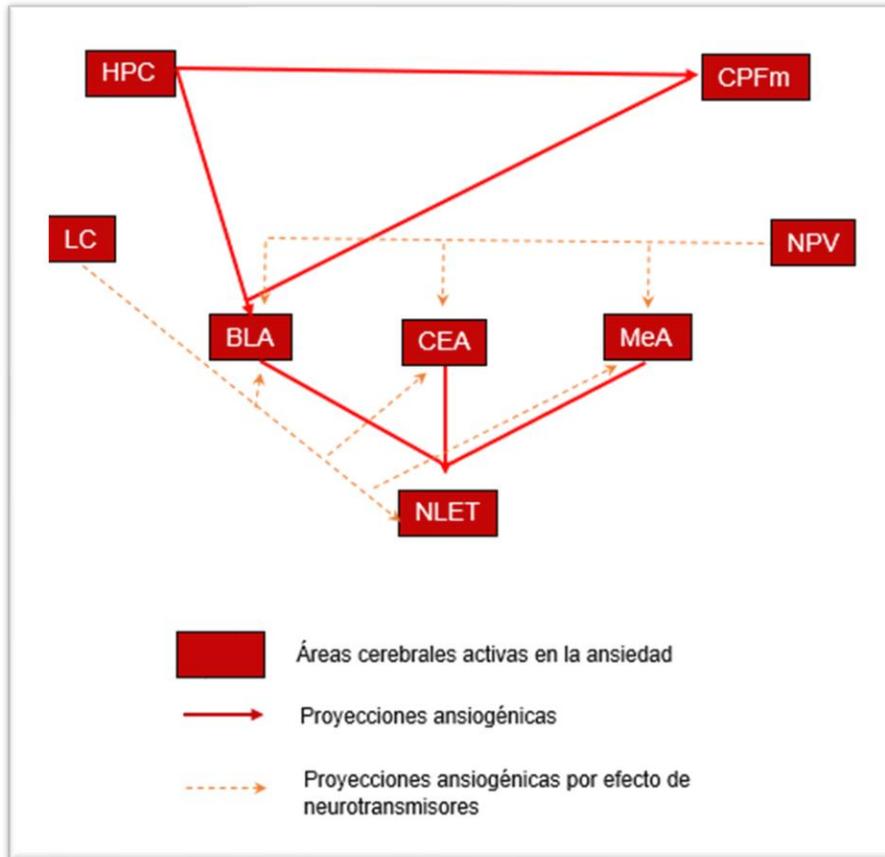


Figura 1: Áreas cerebrales implicadas en la ansiedad. HPC, hipocampo; CPFm, corteza prefrontal medial; LC, locus coeruleus; NLET, núcleo del lecho de la estría terminal; NPV, núcleo paraventricular del hipotálamo; BLA, amígdala basolateral; CEA, amígdala central; MeA, amígdala medial. **Adaptado de (74).**

1.8 Participación del eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal en los trastornos de ansiedad

La homeostasis en el eje HPA es fundamental para el sistema endocrino y para una cantidad importante de procesos y actividades fisiológicas como las respuestas al estrés y un estado psicológico saludable ya que involucra una serie de hormonas y de estructuras cerebrales en su funcionamiento. Por lo que la desregulación y la hiperactividad del eje HPA da lugar a numerosos problemas de salud como los TA (75, 76)

1.8.1 Hormonas involucradas en el eje Hipófisis-Pituitaria-Adrenal

1.8.1.1 Hormona liberadora de corticotropina

Es el factor liberador de corticotropina (CFR) un neuropéptido producido en subpoblaciones de neuronas en el NLET, en la CEA y en la CPFm (77, 78). Los péptidos relacionados con CFR ejercen su acción a través de dos receptores diferentes: los receptores: CFR1 y CFR2. Los receptores CFR1 se expresan en diversas regiones como la corteza cerebral, el cerebelo, el bulbo olfatorio, el septum medial, el HPC, la amígdala, la glándula pituitaria y en tejidos periféricos. La liberación continua de CFR en situaciones de estrés está implicada en procesos patológicos. Una alteración en el sistema CFR disminuye la expresión de CFR1 en núcleos del NLET se asocian con el desarrollo de trastornos de ansiedad, los antagonistas de CFR1 reducen el comportamiento similar a ansiedad en modelos animales. La expresión de los CFR2 está restringida pero muy presente en el septum lateral, medial y posterior, en el NLET, núcleo ventral medial del HPT, bulbo olfatorio y el núcleo del rafe dorsal actúa en conjunto con CFR1 oponiéndose al papel activador de este, generando así una respuesta atenuadora del estrés y de la ansiedad (79-81).

1.8.1.2 Hormona adrenocorticotrópica

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) se produce en la hipófisis anterior (pituitaria) y se encarga de regular la producción de cortisol y andrógenos. Sus receptores se encuentran en la corteza suprarrenal en la zona fasciculada, estos receptores se acoplan a proteínas G estimulando así la adenilil ciclasa (AC), lo que aumenta el monofosfato de adenosina (AMP) intracelular y la activación de la proteína cinasa A (PKA) (82, 83). La ACTH produce un efecto estimulador directo que actúa en las células adrenocorticales a través de receptores de melanocortina tipo 2, estos receptores al activarse aumentan la secreción de hormonas esteroides y la liberación de cortisol desde la zona fasciculada de la corteza suprarrenal. El

CFR es el encargado de controlar la expresión y secreción de la ACTH por medio de la regulación en la transcripción de proopiomelanocortina (84).

1.8.1.3 Cortisol

El cortisol es un glucocorticoide que se encuentra en todo el cuerpo, una vez liberado de la capa de la zona fasciculada de la corteza suprarrenal, ejerce sus efectos sobre la cognición a través de dos tipos de receptores: receptores mineralocorticoides (MR) se consideran receptores de tipo 1 y receptores de glucocorticoides (GR) se consideran receptores de tipo 2. Los MR se expresan en el HPC y se activan con niveles moderados de cortisol lo que conduce a efectos de mejora en la memoria. Los GR se encuentran en el HPC y CPF, estos se relacionan con efectos inhibitorios negativos y a medida que aumentan los efectos del cortisol los GR se activan cada vez más provocando efectos perjudiciales en la memoria y en los estados de ansiedad (85, 86).

1.8.2 Respuesta del eje Hipófisis-Pituitaria-Adrenal

El sistema de respuesta ante el estrés es un mecanismo complejo y multinivel que depende de la regulación por retroalimentación. En primer lugar, el estresor estimula al sistema simpático autónomo el cual es responsable de la respuesta más rápida y actúa a través de la secreción de epinefrina, lo que genera en el organismo respuestas de lucha-huida, incremento en la presión arterial y aumento en la conducta de sobresaltos. Minutos después de la segregación de epinefrina se activa el eje HPA y representa una serie de acontecimientos que comienzan con la secreción del CFR el cual activa el CFR1 desde el NPV a la circulación portal que estimula la liberación de ACTH por la pituitaria (87). ACTH viaja por el torrente sanguíneo hasta llegar a la corteza suprarrenal (porción externa de las glándulas suprarrenales que se encuentran sobre los riñones) y es así como comienza a segregar glucocorticoides, principalmente el cortisol. La mayor parte del cortisol se une a proteínas de unión en la sangre para viajar a todo el organismo y afectar

diversos sistemas como el cardiovascular, el metabolismo y el cerebro. Una vez que cortisol llega al cerebro este es detectado por el HPT con la finalidad de detener la secreción de más CFR y con ello una disminución en la secreción de ACTH, lo que ocasionará que se deje de liberar cortisol, este proceso de inhibición de cortisol se conoce como bucle de retroalimentación negativa (feed back negativo) y su finalidad es evitar la liberación excesiva de cortisol (88, 89). La retroalimentación negativa deteriorada en este proceso puede conducir a respuestas de estrés prolongadas o excesivas, como se ve en los trastornos de ansiedad (90). La Figura 2 resume la función del eje HPA.

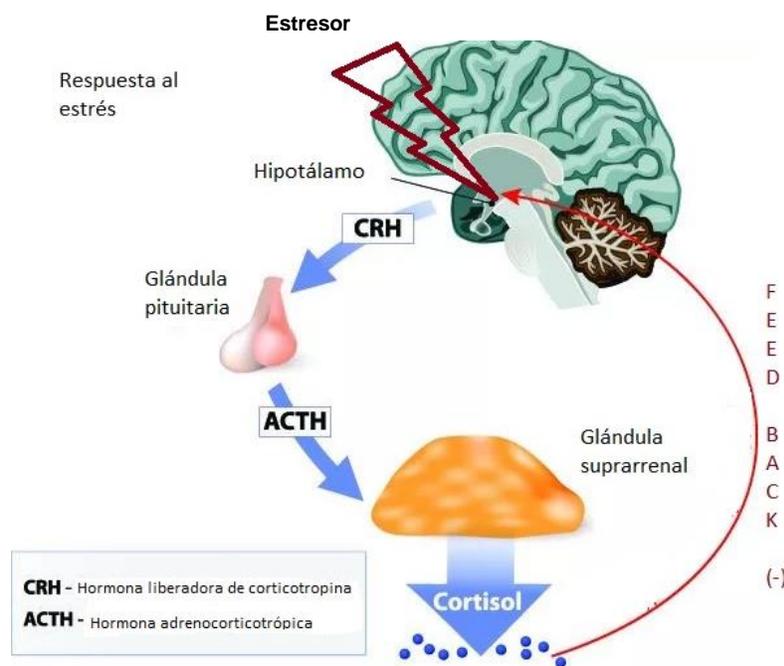


Figura 2: Funcionamiento del eje HPA. El estímulo estresor genera un estímulo en NPV donde se activa la secreción de CRH, esta viaja por la circulación portal hasta llegar a la glándula pituitaria para activar la liberación de ACTH, una vez que se libera viaja a través del torrente sanguíneo para llegar a la glándula suprarrenal y dar lugar a la liberación de cortisol. El cortisol una vez liberado, comienza a unirse a proteínas de unión en el torrente sanguíneo para dirigirse a todo el cuerpo, una vez que regresa al cerebro, el HPT lo detecta y comienza con el feed back negativo para evitar que se siga segregando ACTH y con ello más cortisol. **Adaptado de: (91).**

1.9 Neurotransmisores implicados en la ansiedad

Actualmente se sabe que los sistemas monoaminérgicos (5-HT, NE, DA) tienen un papel importante en la patogenia de los TA. Debido al aumento en su metabolismo y función, la NE es un neurotransmisor que está involucrado en la respuesta nerviosa autónoma que es responsable de los síntomas de ansiedad. La 5-HT involucra a las amenazas mediadas por la amígdala y las amenazas mediadas por la sustancia GP y la DA. GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio más importante en el SNC al actuar en este sistema neurotransmisor, las BZPs actúan disminuyendo la sintomatología de la ansiedad (92, 93).

1.9.1 5-HT

Las neuronas serotoninérgicas se originan en los núcleos del rafe y a su vez proporcionan una entrada a las estructuras involucradas en la regulación de los estados de ansiedad, principalmente la amígdala y NLET. Las proteínas transportadoras de recaptación de 5-HT de alta afinidad se encuentran en todo el cerebro en las neuronas 5-HT en el cuerpo celular y en los terminales sinápticos, estas se encuentran estables en la superficie neuronal. Extracelularmente las moléculas de 5-HT se unen al transportador y se trasladan al interior del cuerpo celular neuronal haciendo un intercambio de iones sodio, donde son metabolizadas o reabsorbidas a las vesículas para nuevamente ser liberadas, mediante este proceso se controlan los niveles sinápticos de 5-HT. Otro receptor importante es el autorreceptor 5-HT_{1A}, el cual se encuentra en las dendritas de los cuerpos celulares en los núcleos del rafe y postsinápticamente en las neuronas serotoninérgicas del HPC, el septo, la amígdala y la corteza entorrinal. El estrés prolongado ocasiona una modificación en los niveles cerebrales de 5-HT_{1A} lo que ocasiona una disminución de los niveles de 5-HT generando un aumento pronunciado de la actividad del eje HPA, lo que induce la secreción de corticoesteroides y la ACTH (94-96).

1.9.2 NE

El sistema noradrenérgico tiene función en el SNC y en el sistema nervioso periférico (SNP). En el SNC, tiene dos proyecciones ascendentes primarias originadas en el tronco encefálico, uno es el haz noradrenérgico dorsal el cual se origina en el LC quien está compuesto por neuronas noradrenérgicas y receptores subtipo α_1 , α_2 , β_1 y β_2 en la membrana presináptica y postsináptica. El SNC contiene aferencias hacia la corteza cerebral, HPC, el cerebelo y proyecciones hacia el haz noradrenérgico ventral, donde inervan la amígdala, el HPT y áreas del mesencéfalo y bulbo raquídeo. En el SNP, específicamente el simpático y en la médula suprarrenal, el sistema noradrenérgico actúa en las células cromafines neuroendocrinas, estas zonas son los principales responsables de la síntesis y exocitosis de NE y otras catecolaminas a la circulación sanguínea, para actuar sobre receptores alfa y beta adrenérgicas en las células del músculo liso y adiposo de todo el cuerpo. Al existir una activación por un estímulo, las neuronas noradrenérgicas del rombencéfalo liberan NE en diversas zonas del cerebro como la CEA, MeA y el NLET, ocasionando la activación del eje HPA y manifestándose como una alteración en la reactividad en circuitos neuronales que median respuestas conductuales y fisiológicas provocando efectos como dilatación de pupilas, aumento del ritmo cardiaco, constricción de los vasos sanguíneos, respuestas de lucha-huida (97-99).

1.9.3 DA

La DA es un neurotransmisor catecolaminérgico que desempeña un papel importante en procesos fisiológicos como la regulación de emociones y comportamientos. Los receptores dopaminérgicos se subdividen en dos categorías: la primera se compone de los D1 y D5, acoplados a sitios estimuladores G que activan la AC y está a su vez la producción del segundo mensajero monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que conduce a la producción de PKA. El segundo grupo de receptores (D2, D3, D4) se acoplan a sitios inhibidores G que inhiben la AC y activan los canales de K⁺. El receptor D1 es el más abundante en el SNC y D4 es

el menos abundante. Los receptores D1 y D5 presentan una alta densidad en el cuerpo estriado, área tegmental ventral, NA, el bulbo olfatorio y la sustancia negra mientras que D2, D3 y D4 se presentan en el cuerpo estriado, globo pálido externo, NA, HPC, amígdala y la corteza cerebral. La comunicación de las vías serotoninérgicas va desde el cuerpo estriado que contiene inervaciones dopaminérgicas mientras que el cuerpo estriado dorsal recibe aferencia dopaminérgica de la sustancia negra, el cuerpo estriado ventral recibe una entrada dopaminérgica del área tegmental ventral (VTA) y este a su vez proyecta a vías dopaminérgicas a varias estructuras corticolímbicas. El estrés activa el sistema mesolímbico dopaminérgico y aumenta el nivel de DA en la hendidura sináptica. La inhibición de la recaptación de DA induce efectos conductuales similares a la ansiedad en modelos animales. (100-102). La Figura 3 representa la vía dopaminérgica.

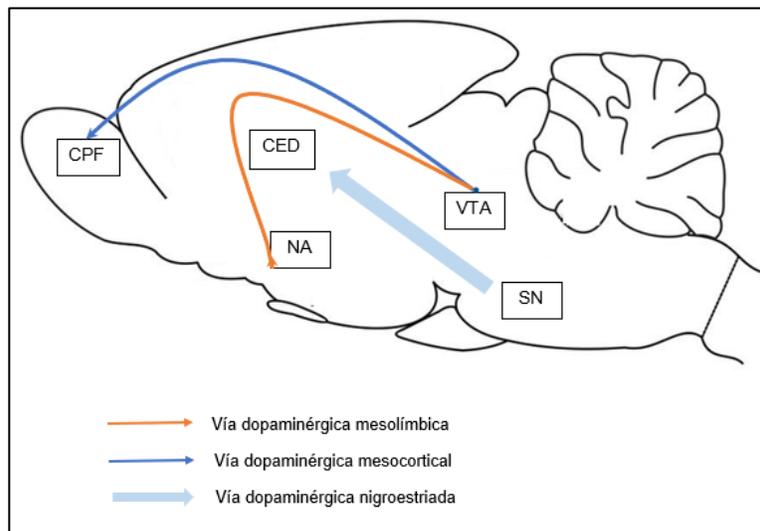


Figura 3: Ilustración esquemática de la vía dopaminérgica nigroestriada, mesolímbica y mesocortical. La proyección a la CPF y la vía dopaminérgica mesocorticolímbica se originan de la VTA. El sistema dopaminérgico mesolímbico y mesocortical está involucrado en la mediación de la ansiedad. VTA, área tegmental ventral; SN, sustancia nigroestriada; NA, núcleo accumbens; CED, cuerpo estriado dorsal; CPF, corteza prefrontal. **Adaptado de (100).**

1.9.4 GABA

Como ya se ha mencionado, GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC, reduce la excitabilidad neuronal al inhibir la transmisión nerviosa. Se encuentra en el HPC, CPF, amígdala, el tálamo, el HPT y el tronco encefálico. GABA se forma a partir de glutamato, una vez que se forma se libera en las terminales postsinápticas de las neuronas, sin embargo, la función del glutamato es excitatoria. Los receptores GABA se subdividen en GABA_A y el receptor metabotrópico subtipo B (GABA_B): GABA_A es un receptor ionotrópico con 5 subunidades: dos subunidades α con sitios de unión para GABA, benzodiazepinas y alcohol, una subunidad γ con sitios de unión para benzodiazepinas y alcohol y dos subunidades β con sitios de unión para GABA, anestésicos, esteroides y alcohol. Estas subunidades rodean un canal transmembrana de Cl⁻ activados por ligando. Cuando GABA interacciona con GABA_A se abren los canales de Cl⁻ para aumentar la entrada de este ion y así generar una hiperpolarización de la membrana y así reducir la excitabilidad de las neuronas postsinápticas lo que resulta en una inhibición fásica (esta alteración se relaciona con enfermedades psiquiátricas como los TA). Los agonistas de este receptor contribuyen a la disminución de la ansiedad a través de la inactivación temporal de la subregión infralímbica o la BLA (103-106). La Figura 4 muestra el receptor GABA_A y su composición.

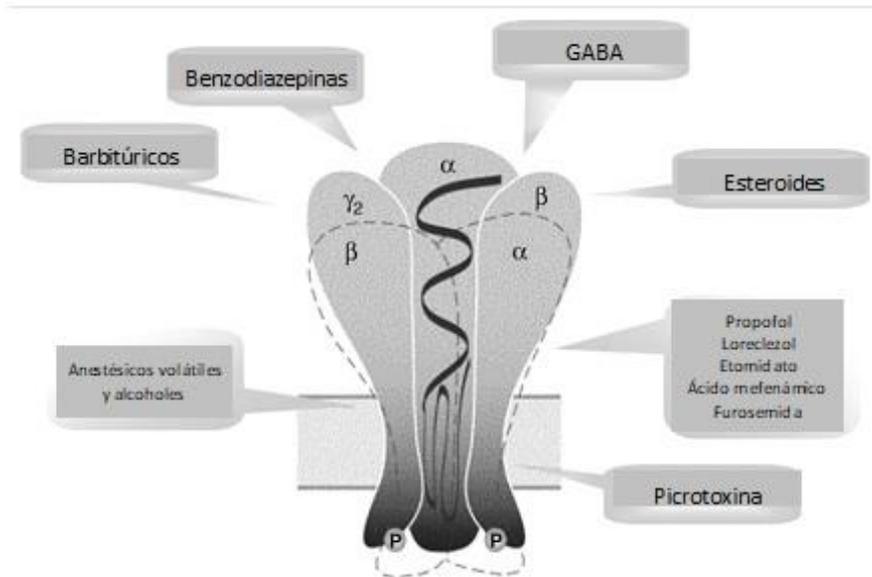


Figura 4: Representación esquemática del receptor GABA_A, estructura pentamérica con sus diferentes sitios de acción para fármacos que interactúan en este sitio. **Adaptada de (107).**

En cuanto a GABA_B es un receptor metabotrópico, compuesto por dos subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2}, son los responsables del componente tardío y más lento de la transmisión inhibitoria. Se encuentran antes y después de la sinapsis, la activación de estos receptores se acopla a canales de K⁺ y Ca²⁺ a través de una vía mediada por proteína G que posteriormente difunden y activan varias cascadas de señales intracelulares que contribuirán a la inhibición sináptica ya sea vía hiperpolarización debida a la inhibición de los canales postsinápticos de K⁺ o mediante el retraso en la liberación de neurotransmisor dada por la inhibición de los canales presinápticos Ca²⁺. Cambios en las neuronas GABAérgicas, la interrupción en alguna de las vías de señalización de GABA_B y la concentración de las isoformas están relacionadas con el desarrollo de los TA, mientras que el estrés crónico afecta la función de GABA_B presináptica y postsinápticamente en el NPV afectando la función del eje HPA (108-111).

1.10 Modelos experimentales en ansiedad

Los modelos animales de trastornos emocionales son utilizados para intentar reproducir características de trastornos psiquiátricos humanos en animales de

laboratorio, ya que correlacionan los cambios fisiológicos y de comportamiento. Estos modelos experimentales no pretenden replicar en los animales todas las características de un trastorno específico puesto que existen evidentes diferencias cognitivas entre especies (112). Los modelos experimentales para ansiedad miden únicamente variables fisiológicas y conductuales que se provocan cuando al animal se le expone a situaciones más o menos naturalistas y potencialmente ansiogénicas en condiciones controladas de laboratorio. Para ello se utiliza una serie de instrumentos o herramientas para medir parámetros relacionados con la ansiedad y se les denomina “pruebas”, las cuales se recomiendan utilizar en una batería para evaluar el fenotipo conductual de cada individuo en diferentes condiciones (113, 114).

Los modelos roedores de enfermedades psiquiátricas deben de tener validez aparente, de constructo y predictiva. Para ello, en la variable conductual a medir debe existir semejanza con las respuestas conductuales en el humano (validez aparente). Adicionalmente, el modelo debe ser sensible a agentes farmacológicos y causar el mismo efecto (ansiolítico, ansiogénico o no tener efecto) en el modelo animal y en el humano (validez de constructo). Finalmente, el modelo debe tener una respuesta identificable a los fármacos que generalmente funcionan en el humano, es decir, los factores biológicos subyacentes al trastorno que sean similares en animales y humanos (validez predictiva) (115, 116).

Trabajar con modelos animales ayuda a reducir los tiempos y costos de la investigación y son muy útiles cuando las consideraciones éticas dificultan e imposibilitan procedimientos paralelos en investigación humana, por lo que la investigación con animales incluye el trabajo con primates humanos y no humanos, peces cebra, felinos, caninos, roedores, entre otras especies. La más común es la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) la cual ha sido sujeto de investigación durante más de un siglo (117). Más de 30 modelos animales de ansiedad han sido propuestos y la mayoría de ellos son de naturaleza conductual. Se clasifican con base en las respuestas condicionadas o incondicionadas a los estímulos que se

creo son capaces de causar ansiedad en humanos (118). La Tabla 3 muestra los modelos animales en ansiedad más utilizados en ratas y ratones:

Tabla 3: Modelos experimentales en ansiedad de respuesta condicionada y respuesta no condicionada.

Respuestas condicionadas		Respuestas incondicionadas		
Prueba	Modelo	Prueba	Modelo	
Conflicto de Geller Seifter	Modelos basados en conflicto	Campo abierto	Comportamiento exploratorio	
Conflicto de Voguel		Laberinto elevado en cruz		
Estimulación cerebral eléctrica	Misceláneos	Laberinto en T elevado		
Evitación activa/pasiva		Tabla de agujeros		
Respuesta emocional condicionada		Test de exploración libre		
Enterramiento defensivo (sonda)		Test de interacción social		Comportamiento social
Sobresalto potenciado por miedo		Caja luz/oscuridad		Transición oscuro/claro
		Evitación de olores de depredadores		Antidepredador/defensa
	Hiponeofagia			

			Otros
		Respuesta de sobresalto	
		Congelación (no condicionada)	

Adaptado de: (114, 116, 119).

1.10.1 Modelo de respuestas condicionadas

El experimento Pavloviano es un ejemplo clásico de respuestas condicionadas. Los estudios de Pavlov mostraron que un estímulo neutral puede adquirir propiedades afectivas debido a una asociación con un estímulo biológicamente relevante. La adquisición del miedo condicionado se genera ante la presencia de un estímulo neutral (luz o sonido) que se combina con un estímulo aversivo (generalmente shock eléctrico leve) que genera un cambio conductual innato (cambio en el ritmo cardíaco, congelación) y después de emparejamientos repetidos, el estímulo neutral se vuelve un estímulo condicionado que provoca las respuestas condicionadas. Estas respuestas condicionadas se manifiestan como comportamientos anormales que caracterizan a los TA (hiperactividad, aislamiento social, déficit del aprendizaje) por lo que se utilizan para investigar fundamentos neurobiológicos de los circuitos inhibidores del miedo y ansiedad en el cerebro (120-123).

1.10.2 Modelo de respuestas incondicionadas

Los modelos etológicos intentan aproximarse a las condiciones naturales en las que se producen los estados emocionales de miedo y ansiedad. Estos modelos etológicos no necesitan entrenamientos complejos, emplean estímulos aversivos no dolorosos para inducir ansiedad y usan la naturaleza exploratoria del animal por un lugar novedoso, midiendo sus respuestas intuitivas a desafíos ambientales en contraste con su temor a las consecuencias que puede tener el exponerse a él. Los

estímulos que usan para inducir ansiedad son de naturaleza diversa como la exposición a áreas muy iluminadas, a las alturas, a espacios abiertos o al olor de algún depredador, etc. (124-126).

1.10.2.1. *Pruebas para la evaluación de la conducta tipo ansiedad*

1.10.2.1.1 *Campo abierto*

La prueba de campo abierto (OFT: Open field test) es la más utilizada para evaluar conductas tipo ansiedad. Consiste en un espacio cerrado con cuatro paredes altas y un suelo, este recinto debe cumplir con características como el tamaño, el material de construcción, el color, la opacidad y la reflectividad de las paredes y el suelo puesto que, si se ignoran o se consideran irrelevantes, tienen el potencial de alterar significativamente el comportamiento del animal (127). Por ello, es necesario que el aparato sea construido con madera y medidas de 60 centímetros de largo, 60 centímetros de ancho con las paredes de 60 centímetros de altura. Todo el aparato debe estar pintado de negro y el suelo dividido en 16 cuadrados espaciados uniformemente (15x15 cm) de los cuales, 4 cuadrados centrales serán la parte central y los 12 cuadrados restantes serán la periferia (128). OFT se basa en distintas aversiones del roedor como a entornos abiertos y grandes (agorafobia), bien iluminados y desconocidos pues se cree que filogenéticamente los roedores ven este tipo de entornos como peligrosos; es utilizada para observar la actividad motora general, la conducta exploratoria y ansiosa (129). El roedor se coloca en el centro o cerca de las paredes del aparato y se graba su actividad durante 5 minutos; las variables que se registran son las siguientes: locomoción, frecuencia de posición vertical, acicalamiento, tiempo de permanencia en el área central. Los roedores que presenten un aumento de la locomoción central y de la permanencia en el área central pueden interpretarse como una conducta no ansiosa, bajo un efecto de tipo ansiolítico del fármaco que se esté probando. Por el contrario, una conducta de tipo ansiosa se verá reflejada como un aumento del tiempo explorando la periferia del OFT, manteniéndose en contacto con las paredes (tigmotaxis) y evitando el área

central que consideran desprotegida (130, 131).

1.10.2.1.2 *Laberinto elevado en cruz*

El laberinto elevado en cruz (EPM: Elevated plus maze) es una prueba que mide la conducta tipo ansiedad; se basa en las tendencias naturales de los roedores para evitar lugares abiertos y elevados por representar una amenaza. Es de las pruebas más utilizadas ya que es sensible a los fármacos ansiolíticos, así como a los fármacos ansiogénicos (132, 133). Pellow *et al.*, fueron los responsables de modificar el laberinto que se utiliza en la actualidad; el EPM está conformado por dos brazos abiertos de cincuenta centímetros de largo y diez centímetros de ancho, dos brazos cerrados con las mismas dimensiones y con paredes de cuarenta centímetros de altura, de manera que los brazos abiertos queden enfrentados, ambos con un techo abierto. Esta prueba debe estar elevada cincuenta centímetros sobre el nivel del suelo y realizarse en un cuarto aislado con poca luz (75 lx). Inicialmente debe colocarse a la rata en el centro del aparato frente a un brazo abierto donde se le permitirá que explore libremente durante 5 minutos y su comportamiento será evaluado con una cámara montada por encima del laberinto (134). Las variables a examinar son: a) tiempo de permanencia en los brazos abiertos, número de entradas en brazos cerrados y número de entradas en brazos abiertos. Con estos parámetros, se puede calcular el índice de ansiedad cuyos valores oscilan entre 0 y 1, donde un aumento del índice expresa un aumento del comportamiento ansioso. El índice de ansiedad reúne los datos de cada uno de los parámetros individuales del comportamiento exploratorio en el EPM y los coeficientes aceptados utilizados hasta la fecha en un parámetro unificado, que refleja no sólo las medidas absolutas, sino que también indica una tendencia global (135). Para ser considerada entrada en alguno de los brazos, la rata tuvo que tener al menos $\frac{3}{4}$ partes de su cuerpo en esa zona, una conducta ansiosa se verá reflejada como un aumento de entradas y tiempo en los brazos cerrados (136).

En el EPM, contrarrestado con su curiosidad innata de explorar áreas novedosas,

un roedor con comportamiento menos ansioso irá frecuentemente hacia los brazos abiertos y expuestos del laberinto, mientras que un roedor con comportamiento muy ansioso, tenderá a pasar más tiempo en los brazos cerrados (137).

1.10.2.1.3 Tabla de agujeros

La prueba tabla de agujeros (HB: Holeboard), se originó a partir de la OFT, ha sido utilizada para evaluar la ansiedad y la respuesta al estrés en animales tras la exposición a un entorno desconocido. Ofrece un enfoque para estudiar diferentes patrones de comportamiento, la actividad locomotora y los posibles efectos de los fármacos neuroactivos sobre la ansiedad (138). Consiste en una arena cuadrículada de cuarenta centímetros por cuarenta centímetros con fondo negro de dieciséis agujeros de tres centímetros de diámetro, en esta prueba se introduce al roedor dentro de la arena durante 5 minutos (139). El patrón de comportamiento más estudiado en esta prueba es la inmersión de la cabeza en los agujeros; los altos niveles de inclinación de la cabeza se interpretan como indicativos de neofobia, y reflejan un estado tipo ansiedad en el roedor (140-142).

1.11 Fruto de granado

1.11.1 Generalidades

La granada es considerada un fruto ancestral venerado en diferentes culturas por lo que tiene diferentes significados. En la tradición judía se decía que las 613 semillas que tenía la granada representaban los 613 mandamientos de la Torá. En otras tradiciones se cree que las semillas de granada favorecen a la fertilidad y se han asociado como un símbolo de la diosa del amor Afrodita (143, 144). En el budismo se considera una de las tres frutas sagradas, en la cultura china está ampliamente representada en la cerámica y denota abundancia, posteridad y descendencia numerosa y virtuosa con un futuro santificado (145). Es el primer fruto en ser domesticado, nativo de Irán, distribuido y cultivado gradualmente en las regiones

centrales de Asia al Himalaya, el oriente medio y en áreas del mediterráneo, incluyendo a España, China, Marruecos y Afganistán; este último es famoso por producir granadas de alta calidad mientras que Irán es uno de los grandes productores a nivel mundial (146). La granada presenta una amplia distribución debido a su adaptación en climas trópicos y subtropicos (147).

1.11.2 Clasificación taxonómica

Existen únicamente dos variedades conocidas de la especie *Punica*: *Punica granatum* L. (*P. granatum*) y *Punica protopunica* B, se clasifica de esta forma debido a la diferencia de hábitats, dado que *Punica protopunica* B. es endémica de la región de Socotra (148, 149). *P. granatum* es el nombre científico del fruto que proviene del árbol del granado (150), esta especie fue conocida como *Malum punicum* (manzana de Cartago) después Linneo eligió el nombre actual con el epíteto específico de *granatum* que significa granulado, por ello lleva la letra “L” al final (151). Anteriormente se clasificó en la familia *Punicaceae*, sin embargo, una nueva clasificación lo ubica en la familia *Lythraceae* (152, 153). La Tabla 4 muestra la jerarquía taxonómica de este género.

Tabla 4: Clasificación taxonómica de *P. granatum*

Clasificación	Denominación
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Familia	<i>Lythraceae</i>
Género	<i>Punica</i>
Especie	<i>granatum</i>

Adaptado de: (153, 154).

1.11.3 Morfología

1.11.3.1 *El árbol*

El granado es un atractivo arbusto caducifolio de hasta 3-8 metros de altura con hojas perennes de uno a diez centímetros de longitud, espinosas, estrechas, oblongas y de tallo corto, dispuestas en grupos de cinco a seis ramas. El árbol conserva sus hojas perennes en las áreas trópicas y se mantienen caducas en las áreas templadas y subtrópicas. Las flores miden tres centímetros de ancho y son características debido a su coloración roja con sépalos puntiagudos y numerosos estambres, presentes de dos a siete flores en la periferia de cada rama (149, 155). El fruto se comienza a dar en el segundo o tercer año después de su plantación y necesita de suelos húmedos durante la temporada de crecimiento para ayudar a la producción de esta. El granado comienza a florecer a principios de mayo y de diez a quince días después comienzan a formarse los frutos. Un solo árbol puede tener hasta 5000 flores si la condición climática lo permite, una vez que estas flores son polinizadas por las abejas, la granada comienza a madurar en un lapso de 120 a 160 días (156).

1.11.3.2 *El fruto*

El fruto del granado botánicamente se le denomina balausta ya que es una baya pulposa de unos seis a doce centímetros de diámetro, coronada por un cáliz prominente que se mantiene hasta la madurez y es distintivo del fruto de la granada. La cáscara se compone de dos partes, por fuera es una piel gruesa, coriácea con coloraciones que pueden variar del amarillo rojizo al verde con zonas rojizas e incluso puede ser de coloración rojo escarlata según la variedad y la fase de maduración, botánicamente se le conoce como pericarpio. El mesocarpio es la parte interna del fruto y es donde se dividen los lóbulos que contienen unidas las semillas (arilos) los cuales son granos en forma prismática recubiertos por una capa llamada sarcotesta. Los arilos son la porción comestible del fruto, varían de un color rojo

intenso a incoloro, su número puede llegar a 1,300 por fruto; dentro de estos se encuentra el jugo (144, 157-159).

1.11.4 Composición nutrimental

La granada es una fruta con bajo contenido energético que con 100 g de porción aportan tan solo 34 Kcal. Está conformada por fibra, carbohidratos, proteínas, algunas vitaminas hidrosolubles y minerales mientras que las semillas tienen un gran contenido de ácidos grasos (Tabla 5).

Tabla 5: Composición nutrimental del fruto

Granada	Por 100 g de porción comestible
Energía (Kcal)	34.0
Proteínas (g)	0.7
Lípidos totales (g)	0.1
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	0.05
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	0.06
Ácidos grasos saturados (g)	0.04
Colesterol (mg)	0.0
Hidratos de carbono (g)	7.5
Fibra (g)	0.2
Agua (g)	91.5
Ceniza (g)	0.6
Calcio (mg)	8.0
Hierro (mg)	0.6
Yodo (µg)	0.0
Magnesio (mg)	3.0
Zinc (mg)	0.3
Sodio (mg)	5.0
Potasio(mg)	275.0
Fósforo (mg)	15.0
Selenio (µg)	0.6

Tiamina (mg)	0.02
Riboflavina (mg)	0.02
Equivalentes niacina (mg)	0.3
Vitamina B6 (mg)	0.11
Folatos (μg)	0.0
Vitamina B12 (μg)	0.0
Vitamina C (mg)	5.7
Vitamina A: Eq. Retinol (μg)	3.5
Vitamina D (μg)	0.0
Vitamina E (mg)	0.0
Aminoácidos	
Glutamina	0.52
Glicina	0.41
Serina	0.11
Histidina	0.22
Ácido aspártico	0.30
Arginina	0.23
Leucina	0.19
Isoleucina	0.1
Valina	0.14
Prolina	0.14
Alanina	0.19
Lisina	0.19

Adaptado de: (160-162).

1.11.5 Composición fitoquímica

Gracias a los avances tecnológicos se ha encontrado que la granada posee múltiples compuestos fitoquímicos, los cuales se han identificado en varias partes del árbol y del fruto de la granada (jugo, semillas, cáscara, flores, hojas del árbol, raíces). El mayor contenido de fitoquímicos en la granada son los polifenoles e incluye: flavonoles, flavalonas y antocianinas. Así como taninos (proantocianidinas, elagitaninos y galotaninos). Otros compuestos fitoquímicos encontrados son los

ácidos orgánicos y ácidos fenólicos, tripterpenos y esteroides. La raíz y corteza del árbol de granada se encuentra principalmente punicalina A, B, C Y D, punigluconina, punicalina y punicalagina (163, 164). En las hojas encontramos gran contenido de kaempferol, ácido elágico, ácido gálico, quercetina, rutina (165) mientras que en las flores posee alto contenido de punicaninas A y B, brevifolina y gemina D (166). La cáscara contiene principalmente punicalina, punicalagina y pedunculagina (167). En el jugo de granada se encontró abundante contenido en ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico y galotaninas, punicalagina y punicalina mientras que en las semillas contienen principalmente hormonas esteroideas humanas como estrona, estriol, estradiol y testosterona (166, 168). La Tabla 6 resume los fitoquímicos encontrados en diferentes partes del fruto.

Tabla 6: Componentes fitoquímicos de diferentes partes del fruto.

Parte de la granada	Clase de fitoquímico	Referencia
Raíz Corteza del árbol	Elagitaninos y galotaninas: <ul style="list-style-type: none"> • Castalagina • Casuarina • Casuarinina • Corilagina • Pedunculagina • Punigluconina • 2-O-Galoil-(4S,6S)-galagoil-D-glucosa • 2,3-(S)-HHDP-D-glucosa • Punicalina A, B, C y D • Punicalina • Punicalagina • Ácido elágico Flavonoles: <ul style="list-style-type: none"> • Quercetina-3,4'-dimetil eter 7- O-α-L-arabinofuranosa-(1-6)-β-D-glucósido 	(163, 164, 169)

	<p>Esteroles y terpenos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Friedooleanan-3-ona <p>Alcaloides:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N-metil peletierina • Sedridina • Pseudopeletierina • Nor-pseudopeletierina • 2,3,4,5-tetrahidro-6-propenilpiridina • 3,4,5,6-tetrahidro-a-metil-2-piridina etanol <p>Otros compuestos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Manitol 	
Cáscara	<p>Elagitaninos y galotaninos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2,3-(S)-HHDP-D-glucosa • Granatina B • Punicalagina <p>Catequina y procianidinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Catechin-(4,8)-galocatequina • Galocatequina • Galocatequina-(4,8)-catequina • Galocatequina-(4,8)- galocatequina <p>Flavonoles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kaempferol • Luteolina • Quercetina • Quercetin-3,4'-dimetil éter 7- O-α-L-arabinofuranosa-(1-6)-β-D-glucósido 	(167, 170, 171)
Pericarpio	<p>Elagitaninos y galotaninos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Casuarinina • Corilagina • Granatina A 	(163, 172, 173)

	<ul style="list-style-type: none"> • Pedunculagina • Teligramadina I • Punicalina • Punicalagina • Terminalina/galaildilacton • Ácido elágico 	
Hojas	<p>Elagitaninos y galotaninos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corilagina • Cíclic 2,4:3,6-bis (4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) 1-(3,4,5-Trihidroxibenzoate) b-D-Glucosa • Punicafolina • Estricnina • Telimagradina I • Tercataina • 5-O-galoil-punicacorteina D <p>Flavonoles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apigenina-4'-O-β-D-glucósido • Luteolina-3'-O-β-D-glucósido • Luteolina-4'-O-β-D-glucósido • Luteolina-3'-O-β-D-Xilosido • Eriodictiol-7-O-α-L-arabinofuranosil (1-6)-β-Dglucosido • Naringenina 4'-metilether 7-Oα-L-arabinofuranosil (1-6)-β-D-glucósido <p>Derivados de galoil simple</p> <ul style="list-style-type: none"> • Brevifolina • Ácido carboxílico de brevifolina • Ácido-10-carboxílico de brevifolina monosulfato 	(165, 174, 175)

	<ul style="list-style-type: none"> • 1,2,3-Tri-O-galoil-β-D-glucosa • 1,2,4-Tri-O-galoil-β-D-glucosa • 1,2,6-Tri-O-galoil-β-D-glucosa • 1,4,6-Tri-O-galoil-β-D-glucosa • 1,3,4-Tri-O-galoil-β-D-glucosa • 1,2, 4, 6-Tetra-O-galoil-β-Dglucosa • 1,2,3,4, 6-Pent-O-galoil-β-Dglucosa • 3,4,8,9,10-pentahidroxidibenzo[b,d]pirano-6-ona <p>Esteroles y terpenos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • β-Sitosterol <p>Alcaloides:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1-(2,5-dihidroxi-fenil)-cloruro de piridio 	
Semillas	<p>Antocianinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Delfinidina-3-glucósido • Delfinidina-3,5-diglucósido • Cianidina-3-glucósido • Cianidina-3,5-diglucósido • Pelargonidina-3-glucósido • Pelargonidina-3,5-diglucósido <p>Ácidos grasos y triglicéridos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tri-O-punicilglicerol • Di-O-punicil-O-octadeca-8Z-11Z-13E-trienilglicerol <p>Elagitaninos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Punicalina • Punicalagina <p>Esteroles y terpenos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido asiático • Ácido betulínico 	(165, 176, 177)

	<ul style="list-style-type: none"> • Daucosterol • Ácido ursólico <p>Flavonoles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kaempferol <p>Otros compuestos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coniferil 9-O-[β-D-apiofuranosil-(1-6)]-O-β-D-glucopiranosido • Sinapil 9-O-[β-D-apiofuranosil-(1-6)]-O-β-D-glucopiranosido • Feniletil rutinósido • Icarisido D1 <p>Derivados del ácido elágico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido elágico 3,3'-di-O-metil • Ácido elágico 3,3',4'-tri-O-metil 	
Fruto	<p>Elagitaninos y galotaninos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corilagina • Ácido elágico <p>Flavonoles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kaempferol • Luteolina • Miricetina • Quercetina • Quercimeritrina • Quercetina-3-O-rutinósido 	(177, 178)
Flores	<p>Elagitaninos, galotaninos y derivados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Granadata • Punicataninos A y B • 3-oxo,3,3a,8b-tetrahidrofuro[3,4 b]benzofurano • Brevifolina 	(166, 177)

	<ul style="list-style-type: none"> • Etilbrevifolina • Hipomanina A • Gemina D <p>Derivados del ácido elágico:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido gálico <p>Flavonas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Luteolina • Tricetina <p>Flavanonas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Punicafavanol • Granatumolavanil xilósido <p>Lignanos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Punicatanino C <p>Ácidos orgánicos y fenólicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido fumárico • Ácido oxálico • Ácido quínico • Ácido succínico • Ácido benzoico • Ácido cinámico • Ácido 7,8-dihidroxi-3-carboximetilcumarina-5-carboxílico 	
Jugo	<p>Antocianinas y antocianidinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cianidina • Cianidina-3-glucósido • Cianidina 3,5-diglucósido • Cianidina-3-rutinosida • Delfinidina • Delfinidina-3-glucósido • Delfinidina 3,5-diglucósido 	(168, 177, 179)

- Pelargonidina 3-O-glucósido
- Pelargonidina 3,5-di-O-glucósido
- Malvidina
- Epicatequina-delfinidina-hexosido

Derivados del ácido elágico:

- Ácido gálico

Catequinas y procianidinas:

- (-)-Catequina
- Epicatequina
- Procianidina B1
- Procianidina B2

Elagitaninos:

- Punicalagina
- Punicalina
- Ácido carboxílico brevifolina
- Pedunculagina
- Granatina A/ largestanina A
- Punigluconina 1 y 2
- Causarinina
- Ácido elágico

Flavonoles:

- Quercetina
- Isoquercetina
- Rutina
- Procianidina dímero (1-5)
- Epigalocatequina-3-galato
- Flavan-3-ol
- + (-) galocatequina
- Kaempferol

Ácidos orgánicos:

	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido succínico • Ácido cafeico • Ácido clorogénico • Ácido cinámico • Ácido cítrico • Ácido p-cumárico • Ácido o-cumárico • Ácido hidroxicinámico • Ácido tartárico • Ácido ferúlico • Ácido fumárico • Ácido oxálico • Ácido L-málico • Ácido protocatecuico • Ácido quínico • Ácido tartárico • Ácido linoleico <p>Ácido hidroxibenzoico y derivados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido vanílico • Hexóxido de ácido hexahidroxi-difénico • Digaloil-hexóxido 1 • Éster galoil • Hexóxido de digaloil hexahidroxi-difenilo 1 y 2 <p>Alcaloides:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peletierina 	
Aceite de semillas	<p>Ácidos grasos y triglicéridos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido eicosanoico • Ácido linoleico • Ácido linolénico • Ácido araquídico • Ácido behénico 	(180, 181)

	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido lignocérico • Ácido oleico • Ácido palmítico • Ácido punicico • Ácido esteárico • N -palmitoil cerebrósido • 1-O-trans, cis, trans, octadecatrienol glicerol • 1-0-isopentil-3-O-octadeco-2-enoil glicerol <p>Esteroles y terpenos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colesterol • Estrona • Estradiol • Estriol • B-sitosterol • Estigmasterol • Testosterona 	
Arilos	<p>Antocianinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cianidin-3-O-glucósido • Cianidin-3,5-di-O-glucósido • Delfinidin-3-O-glucósido • Delfinidin-3,5-di-O-glucósido • Pelargonidina-3-O-glucósido • Pelargonidina-3,5-di-O-glucósido <p>Ácidos hidroxicinámicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido p-cumárico • Ácido clorogénico • Ácido cafeico <p>Derivados del ácido elágico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido gálico • Ácidos orgánicos y fenólicos • Ácido ascórbico 	(166, 176, 182, 183)

	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido fumárico • Ácido oxálico • Ácido quínico • Ácido succínico • Ácido tartárico 	
--	--	--

1.11.6 Usos en la medicina tradicional

La granada ha sido conocida en diversas civilizaciones y culturas debido a que se le ha atribuido diversos significados (símbolo de vida, fertilidad, permanencia, feminidad, conocimiento e inmortalidad), a su vez, todos los componentes del fruto y árbol de granada (corteza, raíz, flores, fruto, jugo, arilos y hojas) se han utilizado como remedio curativo (184). El remedio curativo más famoso en todo el mundo ha sido su efecto ténida y vermífugo, obtenido de la raíz y corteza del árbol mientras que el segundo remedio más popular se obtiene de la decocción de la cáscara de granada como tratamiento para la disentería, diarrea y estomatitis (185). En la medicina tradicional se han utilizado decocciones e infusiones de las flores y cáscara del granado para tratar diarreas, enfermedades estomacales, infecciones vaginales e inflamación del páncreas (186). Estudios *in vitro* e *in vivo* han permitido encontrar que el fruto del granado posee propiedades antiinflamatorias, antiateroescleróticas, anticancerígenas y es un buen tratamiento contra la osteoartritis y las enfermedades cardíacas, además de encontrar que ácido púnicico presente en el aceite de semillas de granada tiene la capacidad de actuar sobre el gen supresor de tumores PTPRG y con ello la capacidad de prevenir el desarrollo de cáncer (187). Gracias a los avances tecnológicos, estudios recientes han podido demostrar que la granada posee efecto neuroprotector frente a varios trastornos neurodegenerativos (188, 189). La Tabla 7 describe algunas de las propiedades funcionales encontradas en la granada y sus componentes.

Tabla 7: Partes de la granada con propiedades funcionales.

Propiedad funcional	Partes de la granada	Referencias
Capacidad antioxidante: Prevención del estrés oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> • Cáscara • Jugo • Arilos 	(179, 186, 187, 190-192)
Efecto vasculoprotector: Actividad anti-ateroesclerótica Actividad hipolipemiente Actividad hipotensora	<ul style="list-style-type: none"> • Jugo • Cáscara • Hojas • Raíz 	(143, 179, 187, 190, 192)
Efecto gastroprotector: Protección de la mucosa gástrica Protección contra colitis Actividad antidiarreica	<ul style="list-style-type: none"> • Cáscara 	(186, 190)
Actividad antiinflamatoria: Artritis reumatoide	<ul style="list-style-type: none"> • Aceite de semillas • Jugo 	(166, 179, 186, 190)
Efecto nefroprotector	<ul style="list-style-type: none"> • Jugo • Cáscara 	(193, 194)
Actividad antimicrobiana: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium patulum</i> <i>Penicillium ruqfortii</i> <i>Aspergillus achraceous</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Arilos • Jugo • Cáscara • Hojas • Extracto del fruto entero 	(150, 179, 187, 190, 192, 195, 196)

<i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio cholera</i>		
Actividad anticancerígena y antiproliferativa: Cáncer de colon Cáncer de próstata Cáncer de mama Cáncer de piel Cáncer de vejiga Cáncer de pulmón Cáncer bucal Leucemia	<ul style="list-style-type: none"> • Jugo • Hojas • Aceite de semillas 	(166, 179, 186, 190, 192, 197)
Actividad neuroprotectora: Alzheimer Demencia Parkinson Depresión Ansiedad	<ul style="list-style-type: none"> • Jugo • Hojas • Semilla • Aceite de semillas • Cáscara 	(143, 179, 188-190, 198-200)
Actividad antinociceptiva	<ul style="list-style-type: none"> • Cáscara • Jugo 	(201-203)
Enfermedades metabólicas: Actividad anti-diabética Actividad anti-obesidad	<ul style="list-style-type: none"> • Jugo • Cáscara • Flores • Hojas 	(166, 179, 183, 204, 205)
Propiedad estrogénica / antiestrogénica	<ul style="list-style-type: none"> • Jugo • Cáscara • Hojas • Aceite de semillas 	(143, 192, 200, 206)

1.12 Toxicidad

Los diversos compuestos obtenidos de diferentes partes de la granada se han utilizado durante siglos y a la fecha no se han encontrado efectos toxicológicos (197). Una administración de comprimidos de extracto de granada de 1420 mg/día en humanos no generó tóxicos sobre la función hepática y renal (196). Por otro lado, la administración vía oral en tratamiento subagudo de un microencapsulado de jugo de granada en dosis de 5000 mg/kg en ratas Wistar macho, no provocó cambios clínicos o lesiones macroscópicas ni muerte, asimismo, la administración vía oral en tratamiento subcrónico de 3000 mg/kg en ratones CD-1 durante 90 días, tampoco causó la muerte, ni afectaciones en el hígado y riñón, ni provocó cambios clínicos (207).

II. ANTECEDENTES

2.1 Efecto ansiolítico de la granada

Existen pocos estudios del efecto ansiolítico de la granada y aún se desconocen los mecanismos de acción por los que se presenta este efecto. En este sentido Kumar *et al.*, 2008, estudiaron en ratones macho albinos suizos el efecto de la administración única de un extracto etanólico de semillas de granada (EESM 100, 250 y 500 mg/kg, i.g), utilizando como fármaco de referencia DZP (1 mg/kg, i.g). Se utilizó la prueba de EPM para evaluar la conducta similar a ansiedad, 60 minutos posterior a la administración de los tratamientos. Los autores encontraron que el EESM en todas sus dosis, así como el DZP, mostraron mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos y una reducción en el tiempo de permanencia en los brazos cerrados, en comparación con el grupo control. Adicionalmente, al extracto se le realizó un análisis de fitoquímicos que revelaron la presencia de flavonoides, taninos y saponinas a las que les fue atribuido el efecto ansiolítico por su sitio de unión a los receptores GABA_A (208).

Riaz y Khan, 2014 (209) evaluaron el efecto del jugo de granada (PJ 2, 5 y 8 ml/kg) sobre la ansiedad inducida en ratas Wistar macho, usando como fármaco de referencia DZP (25 y 3 mg/kg), los tratamientos fueron administrados durante 15 días por vía i.g. Para analizar el comportamiento se utilizó prueba de OFT y EPM, las cuales se aplicaron al día 8 y al día 15 de la administración de los tratamientos. Este estudio demostró que el PJ en dosis de 5 y 8 ml/kg, así como el DZP, en OFT mostraron un efecto significativo al mostrar mayor tiempo de locomoción y mayor tiempo de permanencia al centro en comparación con grupo control en ambos días de la prueba. Mientras que, en el EPM se encontró mayor número de entradas a los brazos abiertos y menor tiempo el brazo cerrado. Por lo tanto, los autores concluyen que PJ es más eficaz en dosis moderadas y altas por sus efectos estimulantes del SNC, ansiolíticos y antidepresivos en los modelos animales propuestos. Sin embargo, se requieren más estudios farmacológicos para vislumbrar el mecanismo de acción de los componentes del jugo.

Das y Sarma, 2014 (210), evaluaron en ratones machos albinos suizos el efecto ansiolítico del extracto etanólico de hojas de granada (EEPG 100 y 200 mg/kg), el fármaco de referencia utilizado fue DZP (2 mg/kg), todos los tratamientos se administraron por vía i.p. La actividad ansiolítica se evaluó utilizando las pruebas de EPM y cámara de espejo. Los autores encontraron que, en el EPM, el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos fue significativamente mayor en los grupos de EEGP comparado con el grupo control, sin embargo, los efectos fueron menores comparado con el DZP. En la cámara de espejos, la latencia dentro de la cámara fue menor, pero el número de entradas, el tiempo total empleado por entrada y el tiempo medio por entrada fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Este estudio indica que el extracto etanólico de hojas de granada posee una importante actividad ansiolítica.

Jahromy *et al.*, 2014, analizaron la actividad ansiolítica de PJ (5, 10 y 20 ml/kg i.g.), buspirona (BPR 5 mg/kg i.p.) y magnesio (Mg 50 mg/kg i.g.), así como combinaciones de PJ/BPR (5 ml/kg + 5 mg/kg), PJ/Mg (5 ml/kg + 50 mg/kg) y

BPR/Mg (5 mg/kg + 50 mg/kg) administrados durante 10 días consecutivos en un modelo animal de ratones macho, el análisis del comportamiento se realizó únicamente en la prueba EPM. Sus resultados mostraron que PJ a todas sus dosis, presentaron efecto de tipo ansiolítico, mayor tiempo de permanencia y mayor porcentaje de entradas en los brazos abiertos. Los grupos que presentaron mayor efecto ansiolítico fueron PJ (5 y 10 ml/kg), PJ/Mg y un menor efecto con la combinación de PJ/BPR y PJ/Mg. Estos resultados indican que la granada y el Mg podrían actuar de manera similar en el receptor 5-HT_{1A} pero no fue similar con la combinación con buspirona debido a que aparentemente producen una acción competitiva sobre el mismo receptor (211).

Kalshetti *et al.*, 2015 probaron el efecto ansiolítico de un extracto de cáscara de granada (HEPG), utilizaron ratas macho Sprague Dawley a las cuales se les realizó una bulbectomía olfatoria (OBX) para provocarles cambios conductuales, 14 días después de la cirugía se dividieron en seis grupos: grupo 1 (sin cirugía y solución salina), grupo 2 (OBX y agua destilada), grupo 3 (fluoxetina 30 mg/kg), grupo 4, 5 y 6 con OBX y HEPG (10, 30 y 100 mg/kg), todos los tratamientos se administraron oralmente durante 14 días. La prueba de OFT y la de alimentación suprimida por novedad (NSF), se realizaron posteriormente al concluir el tratamiento. Los resultados obtenidos en el OFT indicaron que los grupos 4-6 mostraron mayor actividad central en comparación con el grupo tratado con fluoxetina, mientras que en el NSF las ratas con OBX mostraron una menor latencia a la alimentación y no estaban hiperactivas, el tratamiento con HEPG en las dosis superiores (30 y 100 mg/kg) tuvo menor latencia a la alimentación. Los autores concluyeron que el HEPG posee efecto ansiolítico del cual aún se desconocen sus mecanismos de acción (212).

El estudio de Kulkarni *et al.*, 2016 evaluó el efecto ansiolítico del PJ y realizó una prueba de toxicidad oral aguda en un modelo animal de ratones macho albinos, administrando dosis de (PJ de 50, 100, 200, 400, 800, 1000 y 2000 ml/kg), durante 48 horas que duró el periodo del estudio. Al no encontrar toxicidad, estas dosis

fueron consideradas seguras por lo que se utilizaron (PJ de 100, 200 y 400 ml/kg) así como DZP (2 mg/kg), administrados por vía i.g una vez al día durante 8 días consecutivos. El día 8, una hora después de la administración de los tratamientos, se realizaron las pruebas comenzando por EPM y finalizando en HB. Se encontró que PJ tuvo efecto dosis dependiente, lo que ocasionó una menor conducta similar a ansiedad al igual que el DZP, reflejada como un mayor número de entradas y tiempo de permanencia en brazos abiertos en comparación con el grupo control. En el HB, el PJ a dosis de 200 y 400 mg/kg, así como el DZP, mostraron mayor tiempo, mayor número de inserciones de cabeza y de la posición vertical. Estos resultados se atribuyen a que PJ posee un mecanismo de acción similar al DZP actuando en los receptores de las BZDs (213).

Riaz y Khan, 2017 (214), analizaron los efectos en el comportamiento de la administración PJ en combinación con jugo de limón (C) en dos dosis combinadas CPJ-1 (0.4 + 5 ml/kg) y CPJ-2 (0.2 + 8 ml/kg), administrados por vía i.g durante 14 días, en ratas Wistar macho. El efecto ansiolítico se registró dos veces durante 15 días utilizando las pruebas de OFT y EPM. En la prueba OFT, CPJ-1 mostró mayor distancia recorrida, mayor número de entradas centrales y número de posición vertical, mientras que, en el EPM, mayor número de entradas en brazos abiertos. Estos resultados sugieren que la combinación CPJ-1 posee efecto ansiolítico y que probablemente actúan de manera sinérgica.

Gadouche *et al.*, 2020, probaron un extracto metanólico de cáscara de granada (EMCG 500 mg/kg) durante 4 horas por día, seguido de la administración de acetato de plomo (ACP, 1000 ppm) durante 20 horas, para inducir neurotoxicidad, administrados durante 90 semanas en ratones hembra. Las pruebas de comportamiento utilizadas fueron OFT, caja luz/oscuridad, prueba de nado forzado, también se midió concentración de plomo y daños ocasionados en el cerebro. Los análisis estadísticos mostraron en el OFT, que el ACP ocasionó daño cerebral reflejado en hiperactividad locomotora. En la prueba de caja luz/oscuridad el ACP hubo mayor tiempo de permanencia en el compartimiento oscuro en comparación

con el grupo control mientras que el grupo del EMCG no tuvo diferencias significativas en comparación con el grupo control. En la prueba de nado forzado el ACP ocasionó mayor tiempo de inmovilidad mientras que el EMCG tuvo menor tiempo de inmovilidad. Finalmente, en el análisis de tejido cerebral, el grupo control presentaba estructuras cerebrales normales, mientras que los cerebros de las ratas tratadas con el ACP, presentaron lesiones microscópicas en diferentes áreas de la corteza cerebral y el HPC, así como degeneración neuronal, vascular, congestión e inflamación infiltrada a diferencia de los cerebros de las ratas tratadas con el EMCG que presentaban menor neurodegeneración y vacuolización que los controles y las ratas intoxicadas. Los autores atribuyen al EMCG un efecto neuroprotector mediante la inhibición de colinesterasa, así como una estimulación de la capacidad antioxidante y reducción del estrés oxidativo (215).

Otro estudio en granada, Estrada *et al.*, 2020, analizó un extracto acuoso (EA) en un modelo animal con ratas Wistar hembra, ovariectomizadas y obesas (216). Las ratas fueron alimentadas con dieta de cafetería (carbohidratos y grasas saturadas) para inducirles obesidad y a la par, se les administró el EA (1mg/kg) durante 21 días. En la prueba de EPM. El grupo con EA mostró mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, lo que se traduce en que dicho extracto previene el comportamiento tipo ansiedad. Posteriormente al día 22 se les retiró el alimento y al transcurrir 8 horas, se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa para finalmente aplicarles la eutanasia y recolectar sangre para evaluar parámetros bioquímicos (glucosa, concentración de lípidos, ácidos grasos, concentración de insulina plasmática y niveles de estradiol), además se midió los niveles de la proteína gamma (PPAR γ), proteína quinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2) en el HPC y la amígdala. En conclusión, el EA tiene efecto hipolipemiente y protector a los cambios metabólicos inducidos por la dieta de cafetería mientras que el efecto ansiolítico está relacionado con la activación de PPAR γ -ERK1/2 en la amígdala.

Por otro lado, Dhakal *et al.*, 2021 (217), analizaron el efecto ansiolítico de las hojas

de granada, su experimento consistió en obtener dos extractos acuosos, un extracto metanólico y un extracto con acetato de etilo. Se utilizaron ratones albinos, el fármaco de referencia fue DZP (3 mg/kg) y flavonoides del extracto metanólico y extracto de acetato de etilo (100 y 200 mg/kg). El comportamiento locomotor de los ratones se analizó individualmente una hora después de la administración de los tratamientos con un actofotómetro y se registró la actividad basal durante un periodo de 5 minutos. El efecto sobre la coordinación motora se evaluó mediante un aparato de varillas giratorias, previo entrenamiento de 24 horas antes de la prueba, posteriormente se observó en un periodo de 30, 60 y 90 min la caminata sobre la barra a velocidad de 12 revoluciones por minuto. Se observó el tiempo de permanencia en el aparato durante 5 minutos (300 s). Los grupos tratados con flavonoides de extracto metanólico y extracto de acetato de etilo (100 y 200 mg/kg) mostraron cambios significativos ($p < 0.05$) en comparación con los grupos del fármaco estándar (DZP 3 mg / kg) concluyendo que los flavonoides obtenidos de la planta tienen efectos ansiolíticos.

Abu-Taweel y Al-Mutary, 2021 (218), estudiaron el efecto ansiolítico de PJ en ratas Wistar macho las cuales fueron expuestas a tricloruro de aluminio ($AlCl_3$). Se formaron seis grupos, el grupo control tratado con agua, dos grupos tratados con PJ al 20% y 40%, un grupo tratado con $AlCl_3$, y dos grupos tratados con una combinación $AlCl_3$ y PJ al 20% y 40%, todo por vía i.g. durante 35 días. Posteriormente se realizaron pruebas de OFT, EPM, suspensión de la cola, nado forzado, caja luz/oscuridad para evaluar el comportamiento tipo ansiedad y depresivo, además de evaluar neurotransmisores y parámetros oxidativos en el cerebro al final del experimento. Los análisis de comportamiento mostraron que el PJ inhibió los efectos depresivos y ansiogénicos provocados por el $AlCl_3$ en las pruebas de comportamiento, además en los resultados neuroquímicos, se encontró que PJ únicamente a una concentración del 20%, minimizó la toxicidad del $AlCl_3$. Finalmente, los resultados proponen que el PJ mejora los comportamientos tipo ansiedad y depresión mediante la inhibición del daño oxidativo y minimizando los cambios en los neurotransmisores y la actividad hormonal.

Hassanen *et al.*, 2021, estudiaron el impacto en el comportamiento y toxicopatología de la administración de nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) y el mecanismo que ejerce el PJ para reducir esta toxicidad. Se formaron seis grupos de ratas Wistar macho (n=6): el grupo 1 fue el control y únicamente se le administró solución salina, al grupo 2 y 3 se les administró PJ (3 y 6 ml/kg), al grupo 4 se le administró CuO-NPs (300 mg/kg) mientras que al grupo 5 y 6 se les administró CuO-NPs (300 mg/kg) y PJ (3 y 6 ml/kg), todos por vía i.g. durante 28 días, cada 24 horas. Posteriormente al día 28, las pruebas que se realizaron fueron: prueba de nado forzado, EPM y prueba de laberinto en Y, además de análisis bioquímicos como el estrés oxidativo en muestras de tejido cerebral. Las ratas intoxicadas con CuO-NPs, en la prueba de nado forzado permanecieron más tiempo inmóviles lo que indica una reacción depresiva como respuesta a un nivel mayor de estrés, en el EPM disminuyeron significativamente el tiempo y el número de entradas en brazos abiertos y finalmente en el laberinto en Y se observó deterioro en la memoria espacial reflejado como una alteración en el comportamiento. En el parámetro bioquímico para medir estrés oxidativo, se encontró que CuO-NPs incrementó significativamente el nivel de malondialdehído contenido en el tejido cerebral en comparación con el grupo control, sin embargo, estos niveles disminuyen con la administración del co-tratamiento con 3 y 6 ml de PJ. En conclusión, se determinó que CuO-NPs ocasiona inflamación, apoptosis, daño en el DNA y estrés oxidativo en el cerebro que se vio reflejado como una alteración en el comportamiento, lo cual se contrarrestó con la administración de PJ gracias a su gran capacidad antioxidante, antiinflamatoria y anti apoptosis debido a sus compuestos fenólicos y flavonoides (219).

Zhu *et al.*, 2021 evaluaron el efecto de un extracto del fruto de granada roja en combinación con gluconato de magnesio y vainillina (RPFE) como potencial ansiolítico y antidepresivo. Se utilizó un modelo de estrés de restricción crónica (CRS), combinado con inyección subcutánea de corticosterona (CORT), en ratones C57BL/6 que presentan un estado similar a la ansiedad/depresión. Se formaron 3

grupos experimentales: grupo control ayuno 6h/día; grupo vehículo sometido a CRS 6h/día e inyección subcutánea de solución salina; control del modelo: sometidos a CRS 6h/día e inyección subcutánea con CORT, administrados durante 21 días. En la etapa de tratamiento, los ratones modelo de control se asignaron aleatoriamente a 5 grupos que corresponden al grupo control y el grupo vehículo fueron tratados con solución salina mientras que los grupos de extractos fueron los siguientes: RPFEH (fórmula a dosis alta, 2.0 mg/g día), RPFEM (fórmula a dosis media, 1.5 mg/g día) y RPFEL (fórmula a dosis baja 1.0 mg/g día) administrados por vía i.g. durante 4 semanas. Al finalizar la administración de los tratamientos, todos los ratones se sometieron a pruebas de comportamiento animal durante el día. Las pruebas de comportamiento utilizadas fueron prueba de natación forzada, OFT y EPM. Posteriormente se realizaron análisis bioquímicos, recolectando sangre del globo ocular y extrajeron los cerebros (tejido de HPC). Se analizaron los niveles del factor nuclear κ B (NF- κ B), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), interferón gamma (IFN- γ), CRH, ACTH y CORT en suero de la sangre recolectada mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y por colorimetría. Del tejido de HPC se determinó así la actividad total de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), óxido nítrico sintasa (NOS), indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), triptófano hidroxilasa (TPH), malondialdehído (MDA) y la cantidad de 5-HT. El grupo de RPFEH permaneció más tiempo en los brazos abiertos en el EPM, en la OFT los grupos de RPFEH y RPFEM pasaron más tiempo en el centro en comparación con los demás grupos. En la prueba de natación forzada, los ratones tratados con CRS-CORT mostró significativamente menos tiempo de inmovilidad después de la administración con RPFEH, RPFEM, RPFEL, por lo que esta fórmula contrarresta los comportamientos similares a la depresión. En los análisis bioquímicos se encontraron efectos de reversión significativos con la fórmula de RPFEL en los niveles de concentración de MAD, SOD y NOS ya que fueron significativamente menores que el resto de los demás grupos, de igual forma las citocinas inflamatorias como NF- κ B e IL-1 β mostraron significativamente menor nivel en comparación con los otros grupos. Los 3 grupos de RPFEL tuvieron mayor nivel de CORT y menos niveles de CRH, ACTH y CORT en comparación con el

grupo control modelo, siendo la dosis alta RPFEH la más eficaz. En cuanto a la fórmula RPFE en el nivel de 5-HT en el HPC, la síntesis de 5-HT aumentó al inhibir la actividad de IDO a través del efecto antiinflamatorio de RPFE. Se concluye que RPFE es un producto terapéutico eficaz para tratar la ansiedad/depresión (220).

Patil *et al.*, 2022, estudiaron el efecto ansiolítico de un extracto metanólico de hojas de granada (MLPG), en ratones albinos suizos y se formaron 4 grupos que corresponden a: grupo 1 control, salina (10 ml/kg), grupo 2 DZP (4 mg/kg) administrado por vía i.p., grupo 3 MLPG (50 mg/kg) y grupo 4 MLPG (100 mg/kg) administrados por vía i.g. Se aplicaron las pruebas conductuales: prueba de rotaroad, EPM, caja luz/oscuridad y HB. Los resultados obtenidos indican que el tiempo medio de caída fue significativamente menor en el grupo 4 MLPG, en el EPM el DZP y el extracto del grupo 3 MLPG hubo mayores entradas en brazos abiertos en comparación con el grupo control, mientras que DZP y los grupos de MLPG mostraron mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, así como un menor tiempo de permanencia en los brazos cerrados. En la caja luz/oscuridad el DZP tuvo mayor tiempo de permanencia en el área iluminada en comparación con el control y los grupos de MLPG muestra significativamente menor tiempo de permanencia en el área iluminada en comparación con el grupo DZP. En el HB el DZP y el grupo 4 MLPG mostraron significativamente menos olfateos y mayores inmersiones de cabeza. Los autores concluyeron que MLPG posee propiedades ansiolíticas (221). Los autores que condujeron estos estudios sugieren que el efecto ansiolítico de la granada puede ser dado por sus altas cantidades de polifenoles y flavonoides o por el ácido elágico, sin embargo, los estudios sobre el efecto ansiolítico aún son escasos y su mecanismo de acción aún no está dilucidado.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la OMS en el 2020, aproximadamente 1000 millones de personas en el mundo vivían con un trastorno mental (11). Los TA son los trastornos mentales más frecuentes y los más discapacitantes, como resultado de ello se han clasificado en

el lugar 25 de las principales causas de carga global por enfermedad. En este mismo año, se estimó que 374 millones de personas a nivel mundial padecieron algún TA, donde las mujeres, niños y adolescentes tuvieron mayor prevalencia que los hombres (14, 15). El Instituto Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE) reportó que, en el 2021, aproximadamente el 19.3% de la población mexicana adulta presentó síntomas de ansiedad severos, mientras que un 31,3% presentó síntomas de ansiedad mínima (17).

Por otra parte, el tratamiento farmacológico más utilizado a nivel mundial para los TA son las BDZs, representadas por el DZP, el cual ha demostrado su eficacia y seguridad en los TAG, cuando se administra a corto plazo (2-6 semanas) (222), este fármaco está enfocado en disminuir o eliminar los síntomas de ansiedad y permitir que la persona realice sus tareas cotidianas sin mayor complicación. Sin embargo, un consumo inadecuado y prolongado del fármaco puede ocasionar dependencia, deterioro de la cognición y de la memoria, disminución del estado de alerta, empeoramiento o precipitación de la ansiedad e incluso la muerte por sobredosis si se mezcla con alcohol u opioides (45, 51). Por lo anterior, dentro de la medicina complementaria se busca un remedio natural como la granada que supone una alternativa para tratar la ansiedad debido a que diversos estudios han encontrado que posee un efecto neuroprotector frente a diversos trastornos neurodegenerativos (188) gracias a su alto contenido en polifenoles (163). Finalmente, no existe ninguna información sobre el efecto ansiolítico de un microencapsulado de jugo de granada (MEG). Tomando en cuenta la problemática, la pregunta de investigación es:

¿La administración crónica de un microencapsulado de jugo de granada (*Punica granatum* L.) tendrá efecto ansiolítico sobre la conducta tipo ansiedad en un modelo animal de respuesta incondicionada?

IV. JUSTIFICACIÓN

El uso de la medicina complementaria en los TA tiene gran potencial, ya que,

dependiendo de su eficacia, podrían coadyuvar con los medicamentos ansiolíticos, mismos que implican la presencia de efectos adversos e indeseables, y, por otro lado, una administración concomitante puede ayudar a reducir dichos efectos. En general son opciones naturales con un menor costo y riesgo de intoxicación o dependencia. En este contexto, se han encontrado algunos reportes preclínicos que indican que el jugo de granada presenta efecto ansiolítico, los reportes aún son limitados y poco contundentes, por lo que es necesario ahondar en la exploración de dicho efecto. Por otro lado, el MEG supone una innovación tecnológica con ciertas ventajas sobre el jugo fresco de granada como la disponibilidad anual (la granada es una fruta de temporada, sin embargo, el MEG será disponible todo el año), el tiempo de vida de anaquel (los microencapsulados pueden almacenarse por periodos prolongados y confieren estabilidad a los compuestos bioactivos del jugo susceptibles a factores como la luz, la temperatura y el pH) y la practicidad de la administración. Ante la falta de estudios del efecto ansiolítico del MEG, es necesario realizar estudios en donde se demuestre si tiene un efecto ansiolítico para que a futuro pueda estudiarse como tratamiento en combinación con algún ansiolítico farmacéutico, así como establecer parámetros farmacológicos que sentaran las bases para estudios futuros y encontrar su mecanismo de acción.

V. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis alterna H_1 :

El tratamiento crónico con un microencapsulado de jugo de granada tiene efecto ansiolítico sobre la conducta tipo ansiedad en un modelo animal de respuesta incondicionada.

5.2 Hipótesis nula H_0 :

El tratamiento crónico con un microencapsulado de jugo de granada no tiene efecto ansiolítico sobre la conducta tipo ansiedad en un modelo animal de respuesta

incondicionada

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento crónico de un microencapsulado de jugo de granada (*Punica granatum* L.) sobre la conducta tipo ansiedad inducida con un modelo de respuestas incondicionadas en ratas Wistar.

6.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto ansiolítico y motor que genera la administración de un microencapsulado de jugo de granada en una batería de pruebas conductuales en ratas Wistar.
- Comparar los efectos sobre la conducta tipo ansiedad de las dosis ensayadas del microencapsulado de jugo de granada con la respuesta ansiolítica del fármaco de referencia.
- Analizar el índice de ansiedad mediante una curva dosis - respuesta del microencapsulado de jugo de granada y del fármaco de referencia para determinar dosis efectivas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microencapsulación de jugo de granada roja

El MEG utilizado en este estudio fue previamente elaborado por secado mediante técnica de aspersión de acuerdo a las condiciones reportadas por Estrada-luna *et al.*, 2019 (223) por la empresa Granding International S.A. de C.V. ubicada en Jilotepec, Morelos, México. Una vez adquirido se procedió a realizar la parte

experimental en el modelo animal que se describe a continuación.

7.2 *Implicaciones éticas*

Este proyecto siguió las pautas éticas internacionales de la declaración de Basel (224), así mismo, siguió los lineamientos de la Asociación Americana de Psiquiatría “Directrices de conducta ética en el cuidado y utilización de animales no humanos en investigación” (225). Además, se dio cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que trata de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (226). Para poder llevar a cabo este experimento se tuvo la aprobación (002/2022) por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) (Anexo 1).

7.3 *Animales*

Todas las pruebas se realizaron con ratas adultas macho (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar (200g – 250g). Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico por grupos de 4, a temperatura y ciclos de luz/oscuridad 25 ± 2 °C; 12h/12h) con acceso *ad libitum* a agua esterilizada y alimento comercial (Lab Diet 5008 Formulab, CA, USA). Las ratas tuvieron un periodo de adaptación a las condiciones del laboratorio y a la manipulación una semana antes de iniciar la administración de los tratamientos.

7.4 *Compuestos y dosis*

Se utilizó DZP (ámpula de 10 mg/2ml, laboratorios Pisa S.A de C.V., D.F., México) como fármaco de referencia y el MEG como tratamiento. Ambos se administraron de acuerdo a las dosis calculadas (Tabla 8). Para la disolución del MEG se utilizó agua estéril con un volumen de administración de 4 ml/kg i.g. Al grupo control se le administró agua estéril 4 ml/kg i.g. Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día de su administración.

Las dosis de DZP se estandarizaron por incrementos logarítmicos basados en la dosis máxima que genera efecto ansiolítico (227); las del MEG también se estandarizaron por incrementos logarítmicos

Tabla 8: Dosis calculadas para la curva dosis – respuesta

Logaritmo	Dosis (antilogaritmo base 10)
DIAZEPAM	
- 0.25	0.56 mg/kg
0	1 mg/kg
0.25	1.77 mg/kg
0.5	3.16 mg/kg
MICROENCAPSULADO	
2.5	316 mg/kg
2.75	562 mg/kg
3	1000 mg/kg
3.25	1777 mg/kg

7.5 Grupos experimentales y administración de los tratamientos

54 ratas Wistar macho de 200 – 250 g se dividieron aleatoriamente en 9 grupos de 6 individuos por grupo: cuatro grupos de DZP (que recibieron según su grupo, dosis de 0.56 mg/kg, 1 mg/kg, 1.77 mg/kg y 3.16 mg/kg, i.p.), cuatro grupos de MEG (que recibieron dosis de 316 mg/kg, 516 mg/kg, 1000 mg/kg, 1777 mg/kg, i.g.), estas dosis se estandarizaron por incrementos logarítmicos y un grupo control (Control) al que se le administró únicamente agua estéril. Los tratamientos se administraron una vez cada 24 horas durante 22 días.

7.6 Medición del comportamiento tipo ansiedad en las pruebas conductuales

El día 22 del experimento, una hora antes de la administración de los tratamientos,

las ratas fueron llevadas a un cuarto aislado, con poca luz donde se realizaron las pruebas conductuales con la finalidad de que se adaptaran a las condiciones de ese lugar. Posteriormente a la administración del tratamiento, rata por rata, se esperó media hora para poder comenzar las pruebas. Cada rata paso una sola vez y en continuidad en cada prueba, iniciando con el OFT, seguido del EPM y finalmente con HB utilizando las metodologías que se describen a continuación. Al finalizar cada prueba, cada aparato se limpió con algodón impregnado de etanol al 70%. Todas las pruebas de comportamiento fueron grabadas mediante cámara de video para posteriormente analizarlos con el programa de seguimiento Ethovision XT 10.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos).

7.6.1 OFT

Se utilizó la metodología descrita previamente por Zimcikova *et al.*, que consiste en un cubo de madera (sin tapa), de 60 cm de arista, pintado de negro y el suelo dividido uniformemente en 16 cuadrados espaciados (15 x 15 cm; Figura 5). La prueba se llevó a cabo en un cuarto aislado con control de luz a 30 lúmenes. La rata fue colocada en la esquina inferior del aparato y se grabó en video su conducta durante 5 minutos, la cámara se colocó a 100 centímetros por encima del campo. Con la grabación en video, se registró el siguiente comportamiento: a) distancia total recorrida (centímetros) b) duración en la zona central y en las esquinas (segundos) c) acicalamiento (tiempo), d) posición vertical (tiempo). La actividad vertical se contabilizó cuando la rata levantó las patas delanteras del suelo y se estiró con el apoyo de la pared. El acicalamiento se midió como el tiempo que la rata pasó lamiéndose o rascándose de la cabeza hacia sus patas. La posición vertical y el acicalamiento en las ratas se puntuaron manualmente ya que el programa de seguimiento no podía identificarlos.

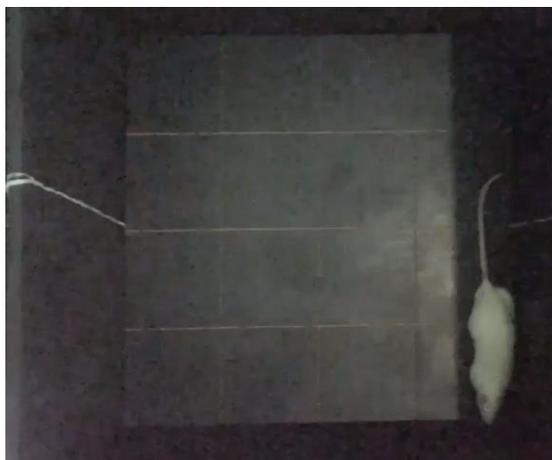


Figura 5: Prueba OFT, se observan el área central, conformada por cuatro cuadrados distribuidos equitativamente, mientras que el área periférica está conformada por doce cuadrados restantes, imagen propia.

7.6.2 EPM

Se utilizó la metodología descrita por Pellow *et al.*, (132) con adaptaciones por Knight *et al.*, (134) y Griebel *et al.*,(228). Se utilizó un aparato de metal, elevado 50 cm del nivel del piso, con forma de cruz, formado por dos brazos abiertos de 50 centímetros de largo y 10 centímetros de ancho, así como de dos brazos cerrados con las mismas dimensiones, con paredes de 40 centímetros de altura, de manera que los brazos abiertos quedan enfrentados, con un techo abierto (Figura 6), el control de luz fue de 75 lúmenes. De inicio se colocó a la rata en el centro del aparato frente a un brazo abierto donde se le permitió explorar libremente durante 5 minutos y su comportamiento fue grabado con una cámara de video montada por encima del laberinto para su análisis. Para ser considerada entrada en alguno de los brazos, la rata tuvo que tener al menos $\frac{3}{4}$ partes de su cuerpo en esa zona. Las variables examinadas fueron: a) tiempo de permanencia (segundos) en los brazos abiertos, b) número de entradas totales en brazos abiertos y en brazos cerrados d) número de entradas en los brazos abiertos (porcentaje) y e) índice de ansiedad, el cual fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de ansiedad} = 1 - \left[\frac{\left(\frac{\text{Tiempo dedicado a brazos abiertos}}{\text{Tiempo total de la prueba}} \right) + \left(\frac{\text{Número de entradas en los brazos abiertos}}{\text{Entradas totales en la prueba}} \right)}{2} \right]$$

Adicionalmente, para realizar la curva dosis respuesta se trabajó el índice de ansiedad, por lo que el porcentaje de efecto fue expresado de tal forma que el 0 representa el 0% de efecto ansiolítico y el 1 al 100% de efecto ansiolítico, esto con la finalidad de sacar el porcentaje de efecto ansiolítico.



Figura 6: Prueba EPM, está conformada por dos brazos; el brazo abierto que corresponde al área horizontal, el brazo cerrado que corresponde al área vertical con paredes elevadas, imagen propia.

7.6.3 HB

Para esta prueba se utilizó la metodología descrita previamente por Boissier (229) con adaptaciones dadas por Casarrubea *et al.*, (140), Pisula *et al.*, (138) File y Wardill (230). Se utilizó un cubo de madera (sin tapa), de 60 cm de arista, pintado de negro y el suelo dividido uniformemente en 16 cuadrados agujeros con un diámetro de 4 cm cada uno y un control de luz de 30 lúmenes (Figura 7). Para iniciar la prueba, se colocó a la rata en una esquina y se comenzó a grabar durante 5

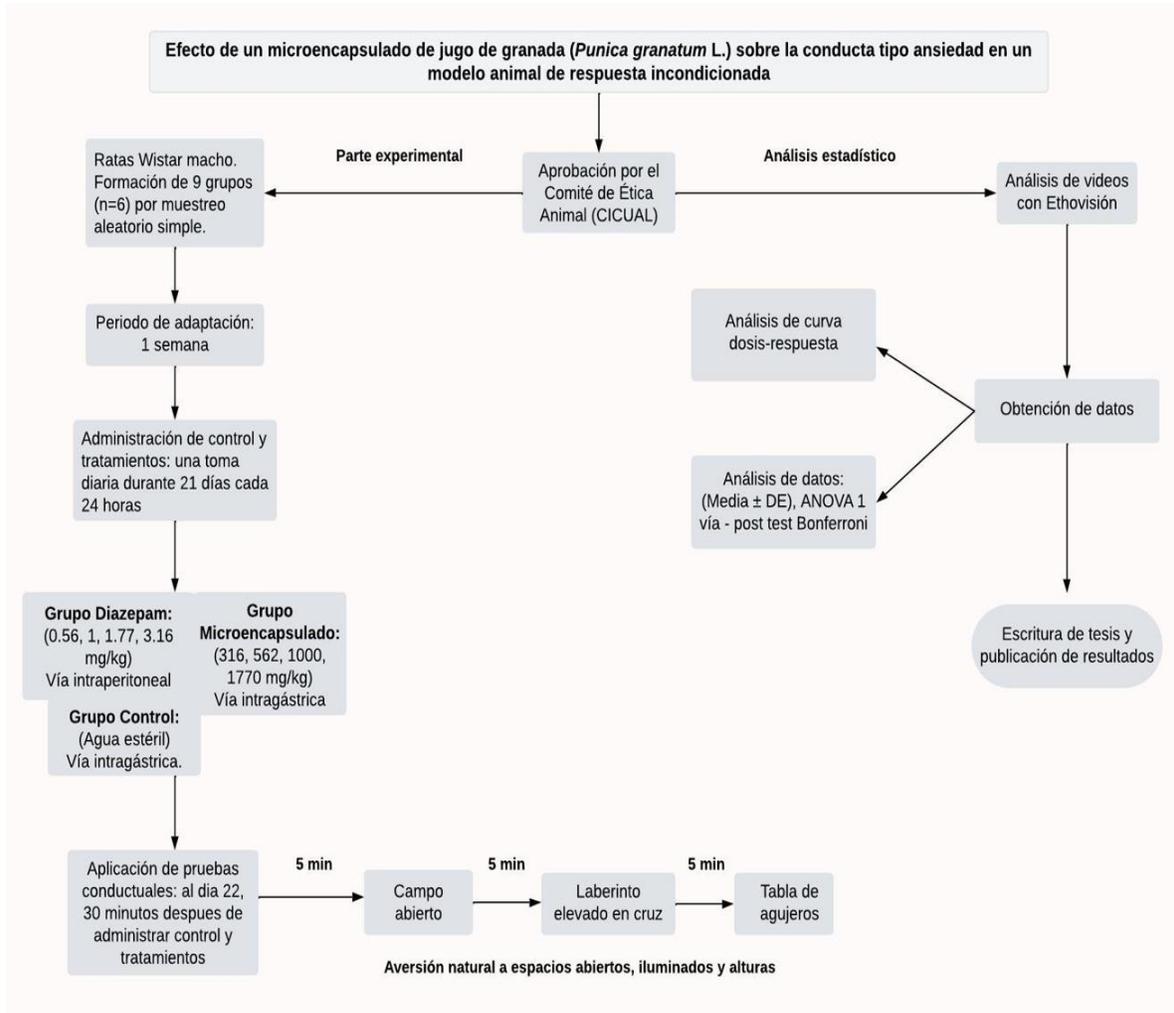
minutos. La variable a analizar fue la inserción de la cabeza en los agujeros, esta conducta se registró cuando el animal sumergía su cabeza hasta el tercio medial de la oreja, tapando los ojos con los agujeros de la placa (139). Esta variable se puntuó manualmente ya que el programa de seguimiento no pudo realizarlo.



Figura 7: Prueba HB, está conformada por dieciséis agujeros como superficie, diseñado para que la rata inserte su cabeza, imagen propia.

Las ratas que terminaron de pasar por la batería de pruebas conductuales fueron sacrificadas por guillotina, previa sedación con isoflurano inhalado.

7.7 Diagrama del diseño experimental



7.8 Contexto del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), Instituto de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Nutrición Molecular y Bioterio en el periodo comprendido entre mayo del 2022 hasta julio del mismo año.

7.9 Tipo de estudio

El estudio realizado es de tipo cuantitativo, experimental y transversal.

7.10 Tamaño de muestra y muestreo

El estudio se realizó en un total de 54 ratas macho cepa Wistar y se utilizó muestreo aleatorio simple para formar 9 grupos, el tamaño de muestra fue de 6 animales por grupo, determinado de acuerdo al poder estadístico requerido por el tipo de estudio y las pruebas estadísticas a realizar, conforme a lo reportado previamente (231).

7.11 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión

En la Tabla 9 se describen los criterios de selección en los que se basó este estudio:

Tabla 9: Criterios de selección

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">- Ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) cepa Wistar.- Sexo: machos.- Peso: 200 g a 250 g.- Producidas y adquiridas en el bioterio de la UAEH.- Ratas sanas.- Aislamiento asignado en el bioterio de la UAEH.- Ratas alimentadas e hidratadas <i>ad libitum</i>.	<ul style="list-style-type: none">- Ratas visiblemente enfermas.- Ratas en ayuno prolongado y deshidratadas.- Ratas visiblemente estresadas.
Criterios de eliminación	
<ul style="list-style-type: none">- Ratas que mueran por causa desconocida.	

7.12 Definición operacional de las variables (dependientes, independientes)

En la Tabla 10 se describe la definición operacional de las variables:

Tabla 10: Definición operacional de las variables

Variable	Tipo de variable	Definición de la variable	Medición
Distancia total recorrida	Dependiente	Distancia que la rata recorrió en toda la prueba de OFT	Medición: (5 minutos) -Distancia total recorrida en cm
Duración en la zona central y en las esquinas	Dependiente	Tiempo que la rata permaneció en la parte central del aparato (los cuatro cuadrados del centro) y en las esquinas. Se contabilizó cuando la rata colocó dos patas delanteras y la cabeza en el área respectiva.	Medición: (300 segundos) - Duración centro - Duración en esquinas
Acicalamiento	Dependiente	Tiempo que pasa la rata limpiándose con las patas delanteras en el rostro y/o cuerpo, tomando en cuenta el aseo completo como el interrumpido en algún punto del cuerpo se cuentan juntos.	Medición: (300 segundos) - Duración del acicalamiento
Posición vertical	Dependiente	Cuando el animal se para o se levanta sobre las patas traseras y con las patas delanteras contra la pared del laberinto.	Medición: (300 segundos) -Duración de la posición vertical
Tiempo dedicado a los brazos	Dependiente	Tiempo que pasa el animal en los brazos abiertos.	Medición: (300 segundos)

abiertos			- Tiempo de permanencia en los brazos abiertos
Entradas en los brazos abiertos y cerrados	Dependiente	Para ser considerada entrada en alguno de los brazos, la rata tuvo que tener al menos $\frac{3}{4}$ partes de su cuerpo en esa zona, una conducta ansiosa se verá reflejada como un aumento de entradas y tiempo en los brazos cerrados.	Medición: (300 segundos) - Número de entradas en los brazos abiertos. - Número de entradas en los brazos cerrados. - Número de entradas totales en la prueba.
Índice de ansiedad	Dependiente	Fórmula para obtener el índice de ansiedad: $1 - ((\text{tiempo de permanencia en brazos abiertos} / \text{tiempo total de la prueba}) + (\text{número de entradas en los brazos abiertos} / \text{entradas totales en la prueba}) / 2)$	Medición: 0- poca o nula ansiedad 1- comportamiento muy ansioso
Inserción de cabeza	Dependiente	El animal sumerge su cabeza hasta el tercio medial de la oreja, tapando los ojos con los agujeros de la placa	Medición: (5 minutos) - Número de inserciones de cabeza

7.13 Análisis estadístico

Una vez que se capturaron en Excel los datos de todas las pruebas, se sometieron a un análisis estadístico descriptivo y se expresaron como la media \pm desviación estándar de cada variable, mismas que fueron analizadas mediante ANOVA de una vía con un post test de Tukey para análisis de diferencias de medias con un nivel de significancia de ($p < 0.05$). Todo el análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism Versión 8 (GraphPad, USA) y Microsoft 365 Excel 2019 (Microsoft, USA).

VIII. RESULTADOS

8.1 OFT

8.1.1 Distancia total recorrida

La distancia total recorrida (centímetros) fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en el grupo de DZP con su dosis más alta (DZP 3.16 mg/kg) en comparación con el grupo control, mientras que el grupo con MEG con la dosis de (1777 mg/kg) presentó una mayor distancia total recorrida ($p < 0.001$) en comparación con los demás grupos de MEG y el grupo control, los cuales se muestran en la Figura 8.

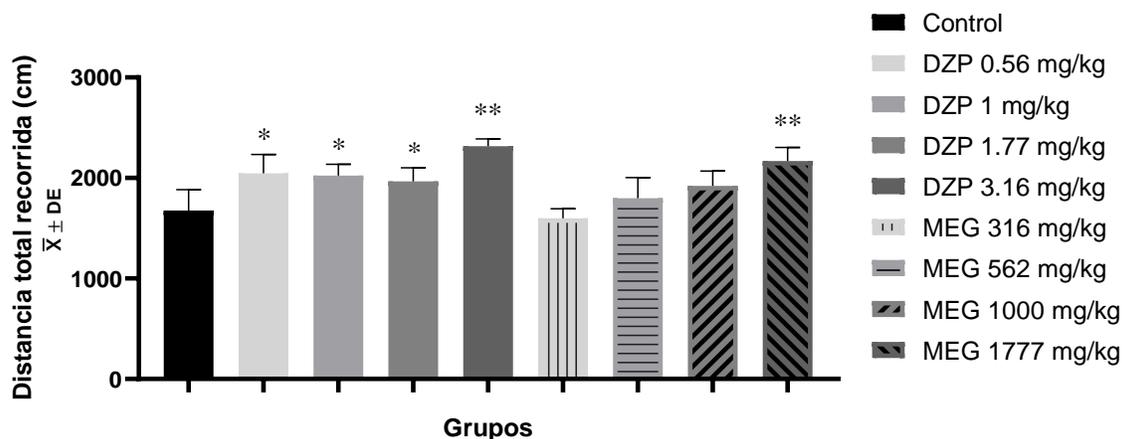


Figura 8: Distancia total recorrida en centímetros en OFT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes posttest Tukey's).

8.1.2 Duración en centro

La variable de duración en centro (segundos) no mostró diferencias significativas en los grupos de DZP a dosis de 0.56 mg/kg y de 1 mg/kg contra el grupo control, sin embargo, en las dosis de 1.77 mg/kg y de 3.16 mg/kg de DZP la duración en centro fue significativamente mayor ($p < 0.0001$), en comparación con el grupo control. El MEG en el grupo de la dosis máxima presentó mayor duración en el centro ($p < 0.03$), en comparación con el grupo control, la figura 9 muestra los resultados obtenidos.

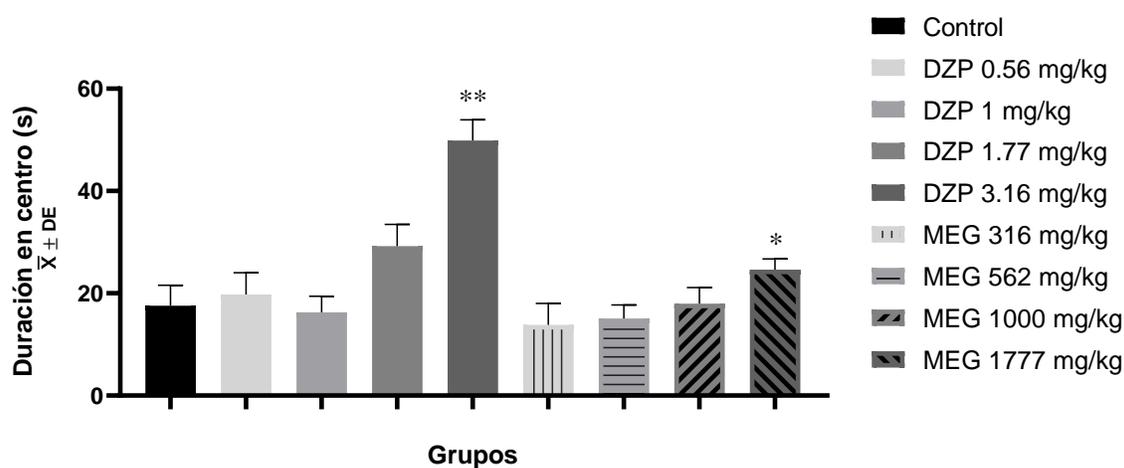


Figura 9: Duración en el centro en segundos en OFT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes posttest Tukey's).

8.1.3 Acicalamiento

El tiempo de acicalamiento (segundos) no mostró diferencias estadísticamente significativas en los grupos de DZP a dosis de 0.56 mg/kg y 1 mg/kg, aunque en los grupos de 1.77 mg/kg y 3.16 mg/kg si presentó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), lo que se vio reflejado en mayor tiempo de acicalamiento, de igual forma, los grupos de MEG no presentaron diferencias significativas a

excepción de la dosis más alta ($p=0.001$) en comparación con el grupo control, la Figura 10 muestra los resultados obtenidos.

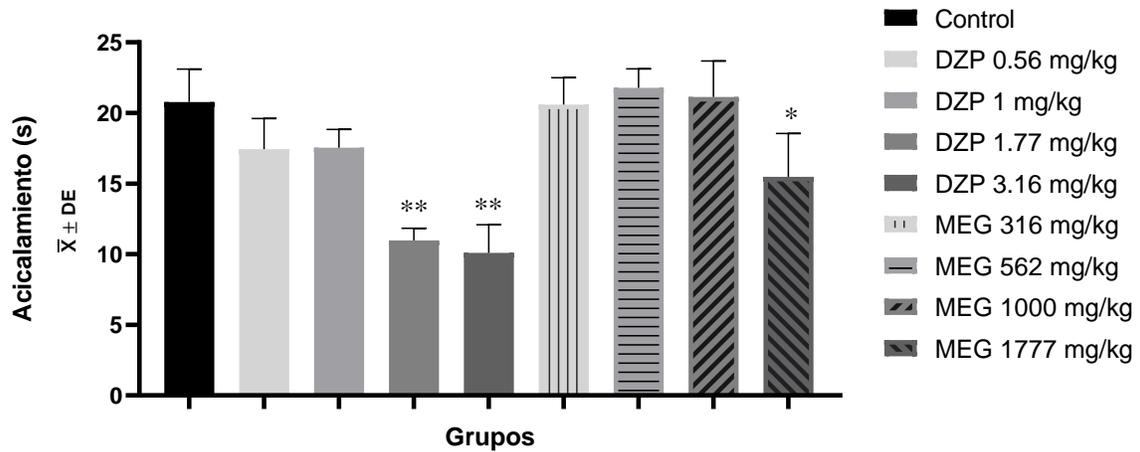


Figura 10: Duración del acicalamiento en segundos en OFT. * $p=0.001$, ** $p<0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes postest Tukey's).

8.1.4 Posición vertical

La variable posición vertical (segundos) no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. La Figura 11 muestra estos resultados descritos.

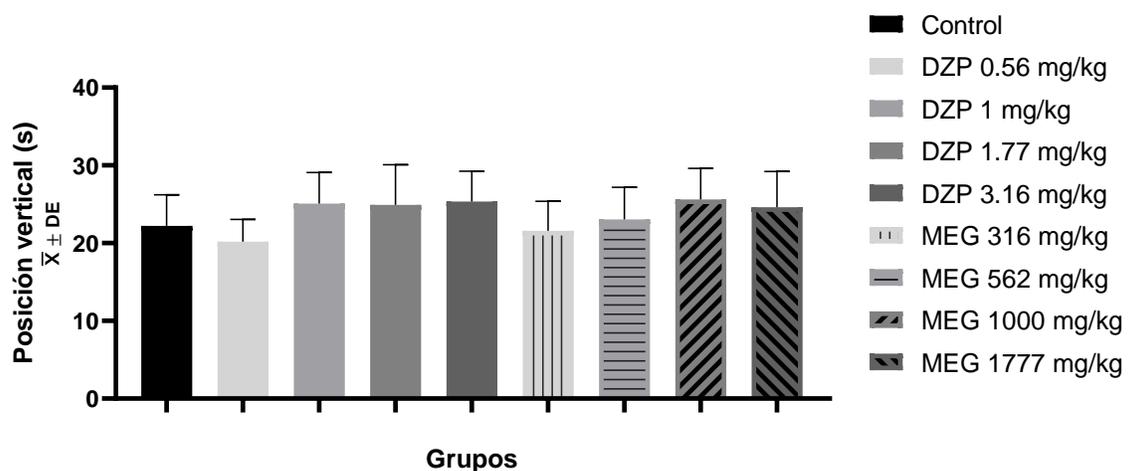


Figura 11: Posición vertical en segundos en OFT. Se realizó una prueba de ANOVA de una

vía para grupos independiente y un post test de Tukey's. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos tratados.

8.2 EPM

8.2.1 Número de entradas en brazos abiertos

El número de entradas en brazos abiertos (porcentaje) no difirió entre los grupos de DZP, sin embargo, se puede observar que el número de entradas en los brazos abiertos fue mayor en todos los grupos de DZP ($p < 0.0001$) en comparación con el grupo control, así como la dosis más alta de MEG ($p = 0.001$) presentó más entradas en los brazos abiertos en comparación con el grupo control, la Figura 12 representa gráficamente los resultados obtenidos.

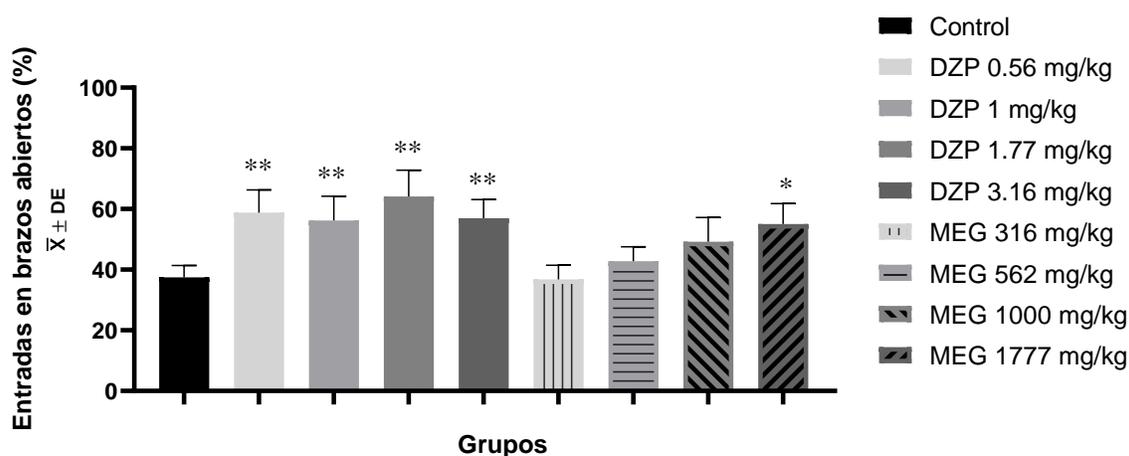


Figura 12: Porcentaje del número de entradas en brazos abiertos en EPM. * $p = 0.001$, ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes posttest Tukey's).

8.2.2 Tiempo de permanencia en brazos abiertos

La variable tiempo de permanencia en brazos abiertos (porcentaje), no difirió entre los grupos de DZP, sin embargo, se puede observar que el porcentaje de permanencia en brazos abiertos fue mayor en todos los grupos de DZP ($p < 0.0001$)

en comparación con el grupo control, así como la dosis más alta del MEG que presentó mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($p < 0.01$), en comparación con el grupo control. La figura 13 muestra gráficamente los resultados obtenidos.

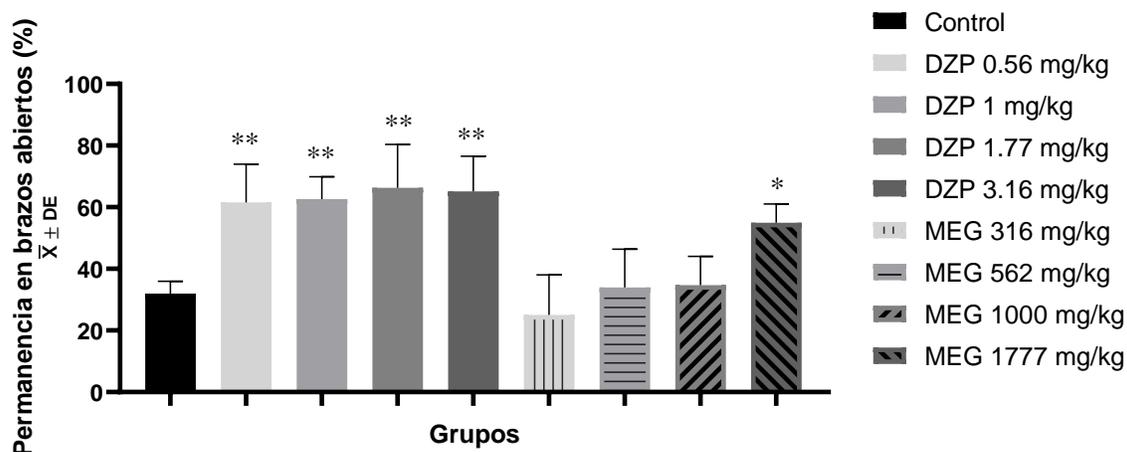


Figura 13: Porcentaje del tiempo de permanencia en brazos abiertos en EPM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes posttest Tukey's)

8.2.3 Número de entradas en brazos cerrados

El número de entradas en brazos cerrados (porcentaje) no difirió entre los grupos de DZP, sin embargo, se puede observar que el número de entradas en los brazos abiertos fue mayor en todos los grupos de DZP ($p < 0.0001$) en comparación con el grupo control, así como la dosis más alta MEG ($p < 0.04$) presentó más entradas en los brazos abiertos en comparación con el grupo control, la Figura 14 representa gráficamente los resultados obtenidos.

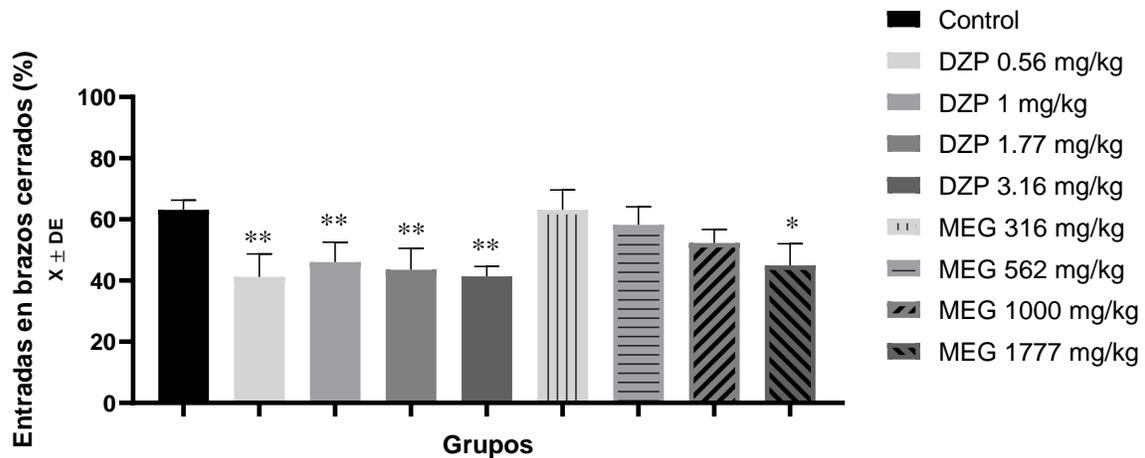


Figura 14: Porcentaje del número de entradas en brazos cerrados en EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes postest Tukey's).

8.2.4 Entradas totales

El número de entradas totales incrementó en los grupos de DZP a dosis de 0.56 mg/kg y 1 mg/kg ($p < 0.006$) así como con las dosis de 1.77 mg/kg y 3.16 mg/kg ($p < 0.0001$), en comparación con el grupo control, por otro lado, el MEG presentó un mayor número de entradas totales únicamente en la dosis máxima ($p < 0.006$) en comparación con el grupo control, la Figura 15 muestra gráficamente los resultados obtenidos.

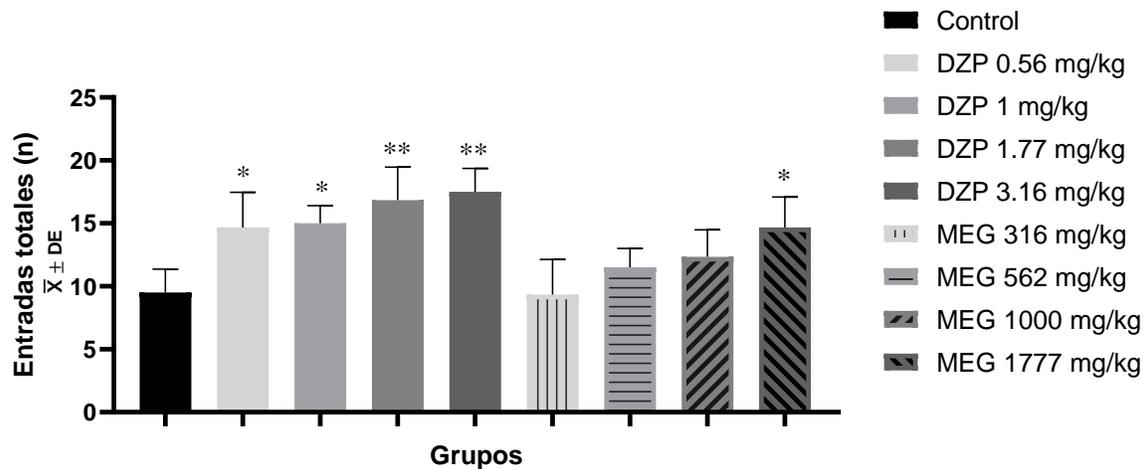


Figura 15: Número de entradas totales en brazos abiertos y cerrados en EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes postest Tukey's).

8.2.5 Índice de ansiedad

La variable índice de ansiedad mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos experimentales, donde los grupos de DZP presentaron el mayor efecto ansiolítico ($p < 0.0001$) en comparación con el grupo control mientras que los grupos de MEG, este efecto se mostró únicamente en el microencapsulado a la dosis más alta ($p < 0.001$) en comparación con el grupo control. La Figura 16 muestra el efecto mencionado.

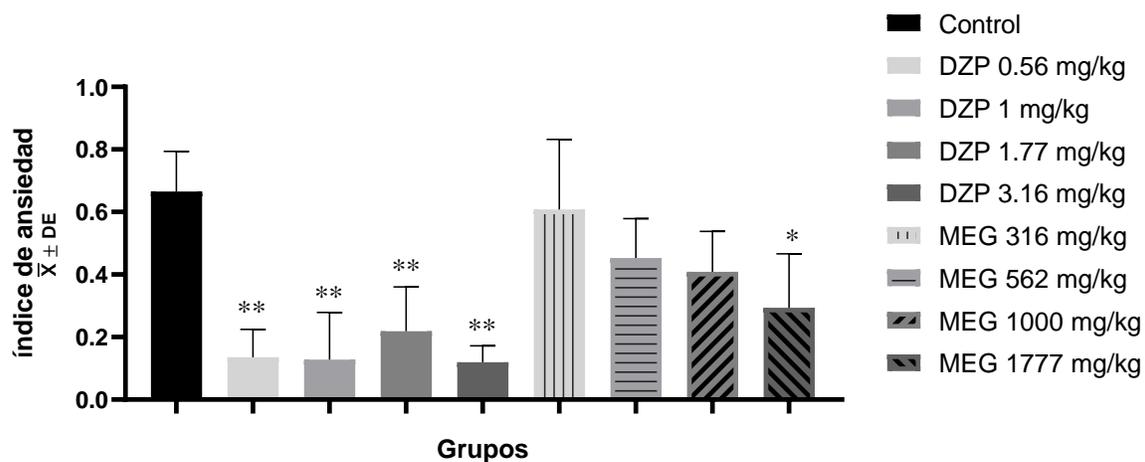


Figura 16: Índice de ansiedad en EPM. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ vs control (ANOVA de una

vía para grupos independientes postest Tukey's).

8.2.6 Curva dosis-respuesta

Se realizó una curva dosis-respuesta de cuatro puntos con dosis a incrementos logarítmicos a partir del porcentaje de efecto de DZP y MEG obtenido a partir de la variable índice de ansiedad. Se encontró que DZP no es dependiente de la dosis en las dosis evaluadas, su porcentaje de efecto fue de 79% a 82% considerando el promedio de los grupos control como el 0% de efecto ansiolítico. En cuanto al MEG se encontró que, en las dosis evaluadas el efecto ansiolítico es dosis dependiente, su porcentaje de efecto fue de 9% al 56% considerando el promedio del grupo control de efecto ansiolítico. La Figura 17 muestra gráficamente los resultados obtenidos. Despejando la ecuación de la recta ($y=ax+b$ – $y=14.775x-2.72$) se encontró que la dosis efectiva 50 (DE₅₀) corresponde a una dosis de 1584 mg/kg de MEG.

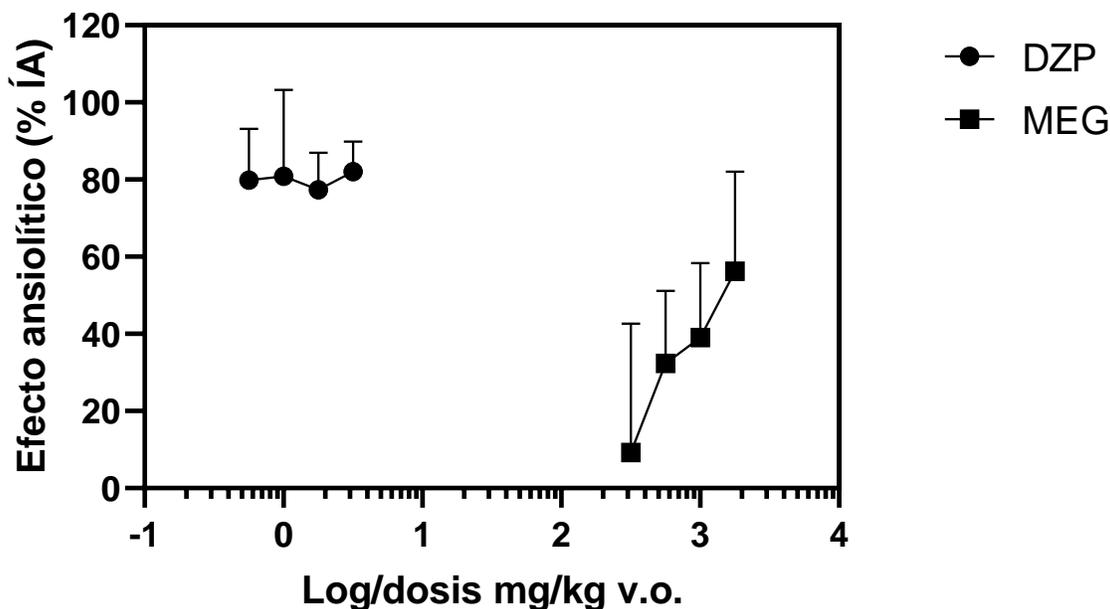


Figura 17: Porcentaje de efecto ansiolítico de acuerdo al índice de ansiedad, obtenidos por la administración del Diazepam (DZP) y el microencapsulado de jugo de granada (MEG).

8.3 HB

8.3.1 Inserción de cabeza

En la variable de inserción de cabeza (número de veces), se encontró que los grupos de DZP a partir de la dosis de 1 mg/kg ($p=0.0001$), tuvieron mayor número inserciones de cabeza en los agujeros de la prueba, sin embargo, en el caso del MEG, la dosis alta fue la única que presentó un incremento ($p<0.04$) en el número de inserciones de cabeza, la Figura 18 muestra gráficamente los resultados obtenidos.

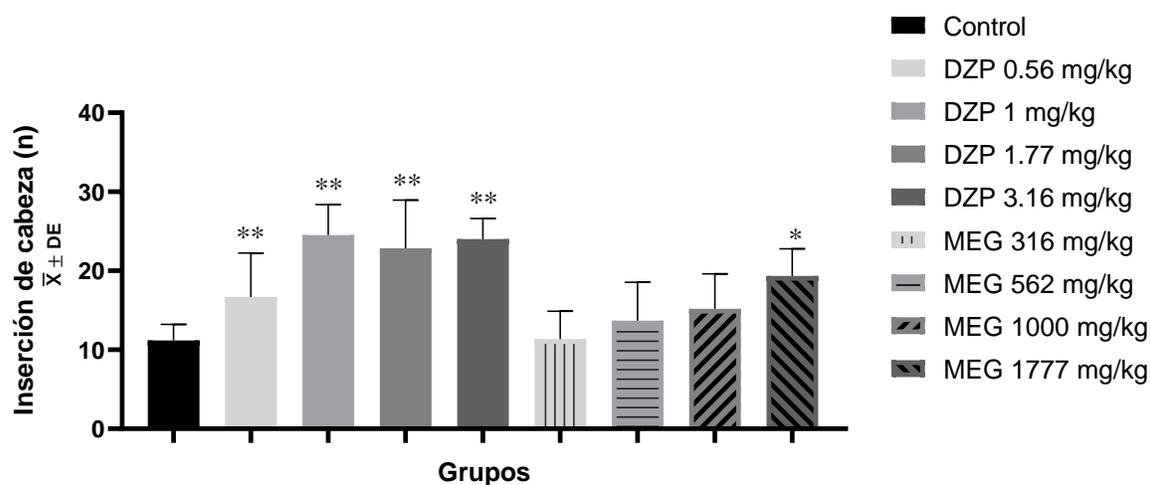


Figura 18: Número de inserciones de cabeza en HB. * $p<0.04$, ** $p=0.0001$ vs control (ANOVA de una vía para grupos independientes posttest Tukey's).

IX. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó el efecto del MEG sobre la conducta tipo ansiedad utilizando una batería de pruebas conductuales para evaluar con la conducta exploratoria y ansiosa en el OFT, la conducta ansiosa en el EPM y en la prueba HB.

9.1 El microencapsulado de jugo de granada disminuye la conducta ansiosa y aumenta la conducta exploratoria de las ratas en la batería de pruebas conductuales.

Las pruebas conductuales se encargan de evaluar las respuestas incondicionadas del animal sometiéndolos a situaciones que les generan conflicto de aproximación – evitación (232), ya que en todas las pruebas se coloca al animal en una circunstancia emocionalmente desafiante que activa las motivaciones competitivas de implicarse activamente en el entorno frente a la cautela de evitar la novedad. Esto debido a que los roedores son animales nocturnos y muy susceptibles a ser depredados, por su naturaleza tienden a evitar espacios abiertos y muy iluminados, por lo que la exploración de nuevos entornos puede llevarlos a descubrir recompensas como comida o una vía de escape (233). Por lo menos dos pruebas deben ser independientes con diferencias en principio y método por lo que los resultados de cada prueba puedan validarse aún más (234). En este sentido, en nuestro estudio realizamos una batería con tres pruebas conductuales, de las cuales OFT y EPM, la primera se basa en la aversión natural de los roedores por los espacios abiertos mientras que la segunda se basa en la aversión natural por las alturas y los espacios abiertos e iluminados. La prueba de HB es una variación modificada del OFT, por lo tanto, se basa en el mismo principio, aunque el método no tiene similitud por medir variables distintas. En los siguientes párrafos se discutirá los resultados obtenidos.

El estudio de diversos compuestos ha sido investigado con la prueba de OFT, por ello, buscamos identificar el efecto de tipo ansiolítico del MEG reflejado en un aumento en la posición vertical (131, 235). La variable acicalamiento indica estados similares a ansiedad en ratas, por lo que una disminución de este comportamiento es resultado de un efecto de tipo ansiolítico (236). En este sentido, en nuestro estudio se encontró que el MEG en su dosis alta (1777 mg/kg) mostró en las ratas, un aumento significativo en la locomoción y el tiempo de permanencia en la parte central, dicho efecto mostró ser dependiente de la dosis, sin embargo, en la variable

posición vertical no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos ensayados. Estudios similares que ensayaron con el jugo de granada (5 y 8 ml/kg) (209), porcentaje de jugo (20% y 40%) (218), extracto acuoso del fruto (2.0 y 1.5 mg/kg) (220) mostraron aumento significativo en las variables antes mencionadas, incluyendo la variable de posición vertical. Sin embargo, en otro estudio similar se evaluó el efecto ansiolítico del jugo de zarzamora (136), que pertenece al igual que la granada, a la clase *Magnoliopsida*, los autores encontraron un aumento en locomoción y actividad central, y tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en la variable posición vertical en ninguno de sus grupos ensayados, pero sí una tendencia a disminuirlas con la dosis intermedia del jugo de zarzamora. Los autores de estos resultados sugieren una relación en la cantidad de polifenoles y antocianinas con su capacidad para generar efecto ansiolítico al estimular los receptores GABA_A (237). En este sentido, tanto la granada como la zarzamora presentan un gran contenido en polifenoles y antocianinas, por lo que probablemente sean responsables del efecto de tipo ansiolítico observado. En la siguiente sección se explicará a detalle los posibles mecanismos de acción de la granada.

En cuanto a los grupos tratados con DZP, el efecto ansiolítico no fue dependiente de la dosis y el mejor efecto ansiolítico y motor se presentó con las dosis de 1.77 mg/kg y 3.16 mg/kg en las variables distancia total recorrida, duración en centro y acicalamiento, estos datos coinciden con los de Gries *et al.*, donde probaron una curva dosis-respuesta de DZP encontrando que el mejor efecto ansiolítico se produce a dosis de 3.5 mg/kg (238). Es por ello, que las dosis de DZP más utilizadas en estudios para evaluar la conducta similar a ansiedad son dosis a partir de 2 y 3 mg/kg (209, 210, 213, 214, 217).

La prueba EPM es de las más utilizadas para evaluar el comportamiento ansioso en roedores al tener mayor sensibilidad a los efectos de agentes ansiolíticos y ansiogénicos (239), para confirmar los resultados obtenidos en el OFT, se utilizó esta prueba. En nuestro estudio encontramos que el DZP y el MEG a dosis alta, presentaron efecto ansiolítico, respecto al MEG, mostró una tendencia a aumentar

dicho efecto cuando se incrementa la dosis, lo cual se reflejó en un mayor tiempo de permanencia y entradas en los brazos abiertos, así como un mayor número del total de entradas en ambos brazos. Nuestros resultados se respaldan con el estudio de Villas Boas *et al.*, donde evaluaron el efecto ansiolítico de *Campomanesia pubescens* (CP) la cual pertenece al orden de los *Myrtales* al igual que la granada, los resultados indicaron que las dosis de CP ensayadas, aumentaron el tiempo de permanencia y entradas a los brazos abiertos, así como el total de entradas en ambos brazos (240). CP presenta un gran contenido de flavonoides los cuales producen acciones en el SNC (241), al igual que el jugo de granada que contiene un alto contenido en flavonoides. A pesar de que no existen antecedentes directos del efecto ansiolítico de un MEG, a lo largo de este documento se mostró que distintas partes de este fruto han sido evaluadas en ansiedad. Por otro lado, en cuanto al DZP, todos los grupos mostraron un efecto ansiolítico en las variables mencionadas por lo que determinamos que no es dosis dependiente pues el efecto que se encontró fue muy similar entre los cuatro grupos de DZP. Estos resultados se respaldan con el estudio de Bert *et al.*, donde se realizó una curva dosis – respuesta con DZP (0.5 - 4 mg/kg) i.p., donde el mejor efecto ansiolítico se registró a partir de la dosis de (0.5 – 3 mg/kg) (242), rango que coincide con las dosis de DZP usadas en el presente estudio.

Adicionalmente, se incorporó la variable índice de ansiedad propuesta por Cohen *et al.*, (243) la cual se diseñó con la finalidad de reunir los datos de cada uno de los parámetros individuales del comportamiento exploratorio para unificarlo y reflejar las medidas absolutas así como una tendencia general, creando así, una fórmula importante que involucra a todas las variables de medición en el EPM que arroja resultados en un rango del 0 a 1, donde un incremento del índice de ansiedad indica un comportamiento similar a la ansiedad y un rango cercano al cero indica lo opuesto. En nuestro estudio, utilizamos este índice de ansiedad para formar una curva dosis respuesta, donde el rango de 0 a 1 fue expresado como porcentaje de efecto ansiolítico, de tal forma que 0 equivale al 0% de efecto ansiolítico y 1 al 100% de efecto ansiolítico. En este sentido, el DZP presentó un porcentaje de efecto

ansiolítico del 79% al 82% mientras que el MEG presentó un porcentaje del 9% al 56% por lo que se corrobora que el MEG posee efecto dosis – dependiente, mientras que el DZP no lo presenta. Estos resultados coinciden con los de Fernández - Demeneghi *et al.*, (244) en donde el índice de ansiedad en el EPM disminuyó de manera similar en el grupo de jugo de frambuesa a dosis media y DZP en comparación con el grupo control quién tuvo valores cercanos a 1. El jugo de frambuesa presenta un alto contenido en ácido gálico y cianidina, presentes también en la granada (136). Aunque no se encontraron estudios similares donde se exprese el índice de ansiedad como porcentaje de efecto ansiolítico en una curva dosis - respuesta, esto representa una sugerencia para futuras investigaciones.

En la prueba HB, se terminó por corroborar los datos obtenidos en las pruebas anteriores. HB evalúa las reacciones de los roedores frente a un entorno desconocido y con ello muestra si existe un efecto de tipo ansiolítico que aumente la conducta exploratoria por lo que fármacos benzodiazepínicos son completamente eficaces en esta prueba. En este sentido, nuestro estudio encontró que MEG en su dosis más alta expresó un incremento significativo en las inmersiones de cabeza en los agujeros, estos resultados coinciden con estudios similares con jugo de granada (200 y 400 ml/kg) (213), los ratones mostraron mayor número de inmersiones de cabeza en los agujeros. Nuestros resultados se corroboran con el estudio de Rakib *et al.*, quienes encontraron que las concentraciones altas del extracto metanólico de *Tinospora crispa* incrementaron la inmersión de la cabeza de los ratones. Esta planta al igual que la granada, contiene flavonoides, esteroides y lignanos (245). La presencia de estos compuestos se asocia a un efecto de tipo ansiolítico. En cuanto al DZP, las dosis 1 - 3.16 mg/kg presentó un incremento significativo en las inmersiones de cabeza en los agujeros en comparación con el grupo control y DZP (1.77 mg/kg) presentó un efecto similar al MEG en su dosis alta. Estos resultados coinciden con que las dosis de DZP más utilizadas y con mayor efecto ansiolítico, comienza a partir de la dosis de 1 mg/kg (246).

9.2 Posibles mecanismos de acción que producen efecto ansiolítico en la granada

Los trastornos de ansiedad se desencadenan principalmente por la presencia de estrés crónico que resulta en el incremento de estrés oxidativo y un estado inflamatorio elevado (247) así como, alteraciones en el funcionamiento de regiones cerebrales y disfunción en la transmisión de diversos sistemas neurotransmisores (GABA, 5-HT, NA) y la desregularización del eje HPA (248, 249).

La evidencia científica indica que el consumo de polifenoles ayuda a prevenir y tratar la ansiedad gracias a su capacidad antioxidante mediante la reducción del estrés oxidativo y la capacidad que tiene de actuar en diferentes sistemas como GABA y por diferentes vías del sistema adrenérgico/noradrenérgico (250, 251), así como la disminución de la inflamación y la modulación del eje HPA (252). El MEG utilizado en nuestro estudio es elaborado únicamente de jugo, el cual en estudios previos se ha encontrado la presencia de un alto contenido de antocianinas, un estudio de microencapsulación de arilos de granada encontró que se retuvo cerca del 100% de antocianinas en las microcápsulas de granada (253). Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, los cuales le proporcionan su color rojizo al jugo y que poseen una amplia capacidad antioxidante provocando la inhibición de la producción de EROs e induciendo la expresión del Nrf2 para regular la expresión de enzimas antioxidantes endógenas, además de suprimir la liberación de mediadores proinflamatorios (166). Como ya se mencionó, el jugo de granada contiene antocianinas, principalmente la cianidina (254). Un estudio de Inan *et al.*, demostró que el tratamiento crónico con cianidina previno el comportamiento tipo ansiedad y el estado inflamatorio en un modelo de ratón al que se le indujo ansiedad (255). En este contexto, las antocianinas tienen una amplia capacidad para reducir los niveles de EROs, elevando los niveles de Nrf2 y disminuir el estado inflamatorio mediante la inhibición del NFκB (256). En modelos de roedores se ha encontrado niveles de acumulación de antocianinas de hasta 0.21 nmol/g en tejido cerebral, las cuales atraviesan la barrera hematoencefálica para transportarse al SNC y su

acumulación se produce en las células endoteliales del cerebro, el cuerpo estriado, el HPC, el cerebelo y la corteza donde poseen un papel neuroprotector (257). Por otro lado se encontró que el jugo de granada contiene elagitaninos (punicalagina, punicalina y derivados del ácido elágico) (258), así como quercetina y kaempferol (179). La quercetina y el kaempferol pertenecen al grupo de flavonoles, la quercetina posee la capacidad de disminuir la síntesis de CRH y con ello, regular el eje HPA (259, 260) mientras que el kaempferol actúa en el sitio de acción de GABA_A (261). La punicalagina es capaz de reducir la neuroinflamación interfiriendo la señalización del NFκB (262). El ácido elágico se encarga de reducir el estrés oxidativo, regula los mediadores proinflamatorios como IL-6 y TNFα, regula positivamente el Nrf2 e inhibe la acción de NF-κB (263). Un estudio de Cervantes-Anaya *et al.*, demostró que el ácido elágico y la punicalagina poseen la capacidad de atrapar radicales libres evitando el estrés oxidativo y preservando la homeostasis, además de encontrar que el ácido elágico reduce las citocinas proinflamatorias TNFα e IL-6 (264). Otro estudio en ratas Wistar encontró que el ácido elágico actúa como un antagonista parcial en el sitio de unión de GABA (265). Finalmente, el principal ácido fenólico en la granada es el ácido gálico (266), estudios recientes indican que este actúa en los receptores GABA_A (267, 268), así como en el sistema serotoninérgico (269) donde actúa en el receptor 5-HT_{1A} y disminuye los niveles de corticosterona por su acción ansiolítica en el HPC (270).

El efecto ansiolítico que generan los polifenoles se debe a propiedades neuroprotectoras que actúan a través de cambios en diferentes vías de neurotransmisión (271). En este sentido, está demostrado que el jugo de granada posee polifenoles de diversos grupos (163, 164), por lo que el efecto ansiolítico puede deberse a su acción en diferentes vías de neurotransmisión. Una de las limitaciones encontradas en nuestro estudio es que no se estudió el mecanismo de acción para demostrar el efecto ansiolítico encontrado, sin embargo, podemos sugerir que este efecto ocurre por la interacción de sus compuestos polifenólicos en el receptor GABA_A y 5-HT_{1A}.

X. CONCLUSIONES

En este estudio reunimos evidencia que sugiere que el microencapsulado de jugo de granada posee la capacidad de disminuir el comportamiento ansioso, el índice de ansiedad y aumentar la actividad exploratoria en las pruebas ensayadas, sin embargo, el diazepam ejerce mayor efecto ansiolítico en comparación con el microencapsulado, el cual solo en su dosis más alta (1777 mg/kg) presentó este efecto. Los datos de la curva dosis respuesta nos proporcionó evidencia que indica que el efecto ansiolítico del microencapsulado de jugo de granada es dosis – dependiente y que la dosis efectiva 50 corresponde a una dosis de 1584 mg/kg.

XI. PERSPECTIVAS

Se espera que se realicen más estudios a partir de la dosis de MEG que posee efecto de tipo ansiolítico para determinar el mecanismo de acción por el que actúa, así como, explorar el efecto del MEG en un modelo animal de ratas ovariectomizadas para determinar si posee efecto ansiolítico en este modelo de menopausia inducida. Asimismo, es recomendable estudiar y analizar la expresión de la proteína C-Fos, un marcador de actividad neuronal en las estructuras cerebrales como la amígdala, el HPC, el HPT, CPF que están directamente relacionadas con la regulación de la ansiedad, finalmente se sugiere evaluar por separado los principales compuestos presentes en MEG para determinar si el efecto ansiolítico se produce por un solo compuesto o por la mezcla de varios compuestos.

XII. RECOMENDACIONES

Se recomienda que para encontrar el mecanismo de acción del MEG se utilice un antagonista de los receptores GABA_A y 5HT_{1A}. Asimismo, se exhorta considerar que las dosis del MEG con efectos ansiolíticos reportadas en este estudio deben ser

adecuadamente convertidas a la dosis equivalente humana, considerando el método de superficie de área corporal (272). En cuanto al espacio de ejecución de las pruebas, se recomienda que los estudios sean realizados en un espacio aislado completamente de sonidos exteriores y tener un adecuado control de la luz. Las pruebas deben cumplir con las características descritas para evitar que el roedor se quede paralizado y que el estudio pueda arrojar resultados incorrectos.

XIII. REFERENCIAS

1. Guitérrez-García A, Contreras C. Anxiety: An adaptive emotion. *New Insights into Anxiety Disorders*. InTech. 2013;10:53223.
2. Kenwood MM, Kalin NH, Barbas H. The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2022;47(1):260-75.
3. Sierra JC, Ortega V, Zubeidat I. Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Revista mal-estar e subjetividade*. 2003;3(1):10-59.
4. Milena A, Madalena A, Estanislau C, Rodríguez J, Días H. Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y maladaptaciones. *Rev Latinoamericana de Psicología*. 2007;39(1):75-81.
5. Morales-Rodríguez M, Bedolla-Maldonado LC. Depresión y Ansiedad en Adolescentes: El papel de la Implicación Paterna. *Revista Electrónica Sobre Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación*. 2022;9(17).
6. Chand SP, Marwaha R, Bender RM. Anxiety (nursing). *StatPearls* [Internet]: StatPearls Publishing; 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
7. Kuaik ID, De la Iglesia G. Ansiedad: conceptualizaciones actuales. *Summa Psicológica*. 2019;16(1).
8. Ball TM, Gunaydin LA. Measuring maladaptive avoidance: from animal models to clinical anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2022;47(5):978-86.
9. Penninx B, Pine D, Holmes E, Reif A. Anxiety disorders (vol 397, pg 914, 2021). *Lancet*. 2021;397(10277):880-.
10. Amstadter A. Emotion regulation and anxiety disorders. *Journal of anxiety disorders*. 2008;22(2):211-21.
11. Organización Mundial de la Salud. Día Mundial de la Salud Mental: una oportunidad para impulsar un aumento a gran escala de la inversión en salud mental [Internet]. Ginebra; 2020. Disponible en: <https://www.who.int/>
12. Vigo D, Thornicroft G, Atun R. Estimating the true global burden of mental illness. *The Lancet Psychiatry*. 2016;3(2):171-8.
13. Cerecero-García D, Macías-González F, Arámburo-Muro T, Bautista-Arredondo S. Síntomas depresivos y cobertura de diagnóstico y tratamiento de depresión en población mexicana. *salud pública de méxico*. 2020;62(6):840-50.
14. Santomauro DF, Herrera AMM, Shadid J, Zheng P, Ashbaugh C, Pigott DM, et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet*. 2021;398(10312):1700-12.
15. World Health Organization. Mental disorders [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.who.int/>
16. Organización Panamericana de la Salud. La carga de los trastornos mentales en la

Región de las Américas [Internet]. Washington, D.C: OPS; 2018

17. INEGI. Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE) [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/>.
18. Gobierno de México. Sistema de Información en Salud (SIS) [Internet]. 2021. Disponible en: <http://www.dgjs.salud.gob.mx>
19. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders : DSM-5™ (5th ed.). American Psychiatric Publishing. 5th Ed. Washington, D.C.; 2013. Disponible en: <https://dsm.psychiatryonline.org/>
20. Watson D. Differentiating the mood and anxiety disorders: A quadripartite model. *Annual Review of Clinical Psychology*. 2009;5:221-47.
21. Shri R. Anxiety: causes and management. *The Journal of Behavioral Science*. 2010;5(1):100-18.
22. Beesdo K, Knappe S, Pine DS. Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *Psychiatric Clinics*. 2009;32(3):483-524.
23. Newman MG, Llera SJ, Erickson TM, Przeworski A, Castonguay LG. Worry and generalized anxiety disorder: a review and theoretical synthesis of evidence on nature, etiology, mechanisms, and treatment. *Annual review of clinical psychology*. 2013;9:275-97.
24. Chand SP, Marwaha R. Anxiety [Internet]. StatPearls Publishing; 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
25. Arango-Dávila CA, Rincón-Hoyos HG. Depressive disorder, anxiety disorder and chronic pain: multiple manifestations of a common clinical and pathophysiological core. *Revista Colombiana de Psiquiatría (English ed)*. 2018;47(1):46-55.
26. Schiele M, Domschke K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. *Genes, Brain and Behavior*. 2018;17(3):e12423.
27. Arenas MC, Puigcerver A. Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología*. 2009;3(1):20-9.
28. Maeng LY, Milad MR. Sex differences in anxiety disorders: interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and behavior*. 2015;76:106-17.
29. Ströhle A, Gensichen J, Domschke K. The diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2018;115(37):611.
30. Creswell C, Waite P, Hudson J. Practitioner Review: Anxiety disorders in children and young people—assessment and treatment. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2020;61(6):628-43.
31. Zhang A, Borhneimer LA, Weaver A, Franklin C, Hai AH, Guz S, et al. Cognitive behavioral therapy for primary care depression and anxiety: a secondary meta-analytic review using robust variance estimation in meta-regression. *Journal of behavioral medicine*. 2019;42:1117-41.
32. Bystritsky A, Khalsa SS, Cameron ME, Schiffman J. Current diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Pharmacy and Therapeutics*. 2013;38(1):30.
33. Shenoj SD, Soman S, Munoli R, Prabhu S. Update on pharmacotherapy in psychodermatological disorders. *Indian Dermatology Online Journal*. 2020;11(3):307.
34. Garakani A, Murrough JW, Freire RC, Thom RP, Larkin K, Buono FD, et al. Pharmacotherapy of anxiety disorders: current and emerging treatment options. *Frontiers in psychiatry*. 2020:1412.
35. Bandelow B. Current and novel psychopharmacological drugs for anxiety disorders. *Anxiety Disorders: Rethinking and Understanding Recent Discoveries*. 2020:347-65.
36. Hutchison SM, Mâsse LC, Pawluski JL, Oberlander TF. Perinatal selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) and other antidepressant exposure effects on anxiety and depressive behaviors in offspring: A review of findings in humans and rodent models. *Reproductive Toxicology*. 2021;99:80-95.

37. Lochmann D, Richardson T. Selective serotonin reuptake inhibitors. Antidepressants: From biogenic amines to new mechanisms of action. 2019;135-44.
38. Edinoff AN, Akuly HA, Hanna TA, Ochoa CO, Patti SJ, Ghaffar YA, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse effects: a narrative review. *Neurology International*. 2021;13(3):387-401.
39. Pasquereau B, Druil G, Saga Y, Richard A, Millot M, Météreau E, et al. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment retunes emotional valence in primate ventral striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2021;46(12):2073-82.
40. Bandelow B, Boerner R, Kasper S, Linden M, Wittchen H-U, Möller H-J. The diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2013;110(17):300.
41. Robinson C, Dalal S, Chitneni A, Patil A, Berger AA, Mahmood S, et al. A look at commonly utilized serotonin noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) in chronic pain. *Health Psychology Research*. 2022;10(3).
42. Fanelli D, Weller G, Liu H. New serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors and their anesthetic and analgesic considerations. *Neurology International*. 2021;13(4):497-509.
43. Bandelow B, Michaelis S, Wedekind D. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
44. Melaragno A, Spera V, Bui E. Psychopharmacology of Anxiety Disorders. *Clinical Handbook of Anxiety Disorders: From Theory to Practice*. 2020:251-67.
45. Farach FJ, Pruitt LD, Jun JJ, Jerud AB, Zoellner LA, Roy-Byrne PP. Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and future directions. *Journal of anxiety disorders*. 2012;26(8):833-43.
46. Dubovsky SL, Marshall D. Benzodiazepines remain important therapeutic options in psychiatric practice. *Psychotherapy and Psychosomatics*. 2022:1-28.
47. Pitsikas N, Tarantilis PA. The GABAA-Benzodiazepine Receptor Antagonist Flumazenil Abolishes the Anxiolytic Effects of the Active Constituents of *Crocus sativus* L. Crocins in Rats. *Molecules*. 2020;25(23):5647.
48. Cassano GB, Rossi NB, Pini S. Psychopharmacology of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
49. Simon LV, Keenaghan M. Serotonin syndrome [Internet]. StatPearls Publishing; 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
50. Sheffler ZM, Patel P, Abdijadid S. Antidepressants [Internet] StatPearls Publishing; 2019. Disponible en: <https://europepmc.org/article/>
51. Pary R, Sarai SK, Micchelli A, Lippmann S. Anxiety disorders in older patients. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*. 2019;21(1):23859.
52. Steimer T. The biology of fear-and anxiety-related behaviors. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
53. Linsambarth S, Moraga-Amaro R, Quintana-Donoso D, Rojas S, Stehberg J. The amygdala and anxiety. *The Amygdala - Where Emotion Shape Perception, Learning and Memories, Neuroscience InTech*. 2017:139-71.
54. Cannistraro PA, Rauch SL. Neural circuitry of anxiety: evidence from structural and functional neuroimaging studies. *Psychopharmacology bulletin*. 2003;37(4):8-25.
55. Kim J, Gorman J. The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*. 2005;4(5-6):335-47.
56. Marcinkiewicz CA, Bierlein-De La Rosa G, Dorrier CE, McKnight M, DiBerto JF, Pati D, et al. Sex-dependent modulation of anxiety and fear by 5-HT_{1A} receptors in the bed nucleus of the stria terminalis. *ACS chemical neuroscience*. 2019;10(7):3154-66.
57. Wang X, Zhang C, Ge S. Bed nuclei of the stria terminalis: A key hub in the modulation of anxiety. *European Journal of Neuroscience*. 2023.
58. Knight LK, Depue BE. New frontiers in anxiety research: the translational potential

- of the bed nucleus of the stria terminalis. *Frontiers in psychiatry*. 2019;10:510.
59. Sturm V, Lenartz D, Koulousakis A, Treuer H, Herholz K, Klein JC, et al. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive and anxiety disorders. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2003;26(4):293-9.
 60. Yamada S, Islam MS, van Kooten N, Bovee S, Oh Y-M, Tsujimura A, et al. Neuropeptide Y neurons in the nucleus accumbens modulate anxiety-like behavior. *Experimental neurology*. 2020;327:113216.
 61. Rajmohan V, Mohandas E. The limbic system. *Indian journal of psychiatry*. 2007;49(2):132-9.
 62. Ghasemi M, Navidhamidi M, Rezaei F, Azizikia A, Mehranfard N. Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*. 2022;22(3):431-49.
 63. Qin C, Li J, Tang K. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: development, function, and human diseases. *Endocrinology*. 2018;159(9):3458-72.
 64. Wu C, Zetter MA. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in anxiety disorders. *Stress and Brain*. 2022;2(3):53-65.
 65. Terlevic R, Isola M, Ragogna M, Meduri M, Canalaz F, Perini L, et al. Decreased hypothalamus volumes in generalized anxiety disorder but not in panic disorder. *Journal of affective disorders*. 2013;146(3):390-4.
 66. Mokhtar M, Singh P. Neuroanatomy, periaqueductal gray [Internet]. StatPearls Publishing; 2023. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
 67. Taylor NE, Pei J, Zhang J, Vlasov KY, Davis T, Taylor E, et al. The role of glutamatergic and dopaminergic neurons in the periaqueductal gray/dorsal raphe: separating analgesia and anxiety. *Eneuro*. 2019;6(1).
 68. Dixon ML, Thiruchselvam R, Todd R, Christoff K. Emotion and the prefrontal cortex: An integrative review. *Psychological bulletin*. 2017;143(10):1033.
 69. Teffer K, Semendeferi K. Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Progress in brain research*. 2012;195:191-218.
 70. McCall JG, Siuda ER, Bhatti DL, Lawson LA, McElligott ZA, Stuber GD, et al. Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife*. 2017;6:e18247.
 71. Morris LS, McCall JG, Charney DS, Murrough JW. The role of the locus coeruleus in the generation of pathological anxiety. *Brain and neuroscience advances*. 2020;4:2398212820930321.
 72. McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, et al. CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron*. 2015;87(3):605-20.
 73. Balaban CD. Neural substrates linking balance control and anxiety. *Physiology & behavior*. 2002;77(4-5):469-75.
 74. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):169-91.
 75. Lin Y-L, Wei C-W, Lerdall TA, Nhieu J, Wei L-N. Crabp1 modulates hpa axis homeostasis and anxiety-like behaviors by altering fkbp5 expression. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(22):12240.
 76. Lam VY, Raineki C, Wang LY, Chiu M, Lee G, Ellis L, et al. Role of corticosterone in anxiety and depressive-like behavior and HPA regulation following prenatal alcohol exposure. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019;90:1-15.
 77. Pomrenze MB, Tovar-Diaz J, Blasio A, Maiya R, Giovanetti SM, Lei K, et al. A corticotropin releasing factor network in the extended amygdala for anxiety. *Journal of Neuroscience*. 2019;39(6):1030-43.

78. Robinson SL, Perez-Heydrich CA, Thiele TE. Corticotropin releasing factor type 1 and 2 receptor signaling in the medial prefrontal cortex modulates Binge-like ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Brain sciences*. 2019;9(7):171.
79. Ventura-Silva AP, Borges S, Sousa N, Rodrigues AJ, Pêgo JM. Amygdalar corticotropin-releasing factor mediates stress-induced anxiety. *Brain research*. 2020;1729:146622.
80. Vasconcelos M, Stein DJ, Gallas-Lopes M, Landau L, de Almeida RMM. Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: implications for stress response and resilience. *Trends in psychiatry and psychotherapy*. 2020;42:195-206.
81. Graeff FG, Zangrossi Junior H. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychology & Neuroscience*. 2010;3:3-8.
82. Allen MJ, Sharma S. Physiology, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [Internet]. StatPearls Publishing; 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
83. Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2008;19(5):175-80.
84. Lim CT, Khoo B. Normal physiology of ACTH and GH release in the hypothalamus and anterior pituitary in man [Internet]. Endotext; 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>
85. Ouanes S, Popp J. High cortisol and the risk of dementia and Alzheimer's disease: a review of the literature. *Frontiers in aging neuroscience*. 2019;11:43.
86. Hinds JA, Sanchez ER. The Role of the Hypothalamus–Pituitary–Adrenal (HPA) Axis in Test-Induced Anxiety: Assessments, Physiological Responses, and Molecular Details. *Stresses*. 2022;2(1):146-55.
87. Juruena MF, Erer F, Cleare AJ, Young AH. The role of early life stress in HPA axis and anxiety. *Anxiety disorders: Rethinking and understanding recent discoveries*. 2020:141-53.
88. Shea C. How HPA stress response relates to anxiety: Sex differences and estradiol. 2021.
89. Tafet GE, Nemeroff CB. Pharmacological treatment of anxiety disorders: the role of the HPA axis. *Frontiers in psychiatry*. 2020;11:443.
90. Roberts S, Keers R, Lester KJ, Coleman JR, Breen G, Arendt K, et al. HPA axis related genes and response to psychological therapies: genetics and epigenetics. *Depression and anxiety*. 2015;32(12):861-70.
91. Knapp S. HPA AXIS [Internet]. *Biologydictionary*; 2020. Disponible en: <https://biologydictionary.net/>
92. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2015:165-75.
93. Vismara M, Gironi N, Cirnigliaro G, Fasciana F, Vanzetto S, Ferrara L, et al. Peripheral biomarkers in DSM-5 anxiety disorders: an updated overview. *Brain Sciences*. 2020;10(8):564.
94. Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology*. 2003;70(2):83-244.
95. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.
96. Blier P, El Mansari M. The importance of serotonin and noradrenaline in anxiety. *International journal of psychiatry in clinical practice*. 2007;11(sup2):16-23.
97. Sun Y, Hunt S, Sah P. Norepinephrine and corticotropin-releasing hormone: partners in the neural circuits that underpin stress and anxiety. *Neuron*. 2015;87(3):468-70.
98. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2005;29(8):1214-24.

99. Hussain LS, Reddy V, Maani CV. Physiology, noradrenergic synapse [Internet]. StatPearls Publishing; 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
100. Zarrindast M-R, Khakpai F. The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. *Archives of Iranian medicine*. 2015;18(9).
101. Bhatia A, Lenchner JR, Saadabadi A. Biochemistry, dopamine receptors [Internet]. StatPearls Publishing; 2022. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
102. de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology*. 2010;90(2):198-216.
103. Mihic SJ, Harris RA. GABA and the GABAA receptor. *Alcohol health and research world*. 1997;21(2):127.
104. Allen MJ, Sabir S, Sharma S. GABA receptor [Internet]. StatPearls Publishing; 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
105. Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh Jr RM, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature*. 2018;559(7712):67-72.
106. Ghit A, Assal D, Al-Shami AS, Hussein DEE. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021;19(1):1-15.
107. Enna SJ. The GABA receptors. In: Enna SJ, Möhler H. *The receptors*. Springer; 2007. p. 1-6
108. Wu C, Sun D. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metabolic brain disease*. 2015;30:367-79.
109. Benarroch EE. GABAB receptors: structure, functions, and clinical implications. *Neurology*. 2012;78(8):578-84.
110. Evenseth LSM, Gabrielsen M, Sylte I. The GABAB receptor—structure, ligand binding and drug development. *Molecules*. 2020;25(13):3093.
111. Bassetti D. Keeping the balance: GABAB receptors in the developing brain and beyond. *Brain Sciences*. 2022;12(4):419.
112. Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Brazilian Journal of Psychiatry*. 2013;35:S101-S11.
113. Mineka S. Animal models of anxiety-based disorders: Their usefulness and limitations. *Anxiety and the anxiety disorders*: Routledge; 2019. p. 199-244.
114. Fuchs E, Flügge G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
115. Padurariu M, Antioch I, Balmus I, Ciobica A, El-Lethey HS, Kamel MM. Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2017;5(2):98-104.
116. Bourin M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
117. Yoav Litvin A, Pentkowski NS, Pobbe RL, Blanchard DC, Blanchard RJ. Unconditioned models of fear and anxiety. *Handbook of Anxiety and Fear*. 2011:81.
118. Rodgers R, Cao B-J, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian journal of medical and biological research*. 1997;30:289-304.
119. Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
120. Kreutzmann JC, Marin M-F, Fendt M, Milad MR, Ressler K, Jovanovic T. Unconditioned response to an aversive stimulus as predictor of response to conditioned fear and safety: A cross-species study. *Behavioural Brain Research*. 2021;402:113105.
121. Delgado MR, Olsson A, Phelps EA. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biological psychology*. 2006;73(1):39-48.

122. Shechner T, Hong M, Britton JC, Pine DS, Fox NA. Fear conditioning and extinction across development: Evidence from human studies and animal models. *Biological psychology*. 2014;100:1-12.
123. Costanzi M, Sarauli D, Cannas S, D'Alessandro F, Florenzano F, Rossi-Arnaud C, et al. Fear but not fright: re-evaluating traumatic experience attenuates anxiety-like behaviors after fear conditioning. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014;8:279.
124. Bourin M, Petit-Demoulière B, Nic Dhonnchadha B, Hascöet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2007;21(6):567-74.
125. Flint J. Animal models of anxiety. In Plomin R, DeFries JC, Craig IW, McGuffin P. *Behavioral genetics in the postgenomic era*. American Psychological Association; 2003. p.425-41.
126. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2013;68(2):175-83.
127. Hoffman KL. *Modeling neuropsychiatric disorders in laboratory animals*: Woodhead Publishing; 2015.
128. Zimcikova E, Simko J, Karesova I, Kremlacek J, Malakova J. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test? *Seizure*. 2017;52:35-40.
129. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2015(96).
130. Buccafusco J, Bailey K, Crawley J. *Anxiety-related behaviors in mice. Methods of behavior analysis in neuroscience 2nd ed* Boca Raton: CRC Press. 2009:139.
131. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):3-33.
132. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1985;14(3):149-67.
133. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology biochemistry and behavior*. 1986;24(3):525-9.
134. Knight P, Chellian R, Wilson R, Behnood-Rod A, Panunzio S, Bruijnzeel AW. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2021;204:173168.
135. Cohen H, Matar MA, Joseph Z. Animal models of post-traumatic stress disorder. *Current protocols in neuroscience*. 2013;64(1):9.45. 1-9.. 18.
136. Fernández-Demeneghi R, Rodríguez-Landa J-F, Guzmán-Gerónimo R-I, Acosta-Mesa H-G, Meza-Alvarado E, Vargas-Moreno I, et al. Effect of blackberry juice (*Rubus fruticosus* L.) on anxiety-like behaviour in Wistar rats. *International journal of food sciences and nutrition*. 2019;70(7):856-67.
137. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. *The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. Pre-clinical models*: Springer; 2019. p. 69-74.
138. Pisula W, Modlinska K, Goncikowska K, Chrzanowska A. Can the Hole-Board Test Predict a Rat's Exploratory Behavior in a Free-Exploration Test? *Animals*. 2021;11(4):1068.
139. Chagas LA, Batista TH, Ribeiro ACA, Ferrari MS, Vieira JS, Rojas VC, et al. Anxiety-like behavior and neuroendocrine changes in offspring resulting from gestational post-traumatic stress disorder. *Behavioural Brain Research*. 2021;399:113026.
140. Casarrubea M, Sorbera F, Crescimanno G. Structure of rat behavior in hole-board: I) multivariate analysis of response to anxiety. *Physiology & behavior*. 2009;96(1):174-9.
141. Casarrubea M, Sorbera F, Crescimanno G. Structure of rat behavior in hole-board: II) multivariate analysis of modifications induced by diazepam. *Physiology & behavior*. 2009;96(4-5):683-92.

142. Brown GR, Nemes C. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia? *Behavioural processes*. 2008;78(3):442-8.
143. Heber D, Schulman RN, Seeram NP. *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*: CRC press; 2006.
144. Stover E, Mercure EW. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience*. 2007;42(5):1088-92.
145. Bhandari PR. Pomegranate (*Punica granatum* L). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 2012;2(3):171.
146. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A review study on *Punica granatum* L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 2016;21(3):221-7.
147. Bayramova A, Isayeva N. History and Prospects of Using *Punica granatum* L. *Bulletin of Science and Practice*. 2022.
148. Khadivi A, Mirheidari F, Moradi Y, Paryan S. Morphological variability of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions from natural habitats in the Northern parts of Iran. *Scientia Horticulturae*. 2020;264:109165.
149. Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T, Bhat TA. *Pomegranate (Punica granatum)—Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas: Nutritional and Health Benefits*: Springer; 2021. p. 131-44.
150. Trabelsi A, El Kaibi MA, Abbassi A, Horchani A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of *Punica granatum* (pomegranate) leaves. *Scientifica*. 2020;2020.
151. Zeynalova A, Novruzov E. Origin, taxonomy and systematics of pomegranate. *Proceedings of the Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences*. 2017;37.
152. Chen M, Zhang T, Yuan Z, editors. *Evolution and classification of pomegranate*. IV International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits 1254; 2017.
153. Integrated Taxonomic Information System - Report. *Punica granatum* L [Internet] GBIF secretariat; 2023. Disponible en: <https://www.gbif.org/dataset/>
154. GBIF Backbone Taxonomy. *Punica granatum* L [Internet] GBIFs; 2022. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/>
155. Erkan M, Kader A. *Pomegranate (Punica granatum L.)*. *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*: Elsevier; 2011. p. 287-313e.
156. Bobomurodov M, Xolmuminova M. Biology and history of culture of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Pomegranate growing countries around the world*,. *International Journal of Social Science & Interdisciplinary Research*. 2022;11(03):175-7.
157. Tupa Barrantes DH. Enraizamiento de estacas de 4 variedades de granado (*Punica Granatum* L.) Con 2 fuentes de auxinas en diferentes concentraciones, *Majes* 2013. 2014.
158. Melgarejo P, Núñez-Gómez D, Legua P, Martínez-Nicolás JJ, Almansa MS. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;102:232-6.
159. Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I. Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Horticultural reviews*. 2009;35:127-91.
160. Fundación española de la nutrición. *Alimentos y bebidas* [Internet]. FEN; 2021. Disponible en: <https://www.fen.org.es/>
161. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. *Tabla de composición de alimentos de centroamérica* [Internet]. INCAP; 2012. Disponible en: <http://www.incap.int/mesocaribefoods/>
162. Rowayshed G, Salama A, Abul-Fadl M, Akila-Hamza S, Emad AM. Nutritional and chemical evaluation for pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel and seeds powders by

- products. *Middle East Journal of Applied Sciences*. 2013;3(4):169-79.
163. Tanaka T, Nonaka G-I, Nishioka I. Tannins and Related Compounds. XL.: Revision of the Structures of Punicalin and Punicalagin, and Isolation and Characterization of 2-O-Galloylpunicalin from the Bark of *Punica granatum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1986;34(2):650-5.
164. Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Tannins and related compounds. XLI.: Isolation and characterization of novel ellagitannins, punicacorteins A, B, C, and D, and punigluconin from the bark of *Punica granatum* L. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1986;34(2):656-63.
165. Ranjha MMAN, Shafique B, Wang L, Irfan S, Safdar MN, Murtaza MA, et al. A comprehensive review on phytochemistry, bioactivity and medicinal value of bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum*). *Advances in Traditional Medicine*. 2021:1-21.
166. Wu S, Tian L. Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). *Molecules*. 2017;22(10):1606.
167. Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food chemistry*. 2018;261:75-86.
168. Hegazi NM, El-Shamy S, Fahmy H, Farag MA. Pomegranate juice as a super-food: A comprehensive review of its extraction, analysis, and quality assessment approaches. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2021;97:103773.
169. Tripathi S, Singh D. Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000;33:1351-5.
170. Plumb G, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Williamson G. Antioxidant properties of galocatechin and prodelphinidins from pomegranate peel. *Redox Report*. 2002;7(1):41-6.
171. Magangana TP, Makunga NP, Fawole OA, Opara UL. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel waste: A review. *Molecules*. 2020;25(20):4690.
172. Arun N, Singh D. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. *IJPSR*. 2012;3(5):1240-5.
173. Miguel MG, Neves MA, Antunes MD. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties-A short review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(25):2836-47.
174. Hussein SA, Barakat HH, Merfort I, Nawwar MA. Tannins from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. 1997;45(4):819-23.
175. Tanaka T, Nonaka G-I, Nishioka I. Punicafolin, an ellagitannin from the leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*. 1985;24(9):2075-8.
176. Valero-Mendoza A, Meléndez-Rentería N, Chávez-González M, Flores-Gallegos A, Wong-Paz J, Govea-Salas M, et al. The whole pomegranate (*Punica granatum* L.), biological properties and important findings: A review. *Food Chemistry Advances*. 2022:100153.
177. Yisimayili Z, Chao Z. A review on phytochemicals, metabolic profiles and pharmacokinetics studies of the different parts (juice, seeds, peel, flowers, leaves and bark) of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*. 2022:133600.
178. Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, van der Greef J. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*. 2004;65(2):233-41.
179. Bonesi M, Tundis R, Sicari V, Loizzo MR. The juice of pomegranate (*Punica granatum* L.): Recent studies on its bioactivities. *Quality control in the beverage industry: Elsevier*; 2019. p. 459-89.

180. Kaseke T, Opara UL, Fawole OA. Fatty acid composition, bioactive phytochemicals, antioxidant properties and oxidative stability of edible fruit seed oil: Effect of preharvest and processing factors. *Heliyon*. 2020;6(9):e04962.
181. Melo ILPd, Carvalho EBTd, Yoshime LT, Sattler JAG, Pavan RT, Mancini-Filho J. Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.). *Food Science and Technology*. 2016;36:132-9.
182. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food chemistry*. 2011;127(2):807-21.
183. Ali Redha A, Hasan A, Mandeel Q. Phytochemical determinations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril extracts and their antioxidant, antidiabetic and antibacterial activity. *Nat Prod Chem Res*. 2018;6(4):1-9.
184. Ge S, Duo L, Wang J, Yang J, Li Z, Tu Y. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of ethnopharmacology*. 2021;271:113877.
185. Lansky E, Shubert S, Neeman I. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. Martínez-Tomé J, ed *Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology* Zaragoza: CIHEAM. 2000:231-5.
186. Viswanath M, Sridevi P, Bhagavan B, Kumar KR, Subbaramamma P. Toxicological, Pharmacological and Cellular properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019;8(2):172-6.
187. Ramezani A, Erkan M. Pomegranates (*Punica granatum* L.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2nd Edition. 2017:1179-94.
188. Fathy SM, El-Dash HA, Said NI. Neuroprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and seed extract in paraquat-induced mouse model of Parkinson's disease. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21(1):1-15.
189. Trapali M, Lagouri V. Vasculoprotective and Neuroprotective Effects of Various Parts of Pomegranate: In Vitro, In Vivo, and Preclinical Studies. *Pomegranate*. 2021.
190. Jacob J, Rajiv P, Gopalan R, Lakshmanaperumalsamy P. An Overview of Phytochemical and pharmacological potentials of *Punica granatum* L. *Pharmacognosy Journal*. 2019;11(5).
191. Farag RS, Abdel-Latif MS, Abd El Baky HH, Tawfeek LS. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnology Reports*. 2020;28:e00536.
192. Uzuner S. Pomegranate. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables: Elsevier*; 2020. p. 549-63.
193. Saaty AH. Renoprotective Influence of Pomegranate Juice on Nephrotoxicity Induced by Methotrexate. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(40B):103-13.
194. Tienda-Vázquez MA, Morreeuw ZP, Sosa-Hernández JE, Cardador-Martínez A, Sabath E, Melchor-Martínez EM, et al. Nephroprotective plants: a review on the use in pre-renal and post-renal diseases. *Plants*. 2022;11(6):818.
195. Betanzos-Cabrera G, Montes-Rubio PY, Fabela-Illescas HE, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Food & nutrition research*. 2015;59(1):27620.
196. Prasad D, Kunnaiah R. *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2014;18(4):428.
197. Bassiri-Jahromi S. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncology reviews*. 2018;12(1).
198. Kujawska M, Jourdes M, Kurpik M, Szulc M, Szaefer H, Chmielarz P, et al.

Neuroprotective effects of pomegranate juice against Parkinson's disease and presence of ellagitannins-derived metabolite—uroolithin A—in the brain. *International journal of molecular sciences*. 2019;21(1):202.

199. Shrivastava M, Khuntia D, Shrivastava M, Misra M. Studies on Pomegranate seed oil enriched Galantamine Hydrobromide microemulsion: formulation, in vitro antioxidant and neuroprotective potential. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2023(just-accepted):1-28.

200. Valdés-Sustaita B, Estrada-Camarena E, González-Trujano ME, López-Rubalcava C. Estrogen receptors- β and serotonin mediate the antidepressant-like effect of an aqueous extract of pomegranate in ovariectomized rats. *Neurochemistry International*. 2021;142:104904.

201. Guerrero-Solano JA, Bautista M, Espinosa-Juárez JV, Moreno-Rocha LA, Betanzos-Cabrera G, Salanță LC, et al. Differential Antinociceptive Efficacy of Peel Extracts and Lyophilized Juices of Three Varieties of Mexican Pomegranate (*Punica granatum* L.) in the Formalin Test. *Plants*. 2023;12(1):131.

202. Guerrero-Solano JA, Jaramillo-Morales OA, Velázquez-González C, De la O-Arciniega M, Castañeda-Ovando A, Betanzos-Cabrera G, et al. Pomegranate as a potential alternative of pain management: A review. *Plants*. 2020;9(4):419.

203. Guerrero-Solano JA, Bautista M, Velázquez-González C, De la O-Arciniega M, González-Olivares LG, Fernández-Moya M, et al. Antinociceptive Synergism of Pomegranate Peel Extract and Acetylsalicylic Acid in an Animal Pain Model. *Molecules*. 2021;26(18):5434.

204. Mohammed C, Mohamed A, Ahmed A, Mariod A. Antioxidant and anti-diabetic activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves extracts. *Foods and Raw materials*. 2020;8(2):329-36.

205. Hou C, Zhang W, Li J, Du L, Lv O, Zhao S, et al. Beneficial effects of pomegranate on lipid metabolism in metabolic disorders. *Molecular nutrition & food research*. 2019;63(16):1800773.

206. Akter R, Ahn JC, Nahar J, Awais M, Ramadhania ZM, Oh S-W, et al. Pomegranate juice fermented by tannin acyl hydrolase and *Lactobacillus vespulae* DCY75 enhance estrogen receptor expression and anti-inflammatory effect. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.

207. Álvarez-Cervantes P, Izquierdo-Vega JA, Morán-León J, Guerrero-Solano JA, García-Pérez BE, Cancino-Díaz JC, et al. Subacute and subchronic toxicity of microencapsulated pomegranate juice in rats and mice. *Toxicology Research*. 2021;10(2):312-24.

208. Kumar S, Maheshwari KK, Singh V. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of *Punica granatum* L. seeds in mice. 2008.

209. Riaz A, Khan RA. Effect of *Punica Granatum* on behavior in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014;8(44):1118-26.

210. Das S, Sarma P. A study on the anticonvulsant and antianxiety activity of ethanolic extract of *Punica granatum* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(2):389-92.

211. Jahromy MH, Shariatifar A, Samiee S, Vaziri M, Shahraki MB, Dara SM. Involvement of Serotonergic System and Magnesium on Anxiolytic Effects of Pomegranate in Male Mice. *World Journal of Neuroscience*. 2014;2014.

212. Kalshetti P, Alluri R, Thakurdesai P. Antidepressant and anti-anxiety effect of ellagic acid from *Punica granatum* L. rind in olfactory bulbectomy model in rats. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2015;34(1):197-204.

213. Kulkarni S. Evaluation of *Punica granatum* fruit juice for anti-anxiety activity. *International J Biomed and Adv Res*. 2016;7(9):452-5.

214. Riaz A, Khan RA. Behavioral effects of Citrus limon and Punica granatum combinations in rats. *Metabolic brain disease*. 2017;32(1):123-31.
215. Gadouche L, Djebli N, Zerrouki K. Algerian pomegranate peel decreases lead concentration in brain and improves neurological disorders. *Pol J Nat Sci*. 2020;35:97-107.
216. Estrada-Camarena E, López-Rubalcava C, Ramírez-Rodríguez G, Pulido D, Cervantes-Anaya N, Azpilcueta-Morales G, et al. Aqueous extract of pomegranate enriched in ellagitannins prevents anxiety-like behavior and metabolic changes induced by cafeteria diet in an animal model of menopause. *Neurochemistry International*. 2020;141:104876.
217. Dhakal K, Chaudhary K, Paudel S, Pant M, Adhikari C, Raj R, et al. Assessment of anti-oxidant, anti-epileptic and anti-anxiety activities of pomegranate leaf () in mice Punica grantum. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021;7(2):58-62.
218. Abu-Taweel GM, Al-Mutary MG. Pomegranate juice moderates anxiety-and depression-like behaviors in AICI3-treated male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2021;68:126842.
219. Hassanen EI, Ibrahim MA, Hassan AM, Mehanna S, Aljuaydi SH, Issa MY. Neuropathological and cognitive effects induced by CuO-NPs in rats and trials for prevention using pomegranate juice. *Neurochemical Research*. 2021;46:1264-79.
220. Zhu X, Sun-Waterhouse D, Cui C. A red pomegranate fruit extract-based formula ameliorates anxiety/depression-like behaviors via enhancing serotonin (5-HT) synthesis in C57BL/6 male mice. *Food Science and Human Wellness*. 2021;10(3):289-96.
221. Patil C, Pansare K, Saad M, Somavanshi D, Sonawane G, Kharat A. Anxiolytic Effect of Punica Granatum Linn. Methanolic Leaves Extract in Mice. *NeuroQuantology*. 2022;20(19):149-63.
222. Guina J, Merrill B. Benzodiazepines I: upping the care on downers: the evidence of risks, benefits and alternatives. *Journal of clinical medicine*. 2018;7(2):17.
223. Estrada-Luna D, Carreón-Torres E, Bautista-Pérez R, Betanzos-Cabrera G, Dorantes-Morales A, Luna-Luna M, et al. Microencapsulated pomegranate reverts high-density lipoprotein (hdl)-induced endothelial dysfunction and reduces postprandial triglyceridemia in women with acute coronary syndrome. *Nutrients*. 2019;11(8):1710.
224. Animal Research Tomorrow. The Basel Declaration [Internet]. 2011. Disponible en: <https://animalresearchtomorrow.org/>
225. Dunbar G, Higa J, Jones T, Kaminski B, Panicker S. Guidelines for ethical conduct in the care and use of nonhuman animals in research. American Psychological Association Committee on Animal Rights Research and Ethics 2010-2011. 2012:1-9.
226. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [Internet]. 2001. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/>
227. Lepicard EM, Joubert C, Hagneau I, Perez-Diaz F, Chapouthier G. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2000;67(4):739-48.
228. Griebel G, Sanger DJ, Perrault G. The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and BZ-1 (ω 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology*. 1996;124(3):245-54.
229. Boissier J. La reaction d'exploration chez la souris. *Therapie*. 1962;17:1225-32.
230. File SE, Wardill AG. The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia*. 1975;44:47-51.
231. Haimez C. How much for a star? Elements for a rational choice of sample size in preclinical trials. *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(5):221-5.
232. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*. 1990;46(3):321-40.
233. Hoffman KL. Measuring endophenotypes in rodent models. In: 78 WPSiBN, editor.

Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals

2016. p. 116-18.

234. You R, Liu Y, Chang RC-C. A behavioral test battery for the repeated assessment of motor skills, mood, and cognition in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019(145):e58973.

235. Scholl JL, Afzal A, Fox LC, Watt MJ, Forster GL. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology & behavior*. 2019;211:112670.

236. Moody T, Merali Z, Crawley J. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988;525:281-90.

237. Hanrahan JR, Chebib M, Johnston GA. Flavonoid modulation of GABAA receptors. *British journal of pharmacology*. 2011;163(2):234-45.

3

238. Gries DA, Condouris GA, Shey Z, Houpt M. Anxiolytic-like action in mice treated with nitrous oxide and oral triazolam or diazepam. *Life Sciences*. 2005;76(15):1667-74.

239. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987;92:180-5.

240. Villas Boas GR, Stefanello da Silveira AP, Feitosa Farinelli BC, Lima Cardoso CA, Arce E, Oesterreich SA. The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: Behavioral evidences. *Nutritional Neuroscience*. 2020;23(1):16-26.

241. Villas Boas GR. Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e dos efeitos antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (DC) O. BERG em ratos. 2018.

242. Bert B, Fink H, Sohr R, Rex A. Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2001;70(2-3):411-20.

243. Cohen H, Matar MA, Buskila D, Kaplan Z, Zohar J. Early post-stressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry*. 2008;64(8):708-17.

244. Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J, Guillen-Ruiz G, Bernal-Morales B. Myristic acid produces anxiolytic-like effects in Wistar rats in the elevated plus maze. *BioMed Research International*. 2014;2014.

245. Rakib A, Ahmed S, Islam MA, Uddin MMN, Paul A, Chy MNU, et al. Pharmacological studies on the antinociceptive, anxiolytic and antidepressant activity of *Tinospora crispa*. *Phytotherapy Research*. 2020;34(11):2978-84.

246. Wolfman C, Viola H, Paladini A, Dajas F, Medina JH. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1994;47(1):1-4.

247. Salim S. Oxidative stress and psychological disorders. *Current neuropharmacology*. 2014;12(2):140-7.

248. Busler J, Coello E, Liao V, Lin A, Mahon P. Cortical GABA and perceived stress in adults. *Biological Psychiatry*. 2021;89(9):S381-S2.

249. Zhu X, Yao Y, Li X, Dong J, Zhang A. Alteration of GABAergic signaling is associated with anxiety-like behavior in temporal lobe epilepsy mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019;93:141-8.

250. Bouayed J. Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current nutrition & food science*. 2010;6(1):13-8.

251. Itoi K, Sugimoto N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *Journal of neuroendocrinology*. 2010;22(5):355-61.

252. Pizarro Meléndez GP, Valero-Jara V, Acevedo-Hernández P, Thomas-Valdés S.

- Impact of polyphenols on stress and anxiety: a systematic review of molecular mechanisms and clinical evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022;1-18.
253. Nogueira RI, Santiago MCPdA, dos Santos Gomes F, Pontes SM, Lopes PRC, Freitas SP, editors. *Microencapsulation of Bioactive Compounds From Pomegranate (Punica granatum L) Juice Using Spray Drying*. European Drying Conference, Balearic Island, Spain; 2011: Citeseer.
254. Zhao X, Yuan Z. Anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum L.*) and their role in antioxidant capacities in vitro. *Chemistry & Biodiversity*. 2021;18(10):e2100399.
255. Inan S, Meissler JJ, Shekarabi A, Foss J, Wiah S, Eisenstein TK, et al. Cyanidin prevents MDPV withdrawal-induced anxiety-like effects and dysregulation of cytokine systems in rats. *Brain Research*. 2023;1806:148310.
256. Li P, Feng D, Yang D, Li X, Sun J, Wang G, et al. Protective effects of anthocyanins on neurodegenerative diseases. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;117:205-17.
257. Zhong H, Xu J, Yang M, Hussain M, Liu X, Feng F, et al. Protective Effect of Anthocyanins against Neurodegenerative Diseases through the Microbial-Intestinal-Brain Axis: A Critical Review. *Nutrients*. 2023;15(3):496.
258. García-Villalba R, Tomás-Barberán FA, Iglesias-Aguirre CE, Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Selma MV, et al. Ellagitannins, urolithins, and neuroprotection: Human evidence and the possible link to the gut microbiota. *Molecular Aspects of Medicine*. 2023;89:101109.
259. Wróbel-Biedrawa D, Grabowska K, Galanty A, Sobolewska D, Podolak I. A flavonoid on the brain: quercetin as a potential therapeutic agent in central nervous system disorders. *Life*. 2022;12(4):591.
260. Sakakibara H, Shimoi K. Anti-stress effects of polyphenols: animal models and human trials. *Food & function*. 2020;11(7):5702-17.
261. Vissiennon C, Nieber K, Kelber O, Butterweck V. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin—are they prodrugs? *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(7):733-40.
262. Rozadi N, Oktavia S, Fauziah F. Pharmacological Activities of Punicalagin: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2022;12(2):148-55.
263. Gupta A, Singh AK, Kumar R, Jamieson S, Pandey AK, Bishayee A. Neuroprotective potential of ellagic acid: a critical review. *Advances in Nutrition*. 2021;12(4):1211-38.
264. Cervantes-Anaya N, Azpilcueta-Morales G, Estrada-Camarena E, Ramirez Ortega D, Pérez de la Cruz V, González-Trujano ME, et al. Pomegranate and its components, punicalagin and ellagic acid, promote antidepressant, antioxidant, and free radical-scavenging activity in ovariectomized rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2022;16:169.
265. Jain V, Pareek A, Bhardwaj YR, Sinha SK, Gupta MM, Singh N. Punicalagin and ellagic acid containing *Punica granatum L.* fruit rind extract prevents vincristine-induced neuropathic pain in rats: an in silico and in vivo evidence of GABAergic action and cytokine inhibition. *Nutritional Neuroscience*. 2022;25(10):2149-66.
266. Cheng J, Li J, Xiong R-G, Wu S-X, Huang S-Y, Zhou D-D, et al. Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. *Food Bioscience*. 2023:102629.
267. Pereira MM, De Morais H, dos Santos Silva E, Corso CR, Adami ER, Carlos RM, et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. *Metabolic brain disease*. 2018;33:1573-84.
268. Singh P, Rahul M, Thawani V, Sudhakar P. Anxiolytic effect of chronic administration of gallic acid in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013;3(7):101-4.
269. Mansouri MT, Soltani M, Naghizadeh B, Farbood Y, Mashak A, Sarkaki A. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze.

Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2014;117:40-6.

270. Bhuia MS, Rahaman MM, Islam T, Bappi MH, Sikder MI, Hossain KN, et al. Neurobiological effects of gallic acid: current perspectives. Chinese Medicine. 2023;18(1):27.

271. Rebas E, Rzaiew J, Radzik T, Zylinska L. Neuroprotective polyphenols: A modulatory action on neurotransmitter pathways. Current neuropharmacology. 2020;18(5):431-45.

272. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. The FASEB journal. 2008;22(3):659-61.

XIV. ANEXOS

Anexo 1: Dictamen de evaluación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 COORDINACIÓN ACADÉMICA
 DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
 DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
 COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE
 LABORATORIO



DICTAMEN DE EVALUACIÓN

INSTITUCIÓN (Subdirección, Departamento o Área de trabajo): Instituto de Ciencias de la Salud Área Académica de Nutrición		FOLIO: CICAL/002/2022	
		FECHA DE SOLICITUD: 30/11/ 2021	
PROYECTO: Efecto de un microencapsulado de granada (<i>Punica granatum</i> L.) sobre la conducta tipo ansiedad en ratas Wistar.		RESPONSABLE DEL PROYECTO: Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez diana_olivo@uaeh.edu.mx Cel. 2281385474	
INVESTIGADORES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: Dr. Gabriel Betanzos Cabrera; gbetanzos@uaeh.edu.mx ; 7711999170			
ALUMNOS O PASANTES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: LE: Tania Flores Bazán			
ASPECTOS A EVALUAR:	RESULTADO		
	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIOS	X		
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X		
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X		
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X		
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X		
OBSERVACIONES GENERALES La alumna, presenta comprobante del curso de uso y manejo de animales de laboratorio, por lo que no es necesario que tome este curso nuevamente.			
FECHA DE REVISIÓN	RESULTADO	SI	NO
20 de enero 2022	APROBADO	X	
FECHA DE APROBACIÓN	NEGADO		
01 de febrero de 2022	PROPUESTAS O CAMBIO		
Fecha de inicio: febrero 2022		Fecha de término: enero 2023	
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN: 45 ratas Wistar, macho de 8 a 10 semanas, de 200 a 250 g			
INVESTIGADOR PRINCIPAL DRA. DIANA P. OLIVO RAMÍREZ	PRESIDENTE DEL CICAL DR. CARLOS A. GÓMEZ ALDAPA	DIRECTOR DEL BIOTERIO DR. HÉCTOR HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ	