



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Psicología

GRADO EN PSICOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

**ANÁLISIS CONDUCTUAL DEL
FÁRMACO “EPHENIDINE”
COMO POSIBLE CANDIDATO
PARA EL TRATAMIENTO DE LA
DEPRESIÓN**

Presentado por:
Teresa Aparicio Mescua
Tutor:
Ignacio Morón Henche
2021/2022



Declaración de Originalidad del TFG

D./Dña. Teresa Aparicio Mescua, con DNI (o pasaporte) 79055356-D declaro que el presente Trabajo de Investigación es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citadas debidamente. En caso de TFGs vinculados con las Prácticas Externas, declaro que el TFG es un trabajo con entidad independiente a la memoria de prácticas presentada. Para que conste así lo firmo el presente en Granada a 5 de junio de 2022.

Firma del estudiante

Los datos personales recogidos serán incorporados y tratados en el fichero estudiantes, cuya finalidad es el almacenamiento de datos personales, académicos y administrativos de los estudiantes de la Universidad de Granada para la gestión de sus expedientes, con las cesiones previstas legalmente. El órgano responsable del fichero es la Secretaría General de la Universidad de Granada, y la dirección donde la persona interesada podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición es “Secretaría General de la Universidad de Granada. Avda. del Hospicio s/n, Hospital Real, 18071, Granada”. De todo lo cual se informa en cumplimiento del artículo 5 de la ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal.

Resumen

Actualmente, los tratamientos farmacológicos para la depresión tienen una efectividad muy limitada por su latencia en el inicio de acción. En dicha franja temporal hay riesgo de conductas suicidas, por lo que sustancias de acción rápida, como la Ketamina, se han propuesto como una solución al problema. En un intento de encontrar otro fármaco de acción rápida, pero sin los efectos alucinógenos y anestésicos de la Ketamina, en la presente investigación se quiso comprobar la eficacia de la Ephedrine. Para ello se administró a ratas Wistar macho tres dosis diferentes de Ephedrine (2.5 mg/kg; 5 mg/kg y 10 mg/kg) y en dos grupos control se administró bien Ketamina (10 mg/kg) o salino. Posteriormente, 24 horas después de la administración, los animales pasaron por una prueba de Open-field para determinar posibles efectos motores de los fármacos y 48 horas después de la administración por una prueba de Natación Forzada para evaluar posibles efectos antidepresivos. Tras el análisis de los resultados, se observó que la Ephedrine no llegaba a producir un incremento de la actividad motora. Además, para las dosis de 10 mg/kg se constató una mejora de la sintomatología depresiva en comparación con los controles que recibieron salino. Destaca por tanto la importancia de seguir investigando con esta sustancia para verificar si efectivamente tiene efectos antidepresivos.

Palabras clave: Depresión, psicofarmacología, ratas macho, Ketamina.

Introducción

El trastorno depresivo mayor (TDM) es un problema que afecta a más de 300 millones de personas a nivel mundial. Uno de cada diez adultos sufre depresión y se estima que el 60% de estos individuos no reciben la ayuda necesaria (Pérez-Padilla et al., 2017). La depresión, se asocia con una serie de emociones como la tristeza profunda y con déficits comportamentales como la pérdida de interés. Por ello, se espera que en 2030 sea el principal factor discapacitante en términos de años totales perdidos, debido a la incapacidad de poder llevar una vida plenamente funcional (Saragoussi et al., 2018). En España se ha convertido en un problema de salud pública que conlleva una alta inversión en sanidad (Cardila Fernández et al., 2015). Además, el riesgo de suicidio es tres veces mayor en personas diagnosticadas con depresión (Baca & Aroca, 2014).

El principal objetivo de la terapia para la depresión es la rehabilitación funcional de la persona, para procurar que consiga estar en una situación mejor a la que tenía antes de la aparición del trastorno (Sánchez & Santos, 2019). La terapia farmacológica se suele emplear en depresiones moderadas y graves, la mayoría de los tratamientos se dirigen a los sistemas monoaminérgicos. Desde que se introdujeron los fármacos antidepresivos en la práctica clínica, la mejoría que se ha producido en su eficacia o en el tiempo de acción es muy limitada. Actualmente, los fármacos de primera elección son los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) (Sánchez & Santos, 2019). Estos tratamientos cuentan con una desventaja principal, tienen una latencia en el inicio de acción, de manera que su eficacia no puede ser evidente hasta pasadas unas 2-4 semanas desde el inicio. En esta franja de tiempo los pacientes permanecen con la sintomatología depresiva, y con un gran riesgo a llevar a cabo conductas suicidas.

Por ello mismo, se postula que fármacos de acción rápida, como es la Ketamina, podrían tener efectos antidepresivos (Mora et al., 2017). Esta sustancia actúa como antagonista del NMDA no competitivo y tiene efectos antidepresivos que son rápidos, fuertes y persistentes. La Ketamina produce varios acontecimientos, entre ellos está el bloqueo de los receptores NMDA localizados en las interneuronas inhibitorias corticales GABAérgicas; la desinhibición de las células piramidales corticales que conduce a un aumento del glutamato; la activación de los receptores AMPA presinápticos; el bloqueo de los NMDA-R

extrasinápticos excitotóxicos, así como la activación de la señalización intracelular sinaptogénica, incluyendo las vías mTORC1 y BDNF (Pérez-Esparza et al., 2020). Los efectos antidepresivos de la Ketamina suelen aparecer unas 4 horas después de la administración intravenosa con una dosis de 0.5 mg/kg y los síntomas suelen volver a los niveles iniciales en 1 o 2 semanas. Sin embargo, se ha comprobado que la Ketamina produce efectos disociativos y alucinógenos en humanos. Debido a estos efectos la Ketamina es usada como una droga alucinógena de tipo recreativo. Además, la Ketamina cuenta con efectos anestésicos, empleándose para usos veterinarios. Por otro lado, también puede provocar taquicardia, hipertensión y palpitaciones. De modo que esta sustancia aún no forma parte de la farmacopea española (Molero et al., 2018). Todo lo anterior por tanto nos muestra que si bien la Ketamina consigue eliminar la latencia terapéutica, sus efectos adversos impiden su uso clínico. Por ello, lo ideal sería encontrar un fármaco con la misma eficacia y rapidez pero sin los efectos alucinógenos y anestésicos asociados a la Ketamina.

A propósito de encontrar un fármaco con las características propuestas, en este experimento se pone a prueba una nueva sustancia, la Ephendidine, un compuesto legal y similar a la Ketamina. Cabe destacar la poca investigación que se ha hecho en torno a ella, encontrándose pocos estudios donde se utilice. En un experimento se comprobó que puede actuar sobre los receptores NMDA de manera selectiva y dependiente de voltaje (Kang et al., 2017), mostrando además actividad sobre los receptores de dopamina y noradrenalina. También se ha encontrado que produce efectos similares a la Ketamina, no habiendo encontrado ninguna intoxicación con la sustancia hasta la fecha (Wallach & Brandt, 2018).

Nuestro objetivo principal es verificar si esta sustancia tendrá mejores resultados y menos efectos disociativos y anestésicos que la Ketamina, obteniendo entonces un fármaco más adecuado. Para conseguirlo vamos a estudiar su eficacia desde un modelo animal, que pretenda simular parte de la sintomatología depresiva. En gran medida, la investigación en animales ha permitido descubrir maneras de sanar enfermedades y prolongar la vida humana (Rodríguez Yunta, 2007). Es necesario saber cómo un fármaco nuevo va a afectar a un sistema biológico completo antes de administrarlo en humanos. Otra de las ventajas es que se obtiene una respuesta mucho más rápida en animales, ya que se suelen usar modelos con un ciclo reproductivo corto, como es el del roedor (Guénet & Bonhomme, 2004). Entonces, se puede decir que estas pruebas en animales son formas de determinar la seguridad y eficacia en los humanos. En nuestro caso, se empleó la prueba conductual de “Natación Forzada” para evaluar nuestra variable dependiente (tiempo de inmovilización) y la prueba “Open-field”

para medir la conducta motora del roedor (segunda variable dependiente) y poder así determinar posibles efectos motores.

La Prueba de Natación Forzada (PNF), es una prueba utilizada en roedores para inferir la sintomatología depresiva (Can et al., 2011). La PNF consiste en introducir a cada rata en un cilindro con agua del que no pueden salir durante 5 minutos. En la primera fase, la rata nada vigorosamente hasta que acaba adaptando la posición de inmovilidad, que puede alternar con breves secuencias de natación para mantenerse a flote. Normalmente, se ha operativizado la conducta de movilidad como cualquier otro movimiento que no sea uno de los necesarios para equilibrar el cuerpo y para mantener la cabeza fuera del agua. Así como tampoco pueden contabilizarse como movilidad aquellos comportamientos resultado del impulso de otro movimiento anterior. Por lo tanto, se puede decir que el animal está quieto cuando lo único que se observa son los movimientos necesarios para sobrevivir.

Los antidepresivos disminuyen la duración de la inmovilidad en la PNF (Porsolt, 1981), por lo que se propuso el supuesto de que cualquier sustancia o tratamiento que actúe reduciendo la duración de la inmovilidad se reconoce como posible antidepresivo. De esta manera, se puede probar la eficacia antidepresiva de nuevos compuestos. Los síntomas conductuales de la Indefensión Aprendida (IA) en animales son muy similares en la depresión humana, por lo que se considera un buen modelo de inferencia.

En este sentido, la conducta de inmovilidad que hemos analizado anteriormente, es una manifestación conductual análoga a la pasividad en la depresión, esto es, la incapacidad de mantener el esfuerzo en la conducta de escape en situaciones percibidas como insalvables, siendo un índice de desesperación y depresión. Sin embargo, esta prueba puede ser contaminada por un efecto motor inespecífico en el que se incrementa de manera general la actividad locomotora del animal. Este efecto lo pueden llegar a tener algunos fármacos, consiguiendo una posible mejora terapéutica enmascarada por dicho efecto motor. Para comprobar que nuestra sustancia no cuenta con dicho efecto, es necesario el empleo de otra prueba que permita detectarlo. La prueba de Open-field o “campo abierto” consiste en evaluar la conducta motora del roedor en un ambiente abierto pero controlado (Cocoma-Ortega et al., 2017). Para llevar a cabo la prueba, se coloca al roedor en el centro de una caja y se observan sus comportamientos durante un tiempo determinado.

Como puede observarse, la aplicabilidad del presente estudio es crucial para poder desarrollar una posible patente. Esto se debe al problema existente y ya comentado sobre la

farmacología actual, se necesita una solución rápida y útil. Con la finalidad de encontrar una posible patente para el futuro desarrollo de ensayos clínicos en humanos, comprobaremos el uso potencial de esta nueva sustancia.

En resumen, las hipótesis de nuestro estudio serían las siguientes:

1. Se espera que en la prueba de Natación Forzada los animales a los que se les haya administrado la dosis de Ephenidine pasen menos tiempo quietos que los animales del grupo de Ketamina y los del grupo control.
2. Se espera que los animales del grupo de Ephenidine no muestren más actividad motora que los demás grupos en la prueba de Open-Field. Es decir, se espera que el efecto de la Ephenidine sea específico y no implique efectos motores generales.

Para llevarlas a cabo, seguimos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto motor en la prueba de Open-field en el grupo de Ephenidine (2'5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg), en comparación con el grupo control de salino y el grupo de 10mg/kg de Ketamina.
2. Estudiar el efecto motor con la dosis de 10 mg/kg de Ketamina en la prueba de Open-field en comparación con el grupo control de salino.
3. Medir el tiempo de inmovilización en la prueba de Natación Forzada y comparar el grupo de Ephenidine (2'5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) con el grupo control de salino y el grupo de 10 mg/kg de Ketamina.
4. Comparar en la prueba de Natación Forzada, el grupo de 10 mg/kg de Ketamina con el grupo salino.

Método

Animales

Los animales usados en este experimento ($N=73$) fueron ratas macho Wistar adultas (280-300 gramos). Se alojaron por parejas en jaulas, a unos 22-24 grados de temperatura y con comida y agua “ad libitum”. Se utilizaron tres grupos de animales, en concreto ratas, uno experimental, donde se observaron los efectos del nuevo fármaco; un grupo control, que servía para controlar posibles variables extrañas; y otro grupo control donde se utilizaba la

Ketamina, para así comparar sus efectos con el nuevo antidepresivo. Las ratas siguieron un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (7:00 a 19:00). Las cajas en las que se encontraban cumplían con la normativa de alojamiento. Además, el experimento contaba con el certificado del comité ético: 09/08/2019/138 (Ver Anexo I).

Aparatos

Las pruebas que se llevaron a cabo fueron la prueba de Open-field o “campo abierto” y la prueba de Natación Forzada.

1. Open-field: para realizar esta prueba fue necesario una caja cuadrada y negra (60x60x60), de material plástico y resistente, para que así sea fácil de limpiar. La caja tenía que tener 4 muros lo suficientemente altos y gruesos para evitar que los animales salieran. En el fondo de la caja había una cuadrícula roja a modo de guía para analizar los movimientos de las ratas. También fueron necesarios productos de limpieza (alcohol 70°), un cronómetro y una cámara de vídeo sujeta con un trípode para poder grabar. El programa que se usó para el análisis de esta prueba fue el ToxTrack animal tracking software.
2. Natación Forzada: para realizar esta prueba se necesitaron 7 piscinas cilíndricas rellenas de 10 litros de agua, cada una con una altura de 35 cm, cada piscina estaba separada entre sí por una plancha de metacrilato negra, que imposibilitaba la visión de los animales adyacentes. Se necesitaron además utensilios para sacar al roedor de la piscina, toallas para secar y cronómetro. La temperatura del agua fue de 22-24 grados centígrados. La prueba se realizaba en intervalos de 5 minutos. Para registrar la conducta de los animales se usó una cámara sujeta con un trípode, posibilitando así el visionado y el posterior análisis de la conducta de los animales.

Análisis estadísticos

A la hora de analizar los datos recogidos, fue necesario utilizar el programa estadístico Jamovi para poder realizar las pruebas pertinentes.

El análisis fue realizado siguiendo los objetivos principales del estudio.

1. Para comprobar si se había cumplido nuestro primer objetivo, primero se realizaron los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas. Para una de las variables fue necesario realizar una prueba no paramétrica, en concreto un ANOVA de un factor

no paramétrico (Kruskal-Wallis) y una comparación DSCF Pairwise. Posteriormente se llevó a cabo una prueba ANOVA de un factor y los contrastes Post Hoc necesarios.

2. Para comprobar los objetivos 2, 3 y 4, se realizaron los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas para así realizar ANOVAs de un factor.

Fármacos

Los fármacos usados en este experimento fueron los siguientes:

1. Ephedrine: Ep2.5; Ep5 y Ep10, estos grupos indican la dosis en miligramos que se les administraba de manera subcutánea a los animales. La procedencia de la sustancia era la Universidad de Cagliari.
2. Ketamina: La dosis administrada fue de 10 mg/kg a modo de control. Esta sustancia procedía de Sigma Aldrich.
3. Solución salina (10 mg/kg) a modo de control.

Para preparar las dosis de Ephedrine, primero se cogían 100 mg, luego se colocaba en un vial con una capacidad de 15 ml. Posteriormente se pipeteaba 5 ml de Tween 80 en un cilindro y se llevaba a 100 ml agregando 95 ml de agua destilada, se agitaba suavemente para formar una suspensión. Se añadía 10 ml de esta suspensión al vial que contenía Ephedrine y se agitaba suavemente. Era importante tener en cuenta que la Ephedrine es una sustancia complicada de disolver.

En cuanto a la dosis de Ketamina, había que diluir la Ketamina inyectable (100 mg/ml) en suero fisiológico a 1:10 hasta llegar a 10 mg/kg.

Procedimiento

A las 24 horas de administración subcutánea del fármaco, los animales pasaban por la prueba del Open-field de manera contrabalanceda. Cinco minutos antes de acceder a la caja en donde se realizaba el Open-field, los animales estuvieron habituándose a la sala donde se realizaba. Transcurridos esos cinco minutos, el animal era introducido en la caja de la prueba, situándose en el centro de la misma. El investigador abandonaba la sala y pasados los cinco minutos, el animal volvía a su jaula hogar, limpiándose la caja de prueba con alcohol al 70% para eliminar los restos que hubiera así como posibles olores. Cada sesión se grababa y posteriormente se hacía el visionado y análisis de los datos con el programa ToxTrack.

Una vez pasadas las 48 horas de administración del fármaco, de manera consecutiva y en la misma sala que estuvieron el día anterior, los animales comenzaban la prueba de Natación Forzada de manera contrabalanceada. El animal se introducía en la piscina de agua durante 5 minutos. El investigador permanecía en la sala, y cuando los 5 minutos pasaban, se sacaba al animal, se secaba y se le colocaba de vuelta en la jaula. Cada sesión era grabada y visionada posteriormente para realizar el análisis.

Diseño

Las variables dependientes de nuestro estudio fueron:

1. La conducta motora medida a través de velocidad (mm/s), aceleración (mm/s²), distancia recorrida en metros y ratio de exploración operacionalizado como el tiempo en minutos que pasa el animal a dos patas u olisqueando/lamiendo la zona.
2. La inmovilización de los animales, medida en segundos.

Las variables independientes fueron:

3. El fármaco y la dosis administrada.

Resultados

Estudio del efecto motor en la prueba de Open-field en el grupo de Ephenedine (2'5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg), comparando con el grupo salino y Ketamina (10 mg/kg).

Tras realizar los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas (Ver Tablas 1 y 2 en Anexos II y III) para poder realizar un ANOVA de un factor, se pasó a realizar el análisis, teniendo en cuenta que “Ratio de exploración” no cumplía los supuestos de Normalidad y Homogeneidad.

A raíz de hacer un análisis de la varianza (ANOVA) se pudo comprobar que aparentemente no había efectos motores en la prueba Open-field. Los animales del grupo experimental no se movían más, ni más rápido que los demás grupos. No se encontraron diferencias significativas en velocidad ($F_{4,55}=1.746$; $p=0.153$) (Ver Figura 1), ni en aceleración ($F_{4,55}=1.585$; $p=0.191$) (Ver Figura 2), ni tampoco en distancia recorrida en metros ($F_{4,55}=1.186$; $p=0.327$) (Ver Figura 3).

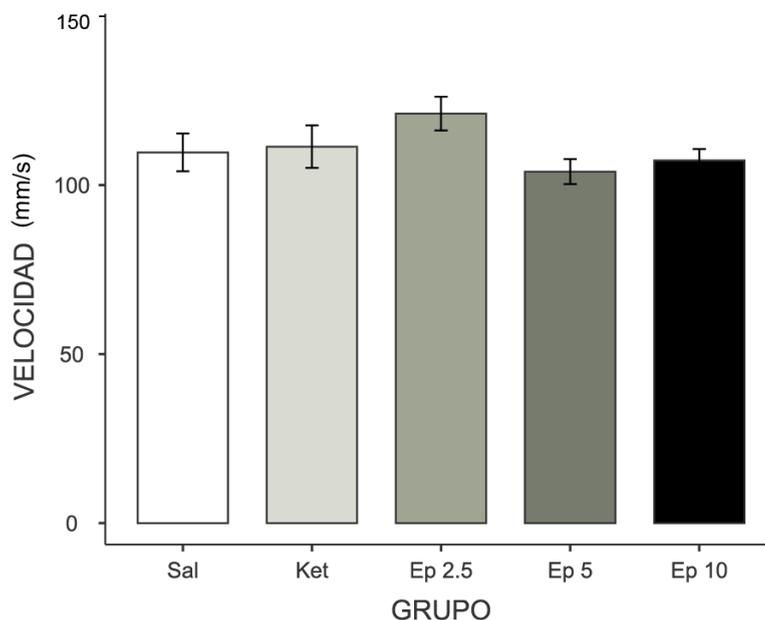
Sin embargo, sí que se encontraron diferencias en el ratio de exploración en función del grupo a través de hacer un ANOVA no paramétrico ($\chi^2= 22.5$; $df=4$; $p<.001$) (Ver Figura

4). Para comprobar qué grupos difieren en esta variable, se hizo una comparación “DSCF Pairwise”.

Esta prueba indicó que el grupo de Ephedrine en su dosis a 5 mg/kg presentaba un ratio de exploración significativamente menor que los grupos de Ephedrine a dosis de 10 mg/kg ($p<0,01$) y 2,5 mg/kg ($p<,001$). También, el grupo de Ephedrine en su dosis a 5 mg/kg presentaba un ratio de exploración significativamente menor que el grupo salino ($p<0,05$).

Figura 1

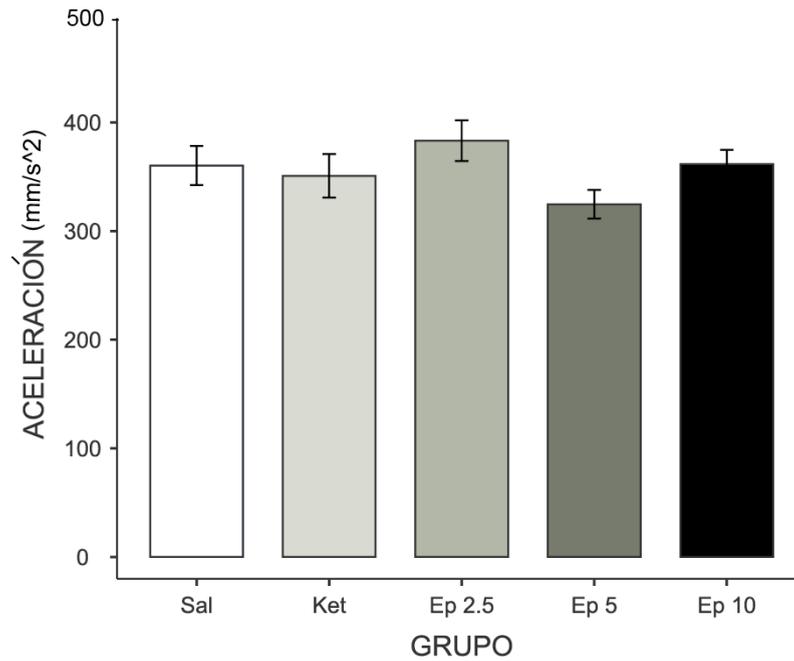
Representación gráfica de la velocidad medida en milímetros/segundos según el grupo.



Nota: Las abreviaturas que aparecen en la gráfica se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg; Ep2.5: Ephedrine 2.5 mg/kg; Ep 5: Ephedrine 5 mg/kg; Ep 10 Ephedrine 10 mg/kg. No se observan diferencias significativas.

Figura 2

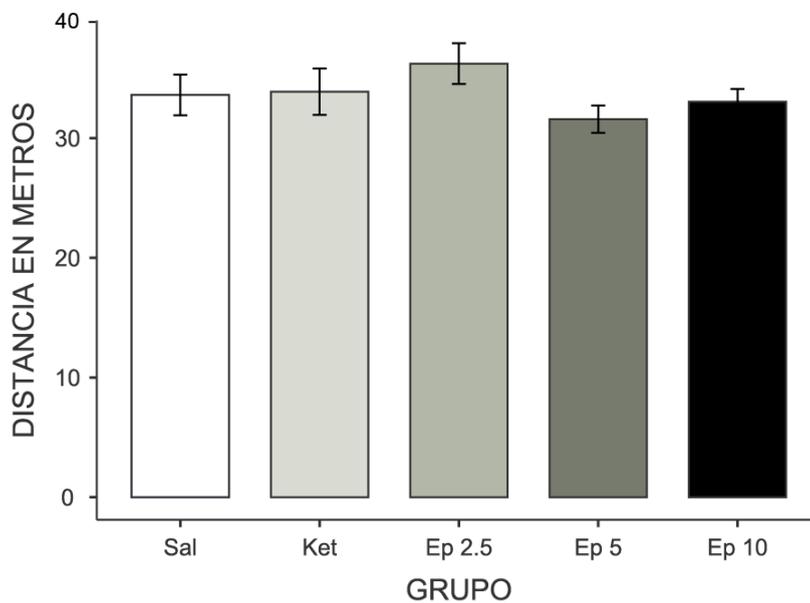
Representación gráfica de la aceleración medida en milímetros/segundos² según el grupo al que pertenecían.



Nota: Las abreviaturas que aparecen en la gráfica se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg; Ep2.5: Ephenidine 2.5 mg/kg; Ep 5: Ephenidine 5 mg/kg; Ep 10 Ephenidine 10 mg/kg. No se observan diferencias significativas.

Figura 3

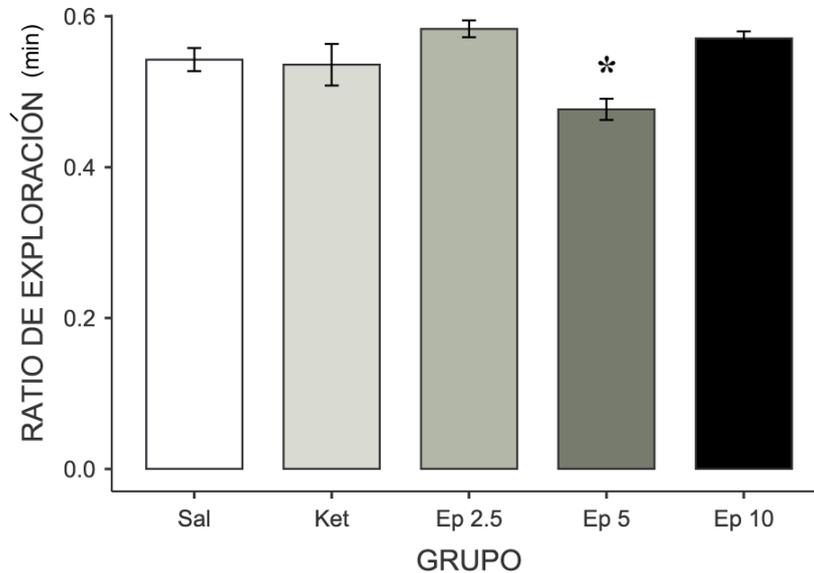
Representación gráfica de la distancia en metros según el grupo al que pertenecían.



Nota: Las abreviaturas que aparecen en la gráfica se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg; Ep2.5: Ephenidine 2.5 mg/kg; Ep 5: Ephenidine 5 mg/kg; Ep 10 Ephenidine 10 mg/kg. No se observan diferencias significativas.

Figura 4

Representación gráfica del ratio de exploración en minutos según el grupo al que pertenecían.



Nota: Las abreviaturas que aparecen en la gráfica se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg; Ep2.5: Ephedrine 2.5 mg/kg; Ep 5: Ephedrine 5 mg/kg; Ep 10 Ephedrine 10 mg/kg. Se observa cómo el grupo de Ephedrine a dosis 5 mg/kg obtiene una puntuación significativamente menor que los grupos de salino, Ephedrine 2.5 mg/kg y Ephedrine 5 mg/kg.

Estudio del efecto motor con la dosis de 10 mg/kg de Ketamina en comparación con el grupo control de salino.

Se cumple la igualdad de varianzas entre los grupos, ya que la prueba de Levene no es significativa (Ver Tabla 3 en Anexo IV) y también se cumple el test de Normalidad (Ver Tabla 4 en Anexo V).

Por ello realizamos el ANOVA de un factor. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables (Ver tabla 5).

Tabla 5

ANOVA de un factor realizado para observar las posibles diferencias en la prueba de Open-field entre el grupo de Ketamina y salino según las distintas variables dependientes.

	F	df1	df2	p
VELOCIDAD	0.0410	1	21.7	0.841
ACELERACIÓN	0.1227	1	21.7	0.729
DISTANCIA EN METROS	0.0111	1	21.7	0.917
RATIO DE EXPLORACIÓN	0.0448	1	17.2	0.835

Nota: En la tabla se observan las distintas puntuaciones según los niveles de la variable dependiente “conducta motora”. No se observan diferencias significativas.

Nivel de inmovilización en la prueba de Natación Forzada, comparando el grupo de Ephedrine (2’5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg) con el grupo control de salino y el grupo de 10 mg/kg de Ketamina.

Una vez realizados los supuestos, éstos no resultaron significativos (Supuesto de normalidad $W= 0.976$; $p=0.184$; Supuesto de Levene’s $F_{4,67}= 1.57$; $p=0.193$) por lo que se cumplía la igualdad de varianzas y la normalidad de puntuaciones. Por ello, se realizó un ANOVA de un factor. Al comparar los grupos en función del tiempo, se obtuvieron diferencias significativas ($F_{4,31.2}=6.37$; $p<.001$).

Para estudiar entre qué grupos hay diferencias significativas se realizaron los análisis Post-Hoc (Ver tabla 6). A través de estos análisis se puede observar que había diferencias significativas entre el grupo control de Salino con el grupo experimental de Ephedrine, en concreto con el grupo de 10 mg/kg ($p=0.002$) (Ver Figura 5).

Tabla 6

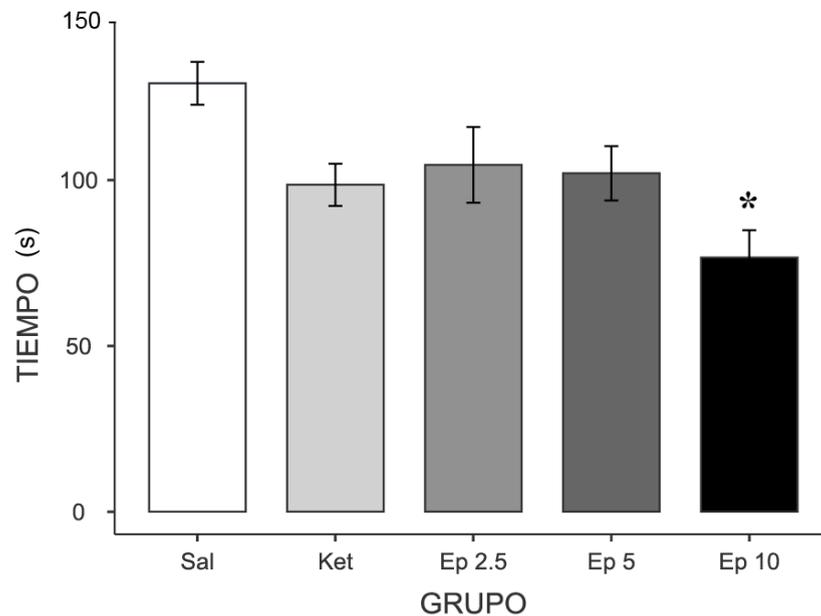
Análisis Post-Hoc realizados sobre el tiempo de inmovilización medido en segundos, comparando todos los grupos.

		Sal	Ket	Ep 2.5	Ep 5	Ep 10
Sal	Mean difference	—	30.6	24.58	27.12	52.5
	p-value	—	0.126	0.346	0.145	0.002
Ket	Mean difference		—	-6.01	-3.47	21.9
	p-value		—	0.990	0.998	0.426
Ep 2.5	Mean difference			—	2.54	27.9
	p-value			—	0.999	0.225
Ep 5	Mean difference				—	25.4
	p-value				—	0.196
Ep 10	Mean difference					—
	p-value					—

Nota: Las abreviaturas que aparecen en la tabla se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg; Ep2.5: Ephedrine 2.5 mg/kg; Ep 5: Ephedrine 5 mg/kg; Ep 10 Ephedrine 10 mg/kg. Se puede observar cómo hay diferencias significativas entre el grupo de salino y el grupo de Ephedrine 10 mg/kg.

Figura 5

Representación gráfica del tiempo de inmovilización (segundos), comparación según el grupo al que pertenecían.



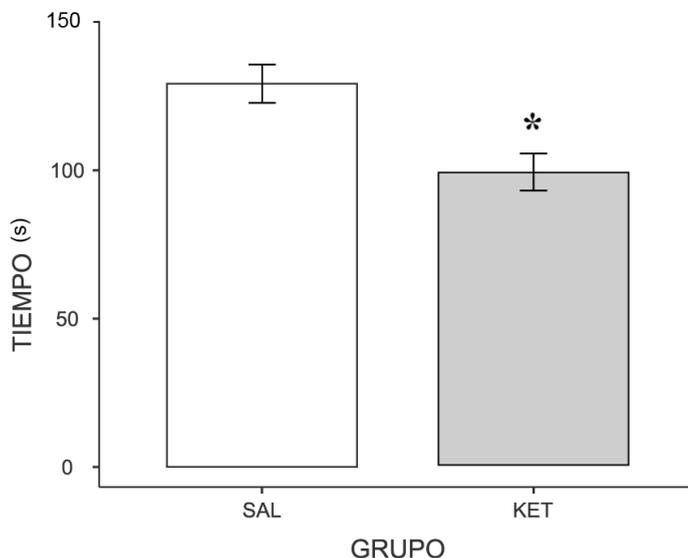
Nota: Las abreviaturas que aparecen en la gráfica se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg; Ep2.5: Ephenidine 2.5 mg/kg; Ep 5: Ephenidine 5 mg/kg; Ep 10 Ephenidine 10 mg/kg. Se puede observar cómo a medida que la dosis de Ephenidine aumentaba, el tiempo de inmovilización iba descendiendo. Se observan diferencias significativas entre el grupo de salino y el grupo de Ephenidine con 10 mg/kg, siendo el grupo control de salino el que pasa mayor cantidad de tiempo inmovilizado.

Comparación del grupo de 10 mg/kg de Ketamina con salino en el nivel de inmovilización.

Una vez realizados los supuestos de homogeneidad (Levene's) ($F_{1,24}= 7.30e-4$; $p=0.979$) y de Normalidad ($W=0.957$; $p=0.340$) se realizó un ANOVA en el que se comparaba el grupo de Ketamina con el grupo control. Los resultados (Ver Figura 6) indicaron que había diferencias significativas ($F_{1,23,8}=11.4$; $p=0.003$).

Figura 6

Representación gráfica del tiempo de inmovilización medido en segundos, comparación del grupo de salino con el grupo de Ketamina.



Nota: Las abreviaturas que aparecen en la gráfica se refieren a los grupos a los que pertenecían los animales; siendo Sal: grupo salino 10 mg/kg; Ket: Ketamina 10 mg/kg. Se observa cómo el grupo control de salino pasa mayor cantidad de tiempo inmovilizados que el grupo control de Ketamina.

Discusión

En el presente estudio se propuso analizar conductualmente los efectos de la sustancia Ephendine, como candidata para el tratamiento de la depresión. La importancia de encontrar un fármaco de acción rápida se debía, entre otras cosas, a la alta tasa de suicidio que encontramos hoy en día (OMS, 2021). Es importante recalcar que en este experimento hemos intentado asemejarnos a través de un modelo animal a lo que podría ser la sintomatología depresiva en humanos, partiendo de la premisa de que no se puede hablar de la existencia de depresión en animales, y que por lo tanto son inferencias lo que llevamos a cabo.

Las hipótesis planteadas sobre el efecto en la inmovilización y en la actividad motora se han cumplido. Esperábamos no encontrar diferencias en la actividad motora, y se observó que no había efecto motor en la prueba de Open-field producido por Ephendine en comparación con el grupo salino y el grupo de Ketamina. Esto nos indica que el resultado de la nueva sustancia es específico y no hay indicios de hiperactividad. En cuanto a la Ketamina, tampoco se encontró efecto motor producido por la misma en comparación con el grupo de

salino. En estudios anteriores donde utilizó Ketamina, se observaron efectos motores a partir de dosis de 50 mg/kg (Hetzler & Swain Wautlet, 1985).

Por lo tanto, el hecho de no encontrar ningún efecto motor aumentó el interés que teníamos en la sustancia. Lo primero que queríamos saber es si podía producir o no un efecto motor de hiperactividad en los animales, de haber existido este incremento, a las 24 horas hubiera sido muy intenso ya que hay más concentración de sustancia en el organismo. Es en ese momento (a las 24 horas) cuando se realizaba la prueba de Open-field. Observamos que no se encontraba dicho efecto motor por lo que podíamos esperar que a las 48 horas, cuando se pasaba la prueba de Natación Forzada, no hubiese efecto motor. De esta manera podríamos inferir que de haber efecto en la prueba de Natación Forzada este sería específico del fármaco.

A la hora de probar las hipótesis de inmovilización en la PNF, esperábamos que los animales del grupo experimental estuvieran menos tiempo parados en comparación con los demás grupos, se observó que con la dosis de 10 mg/kg de Ephenidine los animales permanecían menos tiempo quietos, siendo con esta dosis con la que más efecto se encontró. También se encontraron diferencias entre el grupo de Ketamina y salino en la PNF, hecho acorde con la literatura previa (Yang et al., 2013). Sin embargo, en contra de lo que hipotetizamos, el efecto de la Ephenidine sobre la inmovilización, no llega a ser significativamente menor que el observado con la Ketamina.

No hay investigación previa que relate el uso de la Ephenidine como fármaco para ayudar a la sintomatología depresiva. La poca investigación al respecto muestra que es una sustancia que se ha llegado a usar para reducir efectos ansiógenos, así como para usos recreativos, pero de manera no controlada (Eiden et al., 2018). Además, se ha encontrado que la dosis umbral es de 8 mg/kg, presentando el máximo efecto con 128 mg/kg (Wallach & Brandt, 2018). Es evidente por lo tanto la necesidad de realizar más estudios con esta sustancia, como el aquí presente, para así determinar las dosis exactas que pueden llegar a producir un cambio favorable en las conductas problemáticas del paciente.

Cabe mencionar el oportuno debate que puede crearse en cuanto a la función de la prueba de Natación Forzada en nuestro estudio. Para empezar, el agua de las piscinas estaba a una temperatura considerada fría para los animales, además no se cambiaba entre animales, por lo que el olor y algunos excrementos permanecían hasta el final de la sesión. A raíz de esto, se puede plantear si el fármaco ha producido efectos ansiolíticos o antidepresivos. Sin

embargo, como bien sabemos, los patrones conductuales de los trastornos suelen ser comunes para muchos de ellos. Esto deriva en una gran comorbilidad, sobre todo en ansiedad y depresión (Hranov, 2007), provocando muchas veces dificultades para diferenciarlos. A pesar de ello, se puede realizar el experimento protocolizando las condiciones ambientales durante la prueba para que sean los síntomas de desesperación característicos los que predominen, e intentando eliminar factores estresantes como los ya comentados.

Sobre las limitaciones, la duración empleada para el test de Natación Forzada se puede plantear alargar de 5 a 15 minutos, de esta manera creemos que se conseguiría aumentar la sensibilidad del mismo. Se prevé que los resultados en este tiempo sean aún más notorios. En cuanto a las alucinaciones, es posible que la dosis administrada haya podido estar causando alucinaciones en la muestra elegida, esto se podría deber a las diferencias significativas observadas en la prueba Open field, en concreto en el ratio de exploración. Este dato sería importante estudiarlo en futuras líneas de investigación, ya que habría que determinar la dosis en la que podría haber algún patrón alucinógeno. En estudios anteriores con sustancias psicoactivas (Noworyta-Sokołowska et al., 2018) encuentran que el ratio de exploración es menor tras la administración de la sustancia, efecto que encontramos en nuestro experimento con la dosis de 5 mg/kg de Ephedrine.

En futuros experimentos, se podría contar con pruebas específicas para medir este tipo de comportamiento, no obstante como ya se ha planteado, al contar con el inconveniente de la falta de conducta verbal por parte de los roedores, es difícil operacionalizar los posibles comportamientos disociativos y/o alucinógenos. Estudios como el realizado sirven de screening para futuras líneas en las que se estudiarán más a fondo las limitaciones, así como el uso de nuevas pruebas con las que medir los posibles efectos antidepresivos de esta nueva sustancia.

Referencias bibliográficas

- Baca, E., & Aroca, F. (2014). Factores de riesgo de la conducta suicida asociados a trastornos depresivos y ansiedad. *Salud Mental*, 37(5), 373-380.
- Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2011). The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments*, 58, 36-38.
<https://doi.org/10.3791/3638>
- Cardila Fernández, F., Martos Martínez, Á., Barragán Martín, A. B., Pérez-Fuentes, M. D. C., Molero Jurado, M. D. M., & Gázquez Linares, J. J. (2015). Prevalencia de la depresión en España: Análisis de los últimos 15 años. *European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education*, 5(2), 267.
<https://doi.org/10.30552/ejihpe.v5i2.118>
- Cocoma-Ortega, J., Barreto-Flores, A., Limón-Pérez-De-León, I., Bautista-López, V., & ayala-raggi, S. (2017). *Localización de roedores en pruebas de campo abierto*, 38, (122).
- Eiden, C., Leone-Burgos, S., Serre, A., Carton, L., Gerardin, M., Le Boisselier & French Network of Addictovigilance Centers. (2018). Ephenedine, diphenidine, and methoxphenidine complications reported to the French Addictovigilance Network. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 32(6), 654-662.
<https://doi.org/10.1111/fcp.12395>
- Guénet, J.-L., & Bonhomme, F. (2004). Origin of the Laboratory Mouse and Related Subspecies. *The Laboratory Mouse*, 3-13.
- Hetzler, B. E., & Swain Wautlet, B. (1985). Ketamine-induced locomotion in rats in an open-field. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(4), 653-655.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(85\)90291-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(85)90291-6)
- Hranov, L. G. (2007). Comorbid anxiety and depression: Illumination of a controversy. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, 11(3), 171-189.
<https://doi.org/10.1080/13651500601127180>
- Kang, H., Park, P., Bortolotto, Z. A., Brandt, S. D., Colestock, T., Wallach, J., Collingridge, G. L., & Lodge, D. (2017). Ephenedine: A new psychoactive agent with ketamine-like

NMDA receptor antagonist properties. *Neuropharmacology*, *112*, 144-149.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.004>

Molero, P., Ramos-Quiroga, J. A., Martín-Santos, R., Calvo-Sánchez, E., Gutiérrez-Rojas, L., & Meana, J. J. (2018). Antidepressant Efficacy and Tolerability of Ketamine and Esketamine: A Critical Review. *CNS Drugs*, *32*(5), 411-420.
<https://doi.org/10.1007/s40263-018-0519-3>

Mora, R., López, S., Villar, M., Palmer, R., & Rubio, B. (2017). Ketamina en el tratamiento de la ideación suicida asociada a depresión resistente. A propósito de un caso. *Psiquiatría Biológica*, *24*(1), 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.psiq.2016.11.002>

Noworyta-Sokołowska, K., Górska, A. M., & Gołombiowska, K. (2018). The effect of repeated-intermittent exposure to 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) during adolescence on learning and memory in adult rats. *Pharmacological Reports*, *70*(5), 890-895.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.04.001>

Organización Mundial de la Salud. (OMS). (2021). Suicidio. Recuperado 31 de enero de 2021, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/suicide>.

Pérez-Esparza, R., Kobayashi-Romero, L. F., García Mendoza, A. M., Lamas-Aguilar, R. M., Vargas Sosa, M., Encarnación-Martínez, M., González-Manríquez, L. A., Eternod-Rodríguez, S. A., Maltos-Gómez, F., Vargas-Valencia, K. M., & Fonseca Pérez-Amador, A. (2020). Ketamina, un nuevo agente terapéutico para la depresión. *Revista de la Facultad de Medicina*, *63*(1), 6-13.
<https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.1.02>

Pérez-Padilla, E. A., Cervantes-Ramírez, V. M., Hijuelos-García, N. A., Pineda-Cortes, J. C., & Salgado-Burgos, H. (2017). Prevalencia, causas y tratamiento de la depresión mayor. *Revista biomédica*, *28*(2). <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i2.557>

Porsolt, R. D. (1981). Behavioral despair. En S.K. Enna, J.B. Malick & E. Richelson (Eds.), *Antidepressants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives*.

Rodríguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P. L., & Andersson, M. (2018). ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution*, *9*(3), 460-464.

<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12874>

Rodríguez Yunta, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioethica*, 13(1).

<https://doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100004>

Sánchez, V. P., & Santos, P. M. (2019). Protocolo diagnóstico y terapéutico de la depresión. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(86), 5070-5074. <https://doi.org/10.1016/j.med.2019.09.015>

Saragoussi, D., Christensen, M. C., Hammer-Helmich, L., Rive, B., Touya, M., & Haro, J. M. (2018). Long-term follow-up on health-related quality of life in major depressive disorder: A 2-year European cohort study. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 1339-1350. <https://doi.org/10.2147/NDT.S159276>

Wallach, J., & Brandt, S. D. (2018). 1,2-Diarylethylamine- and Ketamine-Based New Psychoactive Substances. En H. H. Maurer & S. D. Brandt (Eds.), *New Psychoactive Substances*, 252, 305-352. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2018_148

Yang, C., Hu, Y.-M., Zhou, Z.-Q., Zhang, G.-F., & Yang, J.-J. (2013). Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 118(1), 3-8. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.724118>

Anexos

Anexo I. Aprobación del comité de ética.



Aprobación del comité de ética

Si el TFG propuesto requiere la recogida de datos por parte del estudiante, el responsable de Tutorización declara mediante el presente anexo que cuenta con los permisos necesarios (del centro y del comité de ética pertinente) para realizar el estudio.

Firma del responsable de Tutorización

Fecha 10/06/2022



Anexo II. Test de Homogeneidad de Varianzas realizado para poder llevar a cabo el Análisis de la Varianza en los datos de la prueba Open-field en los que se comparaba el grupo Ephedrine con el grupo salino y Ketamina.

Tabla 1

Test de Homogeneidad de Varianzas (Levene's).

	F	df1	df2	p
VELOCIDAD	1.066	4	55	0.382
ACELERACIÓN	0.711	4	55	0.588
DISTANCIA EN METROS	1.296	4	55	0.283
RATIO DE EXPLORACIÓN	3.065	4	55	0.024

Nota: La tabla muestra el Test de Homogeneidad de Varianzas realizado para los análisis de la prueba Open-field. Siendo un valor de “p” significativo (<.05) indicativo de que se está incumpliendo el principio. Se muestran las distintas variables medidas (velocidad, aceleración, distancia en metros y ratio de exploración). Como se puede comprobar, el ratio de exploración incumple este test por lo que se realizó una prueba no paramétrica.

Anexo III. Test de Normalidad realizado para poder llevar a cabo el Análisis de la Varianza en los datos de la prueba Open-field en los que se comparaba el grupo Ephenidine con el grupo salino y Ketamina.

Tabla 2

Test de Normalidad (Shapiro-Wilk).

	W	p
VELOCIDAD	0.981	0.453
ACELERACIÓN	0.977	0.318
DISTANCIA EN METROS	0.985	0.674
RATIO DE EXPLORACIÓN	0.928	0.002

Nota: La tabla muestra el Test de Normalidad realizado para la prueba Open-field. Siendo un valor de “p” significativo (<.05) indicativo de que se está incumpliendo el principio. Se muestran las distintas variables medidas (velocidad, aceleración, distancia en metros y ratio de exploración). Como se puede comprobar, el ratio de exploración incumple este test por lo que se realizó una prueba no paramétrica.

Anexo IV. Test de Homogeneidad de Varianzas realizado para poder llevar a cabo el Análisis de la Varianza en los datos de la prueba Open-field en los que se comparaba el grupo salino y el grupo Ketamina.

Tabla 3

Test de Homogeneidad de Varianzas (Levene's)

	F	df1	df2	p
VELOCIDAD	0.144	1	22	0.708
ACELERACIÓN	0.272	1	22	0.607
DISTANCIA EN METROS	0.140	1	22	0.711
RATIO DE EXPLORACIÓN	2.853	1	22	0.105

Nota: Un valor bajo de “p”(<.05) supone un incumplimiento del supuesto. Se muestran las distintas variables medidas (velocidad, aceleración, distancia en metros y ratio de exploración).

Anexo V. Test de Normalidad realizado para poder llevar a cabo el Análisis de la Varianza en los datos de la prueba Open-field en los que se comparaba el grupo salino y el grupo Ketamina.

Tabla 4

Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)

	W	p
VELOCIDAD	0.977	0.829
ACELERACIÓN	0.977	0.833
DISTANCIA EN METROS	0.980	0.889
RATIO DE EXPLORACIÓN	0.935	0.125

Nota: Un valor bajo de “p” (<.05) supone un incumplimiento del supuesto. Se muestran las distintas variables medidas (velocidad, aceleración, distancia en metros y ratio de exploración).