



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**“PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO DE AFININA”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
**P R E S E N T A:**  
**MARÍA DEL CARMEN JUÁREZ CASTILLO**



Director: Dra. Myrna Déciga Campos

Asesor: M en F. Leticia Huerta Flores

México, D.F.

2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTONOMA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICA  
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES**

**ESTIMADOS MAESTROS:**

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

**JUÁREZ CASTILLO MARÍA DEL CARMEN**

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Perfil Neurofarmacológico de Afinina**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	DR. BENITO REYES TREJO
VOCAL*	DRA. MYRNA DÉCIGA CAMPOS
SECRETARIO	M. en F. LETICIA HUERTA FLORES
SUPLENTE	M. en C. ARTURO E. CANO FLORES
SUPLENTE	M. en C. JUANA ROSADO PÉREZ

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a, 20 de noviembre de 2009

**DRA. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**  
JEFA DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados  
c.c.p. Interesado

Este trabajo se desarrolló bajo la asesoría de la

**Dra. Myrna Déciga Campos,**

Profesor Titular C de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

El presente trabajo fue apoyado por la **Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN** en el proyecto *“Evaluación farmacológica de sustancias nuevas para el tratamiento del dolor”* clave SIP: **20091164 y 20100483**. Se realizó bajo convenio (IPN-INER) en la Unidad de Farmacología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Ismael Cosío Villegas”.

Especialmente para usted **mamá**, por que sin su ayuda este proyecto no se habría realizado. Gracias por todo su amor y su paciencia, su esfuerzo y la educación que me ha dado. Ha sido a lo largo de mi carrera el principal y mayor apoyo que he recibido. Simplemente, mi agradecimiento por usted es tan grande que jamás podré pagar todos los sacrificios y todos los desvelos, que ha pasado para brindarme un mejor futuro y hacer de mi una mejor persona. Te amo mamá.

Para **papá** que ha creído en mí y me ha apoyado. Se ha preocupado por mi educación y me ha enseñado a ser una persona dedicada y ha luchar por lo que quiero. Gracias por su amor.

Para mis hermanos: **Dulce, Raúl, Liberio y Diana** (y **Alexia**) a quienes amo con toda el alma y representan un parte esencial en mi vida. Pero de forma muy especial a mi hermano **Marco Antonio** quien en momentos difíciles y sin que yo se lo pida me ha ayudado y ha creído en mi, gracias por todo tu apoyo y tu cariño.

A mis amigos: **Adrián, Blanca, Gaby, Ruth, Jazmín, Guadalupe y Gloria**, con quienes compartí mi forma de ser y de pensar y han estado conmigo en momentos difíciles y de alegría, enseñándome el valor de la amistad. Especialmente, a **Antonio** quien ha estado a mi lado en todo momento y me ha regalado el mayor de los tesoros, su amor y con quien he compartido mis metas profesionales y mis proyectos de vida. Quien además ha sido un estímulo constante para superarme. Por que en los momentos de angustia y desesperación ha sido la alegría que ha sostenido a mi vida. Te amo muchísimo.

*Gracias Jesús por permitirme lograr uno de mis sueños*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Dra. María Yolanda Ríos** del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por haber proporcionado la afinina.

Se le agradece al **M.V.Z Alberto Pizaña Venegas** por su asesoría técnica.

Agradezco a mi Facultad por que en ella adquirí mi formación académica, a mis profesores quienes me dieron los conocimientos necesarios para terminar mi carrera y al INER por darme la oportunidad de trabajar mi proyecto.

A la **Dra. Myrna Déciga Campos** por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias para el desarrollo de este proyecto, gracias por su paciencia, enseñanzas y el apoyo que me brindó en el transcurso de este tiempo.

A la **M en F. Leticia Huerta Flores** por brindarme su amistad y apoyarme en todo lo posible en mi trabajo.

Al **Dr. Benito Reyes**, al **M. en C. Arturo Cano** y la **M. en C. Juana Rosado**, quienes aportaron sus comentarios tan acertados. Gracias por compartir conmigo su conocimiento y dedicar su tiempo al mejoramiento de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE GRÁFICAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Importancia del uso tradicional de plantas medicinales	3
2.2. Perfil neurofarmacológico	7
2.2.1. Pruebas de un perfil neurofarmacológico	9
2.2.1.1. Efecto sobre la conducta exploratoria	9
2.2.1.2. Evaluación de la actividad ansiolítica	10
2.2.1.2.1. Sistemas neurotransmisores en la ansiedad	10
2.2.1.2.2. Modelos animales de ansiedad	13
2.2.1.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica	15
2.2.1.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva	16
2.2.1.4.1. Prueba de la formalina	17
2.2.1.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva	19
2.3. Antecedentes de <i>Heliopsis longipes</i>	20
2.4. Generalidades de las N-isobutilamidas	21
2.5. Aspectos farmacológicos del extracto de <i>H. longipes</i> y la afinina	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV. HIPÓTESIS	30
V. OBJETIVOS	30
5.1. Objetivo general	30

5.2. Objetivos específicos	30
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
6.1. Aislamiento y caracterización de afinina	31
6.2. Material biológico	32
6.3. Fármacos y reactivos	32
6.4. Determinación de las dosis de afinina	33
6.5. Evaluaciones neurofarmacológicas	34
6.5.1. Evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria	34
6.5.1.1. Modelo de campo abierto	34
6.5.1.2. Modelo del tablero perforado	34
6.5.2. Evaluación de la actividad ansiolítica	35
6.5.2.1. Modelo del cilindro de exploración	35
6.5.2.2. Modelo del laberinto en cruz elevado	36
6.5.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica	36
6.5.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva en la prueba de la formalina	37
6.5.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva	38
6.5.6. Análisis estadístico	42
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
7.1. Evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria	43
7.1.1. Modelo de campo abierto	43
7.1.2. Modelo del tablero perforado	44
7.2. Evaluación de la actividad ansiolítica	45
7.2.1. Modelo del cilindro de exploración	45
7.2.2. Modelo del laberinto en cruz elevado	46
7.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica	47
7.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva	49
7.4.1. Conducta nociceptiva inducida por formalina	49
7.4.2. Efecto de la afinina en la prueba de la formalina	50
7.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva	52
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>



8.1. Evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria	53
8.2. Evaluación de la actividad ansiolítica	54
8.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica	55
8.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva	56
8.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva	57
IX. CONCLUSIONES	59
X. PERSPECTIVAS	60
XI. BIBLIOGRAFÍA	61

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

	Página
<b>Diagrama 1.</b> Procedimiento general para determinar el efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica y la sedante-hipnótica en ratones	39
<b>Diagrama 2.</b> Procedimiento general para la evaluación de la actividad antinociceptiva en la prueba de la formalina en ratas	40
<b>Diagrama 3.</b> Procedimiento general para la evaluación de la actividad anticonvulsiva en ratones	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Receptor GABA <sub>A</sub> y sus sitios de unión	12
<b>Figura 2.</b> <i>H. longipes</i> (A) Parte aérea y flores (B) raíces	20
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la afinina (N-isobutil-deca-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -trienamida), principal compuesto bioactivo de <i>H. longipes</i>	22
<b>Figura 4.</b> Modelo de campo abierto para determinar el efecto sobre la conducta exploratoria en ratones	34
<b>Figura 5.</b> Modelo del tablero perforado para determinar el efecto sobre la conducta exploratoria en ratones	35
<b>Figura 6.</b> Modelo del cilindro de exploración para determinar la actividad ansiolítica en ratones	35
<b>Figura 7.</b> Modelo del laberinto en cruz elevado para determinar la actividad ansiolítica en ratones	36
<b>Figura 8.</b> Forma de ambientación de las ratas en la prueba de la formalina	38

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
<b>Gráfica 1.</b> Número de plazas exploradas por los ratones <i>ICR</i> después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo de campo abierto en un periodo de 3 min	43
<b>Gráfica 2.</b> Número exploraciones por los ratones <i>ICR</i> después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo del tablero perforado en un periodo de 2 min	44
<b>Gráfica 3.</b> Número de exploraciones verticales por los ratones <i>ICR</i> después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo del cilindro de exploración en un periodo de 5 min	45
<b>Gráfica 4.</b> Tiempo de permanencia en los brazos abiertos por los ratones <i>ICR</i> después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo del laberinto en cruz elevado en un periodo de 2 min	46
<b>Gráfica 5.</b> Efecto sobre la latencia de sedación (PANEL A), latencia de hipnosis (PANEL B) y duración de la hipnosis (PANEL C) después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.), en la prueba de sedación-hipnosis, después de la administración de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.)	48
<b>Gráfica 6.</b> Efecto nociceptivo por la administración de la sustancia algésica en la prueba de la formalina en ratas, en un grupo administrado con el vehículo (CMC 1%)	49
<b>Gráfica 7.</b> Efecto antinociceptivo de la afinina (0.1-1.7 mg/pata) en la prueba de la formalina en ratas. Cada barra representa el ABC en la fase I (panel A), en la fase II (panel B) y de ambas fases (panel C), como un promedio de seis animales $\pm$ E.E.M, evaluado durante 60 min	51

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1.</b>	Fármacos aislados de plantas medicinales con actividad sobre el SNC	5
<b>Tabla 2.</b>	Ejemplo de plantas estudiadas mediante un perfil neurofarmacológico	8
<b>Tabla 3.</b>	Modelos animales para el estudio de ansiedad	14
<b>Tabla 4.</b>	Pruebas animales para el estudio del dolor	17
<b>Tabla 5.</b>	N-isobutilamidas identificadas de <i>H. longipes</i>	23
<b>Tabla 6.</b>	Evaluación analgésica de los extractos de <i>H. longipes</i> y la afinina en la prueba de estiramiento abdominal con ácido acético	26
<b>Tabla 7.</b>	Efecto del extracto de <i>H. longipes</i> , afinina y la N-isobutil decanamida en la prueba de inducción de edema (ácido araquidónico) en la oreja del ratón	27
<b>Tabla 8.</b>	Efecto del extracto de <i>H. longipes</i> , afinina y la N-isobutil decanamida en la prueba de inducción de edema (forbol miristato acetato) en la oreja del ratón	28
<b>Tabla 9.</b>	Fracciones reunidas y cantidad obtenida de afinina por cromatografía en columna	31
<b>Tabla 10.</b>	Efecto anticonvulsivo después de la administración de afinina (7.5-45 mg/kg, i.p.) y el diazepam (1 mg/kg, i.p.) sobre la aparición de convulsiones clónicas y tónicas en la prueba inducción de convulsiones con pentilentetrazol (80 mg/kg, i.p.)	52

## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
AF	Afinina
AISP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
AINE's	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
CA	Campo abierto
Ca <sup>+2</sup>	Calcio
CE	Cilindro de exploración
CL	Contralateral
Cl <sup>-</sup>	Cloruro
CMC	Carboximetilcelulosa
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva cincuenta
DL <sub>50</sub>	Dosis letal cincuenta
DZ	Diazepam
EEHL	Extracto etanólico de <i>Heliopsis longipes</i>
E.E.M.	Error estándar medio
EHL	Extracto de <i>H. longipes</i>
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
FMA	Forbol miristato acetato
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HPB	Hipnosis inducida por pentobarbital sódico
IBL	N-isobutil decanamida
IL	Ipsilateral
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Laberinto en cruz elevado
MOR	Movimientos oculares rápidos
NA	Noradrenalina
No MOR	Movimientos oculares no rápidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Pentobarbital sódico
PTZ	Pentilentetrazol
5-HT	Serotonina
SNC	Sistema Nervioso Central
TP	Tablero perforado
V	Vehículo

## RESUMEN

La afinina es una N-isobutilamida, aislada de una planta mexicana llamada *Heliopsis longipes*, a la cual se le han atribuido diversas actividades biológicas entre las que pueden considerarse la actividad como anestésico local, antiinflamatorio, analgésico, antimicrobiano y fungicida. Se ha establecido que la actividad fungicida se debe a su estructura insaturada, particularmente al enlace 2E.

Existen pocas evidencias farmacológicas que demuestren la actividad de afinina en el Sistema Nervioso Central (SNC). En el presente trabajo, se evaluó un perfil neurofarmacológico de afinina con la finalidad de determinar su efecto sobre la conducta exploratoria (campo abierto y tablero perforado), ansiolítico (cilindro de exploración y laberinto en cruz elevado), sedante-hipnótico (inducción de la hipnosis por pentobarbital sódico), antinociceptivo (prueba de la formalina) y anticonvulsivo (inducción de convulsiones por pentilentetrazol).

Los resultados obtenidos muestran que la afinina (30-75 mg/kg, i.p.) no posee efecto depresor sobre el SNC en las pruebas de campo abierto, tablero perforado, cilindro de exploración y laberinto en cruz elevado, así mismo, no presentó efecto como sedante-hipnótico. Por otro lado, la administración local de afinina (0.1-1.7 mg/pata en rata) presentó actividad antinociceptiva y la administración sistémica intraperitoneal (7.5-45 mg/kg) mostró efecto proconvulsiónante, en ambos casos el efecto fue dependiente de la dosis.

## I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia las diferentes civilizaciones han utilizado muchas especies de plantas como medicinales lo que ha dado origen al aislamiento, caracterización e identificación de nuevos compuestos que pueden tener utilidad terapéutica, principalmente en el SNC, lo cual puede ser justificada por las numerosas enfermedades que resultan en la disfunción del SNC, como la ansiedad, los trastornos del sueño, la epilepsia y el dolor.

Respecto a lo anterior, las alcanidas o N-isobutilamidas, son metabolitos secundarios en las plantas de gran interés actual. Una de estas alcanidas, la afinina (N-isobutil-deca-2E,6Z,8E-trienamida), aislada de *H. longipes* (Molina-Torres *et al.*, 1999), es un compuesto al que se le han atribuido diversas actividades biológicas entre las que se pueden considerar la acción de anestésico local, actividad insecticida y bactericida, actividad antiviral, anestésico local, antiinflamatorio y analgésico (Molina-Torres y García-Chávez, 2001). De la afinina se ha estudiado su actividad antinociceptiva en un modelo de dolor visceral (estiramiento abdominal) inducido por la administración de ácido acético (Ogura *et al.*, 1982) y el efecto de la afinina como antiinflamatorio en un modelo con ácido araquidónico y forbol miristato acetato (Hernández *et al.*, 2009).

No obstante, la afinina puede ser evaluada mediante las pruebas de un perfil neurofarmacológico, el cual resulta de gran importancia para los compuestos que han sido recientemente aislados de fuentes naturales o por síntesis química y de los cuales no se tiene información precisa de su utilidad (Williamson *et al.*, 1996). La evaluación de un perfil neurofarmacológico incluye la cuantificación de efectos tales como la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica, la sedante-hipnótica, la antinociceptiva y la anticonvulsiva (Martínez *et al.*, 2006, González-Trujano *et al.*, 2006). Dicho estudio es fundamental para determinar la acción farmacológica de la afinina, cuya actividad fundamental se ejerza sobre el SNC, cuando se administra en dosis dentro del intervalo dosis-respuesta de su acción farmacodinámica.

## II. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. Importancia del uso tradicional de plantas medicinales.

La lucha contra la enfermedad ha sido un aspecto importante de las interacciones entre los seres humanos y el medio ambiente natural. En el proceso de comprensión y tratamiento de enfermedades, el hombre ha descubierto por ensayo y error una variedad de productos naturales, principalmente de fuentes vegetales de valor terapéutico. Las plantas han servido en casi todas las culturas antiguas en la alimentación, el vestido, la vivienda y como fármacos, lo cual proporciona un valioso legado y conocimiento para el beneficio humano (Wei *et al.*, 2007). No sólo en los países en desarrollo sino en todo el mundo el uso de plantas medicinales ha venido desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la salud humana y para mejorar la calidad de la vida humana. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80% de los habitantes de los países en desarrollo dependen de la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria de la salud y que la mayoría de estas terapias implican el uso de extractos de plantas o sus componentes activos (OMS, 2000).

En las zonas rurales de México se ha encontrado, que la proporción de la población que utiliza plantas medicinales y los que acuden al médico es en una relación de cuatro a uno respectivamente (Badillo *et al.*, 2008), lo que indica el uso de la medicina tradicional como la mejor alternativa para el acceso a servicios de salud de esta población. Además, la medicina moderna involucra para las personas de estas poblaciones altos costos por el consumo de fármacos sintéticos. Esta es la razón por la que la población sigue utilizando las plantas medicinales y otras fuentes de la medicina tradicional (Badillo *et al.*, 2008). Sin embargo, la OMS reconoce que no existe un marco jurídico internacional que regule el acceso a las plantas mismas y su uso racional, ni la seguridad, eficacia y calidad de sus principios activos (OMS, 2000). Respecto a lo anterior, en México en el 2001 es publicada por la Secretaría de Salud la *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (FHEUM), la cual establece los lineamientos oficiales relacionados con el control de calidad para el uso de plantas medicinales.



Además trata de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas utilizados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, su uso adecuado, así como difundir y promover el potencial terapéutico de la flora de México (FHEUM, 2001). La lista de especies de uso tradicional incluidas en la FHEUM corresponde tan solo al 1% del total de la flora de México (Ocegueda *et al.*, 2005).

Por otro lado la experiencia clínica sugiere que algunas plantas medicinales muestran por sí mismas poca eficacia y efectos secundarios graves, aunque separados de los compuestos bioactivos a menudo se demuestra lo contrario, es decir, una buena eficacia y menos toxicidad, este hecho ha dado origen al estudio y aislamiento de muchos principios activos importantes que actualmente se han convertido en fármacos de uso común (Wei *et al.*, 2007). El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha involucrado el aislamiento de compuestos activos, como la morfina del opio en el siglo IXX (Newman *et al.*, 2000), la cocaína, la codeína, la digitoxina y la quinina (Butler, 2004). Tal ha sido el éxito de las plantas como fuente para aislar compuestos farmacológicamente activos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química y para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad y/o menor toxicidad que en la actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta (Pushpam, 2004).

De los medicamentos considerados como básicos y esenciales por la OMS, el 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número importante de fármacos sintéticos se obtienen a partir de precursores naturales (OMS, 2000). Sin embargo, existe una necesidad urgente de aislar y desarrollar nuevos fármacos con actividad en el SNC, lo cual puede ser justificado por las numerosas enfermedades que resultan en la disfunción del SNC, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, la epilepsia, la migraña, el dolor, la esquizofrenia y los trastornos del sueño, ya que se ha documentado que diversos principios activos aislados de las plantas medicinales pueden tener actividad terapéutica en el SNC (Phillipson, 1999b). En la Tabla 1 se muestran algunos fármacos aislados de plantas medicinales con actividad en el SNC.

**Tabla 1.** Fármacos aislados de plantas medicinales con actividad sobre el SNC (Fabricant y Farnsworth, 2001)

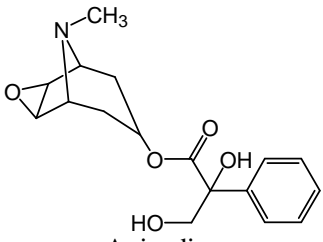
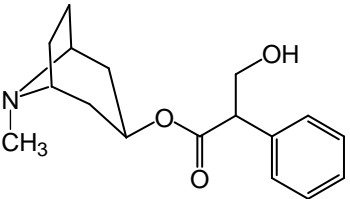
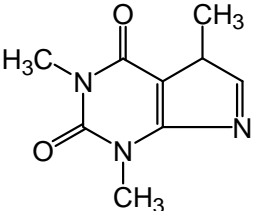
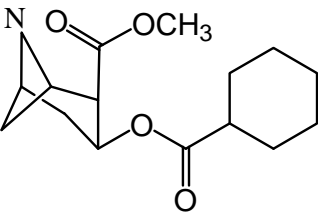
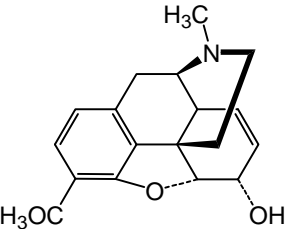
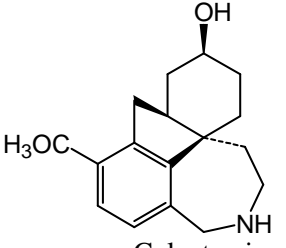
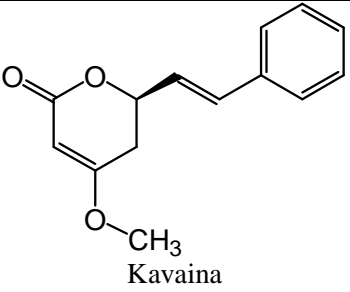
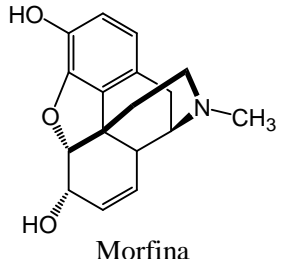
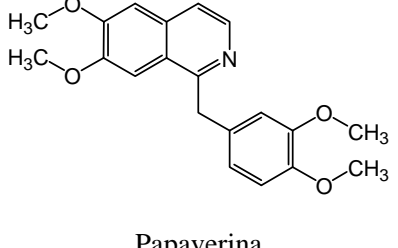
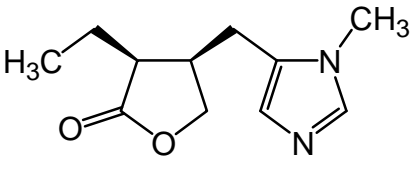
Nombre y estructura química	Acción/Usó clínico	Fuente
 <p>Anisodina</p>	Anticolinérgico	<i>Anisodus tanguticus</i>
 <p>Atropina</p>	Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i>
 <p>Cafeína</p>	Estimulante del SNC	<i>Camellia sinensis</i>
 <p>Cocaína</p>	Anestésico local	<i>Erythroxylum coca</i>
 <p>Codeína</p>	Analgésico, antitusivo	<i>Papaver somniferum</i>

Tabla 1. Continuación

Nombre y estructura química	Acción/Usó clínico	Fuente
 <p>Galantamina</p>	<p>Inhibidor de la colinestareasa</p>	<p><i>Lycoris squamigera</i></p>
 <p>Kavaina</p>	<p>Sedante</p>	<p><i>Piper methysticum</i></p>
 <p>Morfina</p>	<p>Analgésico</p>	<p><i>Papaver somniferum</i></p>
 <p>Papaverina</p>	<p>Relajante muscular</p>	<p><i>Papaver somniferum</i></p>
 <p>Pilocarpina</p>	<p>Parasimpaticomimético</p>	<p><i>Pilocarpus jaborandi</i></p>

## 2.2. Perfil neurofarmacológico

El perfil neurofarmacológico es definido como el estudio de la acción de fármacos o compuestos químicos en el SNC (Webster y Jordan, 1989). Dicho estudio resulta de gran utilidad para los compuestos que han sido recientemente aislados de fuentes naturales o por síntesis química y de los cuales no se tiene información precisa de su utilidad. Este tipo de estudio consiste en una serie de pruebas conductuales que sirven para determinar el efecto farmacológico de un fármaco o compuesto. Gracias a estos estudios y a los avances en neurofarmacología, las enfermedades con origen en el SNC tales como trastornos del movimiento, neurosis y psicosis, ahora pueden atribuirse a lesiones bioquímicas en áreas específicas del cerebro y a alteraciones específicas en función de un neurotransmisor, su síntesis o su liberación (Williamson *et al.*, 1996). En la Tabla 2 se mencionan plantas en los que se han realizado las pruebas de un perfil neurofarmacológico.

**Tabla 2.** Ejemplo de plantas estudiadas mediante un perfil neurofarmacológico

Nombre de la planta	Uso tradicional	Pruebas evaluadas	Resultado	Referencia
<i>Magnolia dealbata</i>	Tranquilizante y anticonvulsionante	Actividad motora: Campo abierto (CA) Efecto ansiolítico: Laberinto en cruz elevado (LCE), tablero perforado (TP) y cilindro de exploración (CE) Hipnosis inducida por pentobarbital sódico (HPB) Anticonvulsivo: Pentilentetrazol (PTZ) Dosis letal cincuenta (DL <sub>50</sub> )	Hipnótico, ansiolítico y anticonvulsionante	Martínez <i>et al.</i> , 2006
<i>Nauclea latifolia</i>	Desórdenes del estómago, tos, fiebre de malaria y el dolor	Conducta exploratoria: TP HPB Comportamiento estereotipado inducido por apomorfina Coordinación motora: rota rod	Sedante	Amos <i>et al.</i> , 2005
<i>Ruta chalepensis</i>	Histeria, epilepsia, vértigo, ansiedad, envenenamiento, parásitos intestinales y dolor de cabeza	PTZ HPB CA Antinociceptiva: Ácido acético y formalina DL <sub>50</sub>	Sedante-hipnótico, ansiolítico, anticonvulsionante y antinociceptivo	González-Trujano <i>et al.</i> , 2006
<i>Tilia americana</i> L. var. <i>Mexicana</i>	Enterocolitis, cólicos, gastroenteritis, sedante y ansiolítico	HPB Ansiolítico: LCE, TP, CE y CA DL <sub>50</sub>	Sedante-hipnótico y ansiolítico	Aguirre <i>et al.</i> , 2007
<i>Cissus sicyoides</i>	Diurético, antiinflamatorio y antidiabético	HPB PTZ TP y LCE	Ansiolítico y anticonvulsionante	Rodríguez <i>et al.</i> , 2009

## **2.2.1. Pruebas de un perfil neurofarmacológico**

### **2.2.1.1. Efecto sobre la conducta exploratoria**

Como ya se ha mencionado un perfil neurofarmacológico puede incluir la determinación del efecto sobre la conducta exploratoria, la evaluación de la actividad ansiolítica, el efecto sedante-hipnótico, actividad antinociceptiva y la anticonvulsiva (Martínez *et al.*, 2006, González-Trujano *et al.*, 2006). Las pruebas de ansiedad están basadas en la observación de la conducta y la actividad motora que presentan los animales, las cuales son de gran utilidad para determinar la actividad ansiolítica del fármaco en cuestión. Dentro de este aspecto, la determinación del efecto sobre la conducta exploratoria del animal incluye desde la observación de su intensidad, hasta la detección de afectaciones en el transcurso de la prueba. Además, se evalúan reflejos tales como el de enderezamiento, el estado de alerta o el escape. Sin embargo, esto se enriquece con la realización de estudios específicos de conductas espontáneas o provocadas, que permiten cuantificar las conductas observadas como eventos acumulados o como porcentaje de animales que realizan una conducta en un tiempo dado (Shillito, 1970).

Los modelos para evaluar la conducta exploratoria en animales pueden incluir el de campo abierto y el de tablero perforado (Hole board) (Viola *et al.*, 1994). Ambos modelos se ha utilizado originalmente como base para las otras pruebas que registran conductas particulares de los animales como el número de posiciones bípedas. Una de la razones de su uso es la comodidad que brindan para colocar a los animales en un ambiente en el cual no han tenido experiencia previa, distinto al sitio en que se encuentran habitualmente, de mayores o menores dimensiones y luminosidad, lo cual origina una respuesta por parte del animal (RIVAPLAMED, 1996).

## 2.2.1.2. Evaluación de la actividad ansiolítica

### 2.2.1.2.1. Sistemas neurotransmisores en la ansiedad

Los principales sistemas neurotransmisores implicados en la génesis y expresión de la sintomatología de la ansiedad son el sistema serotoninérgico, el noradrenérgico (Benjamin y Kennedy, 2005) y principalmente el sistema Gabaérgico (Nemeroff, 2003). Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado muchos estudios que demuestren la importancia de los sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos en la ansiedad (Yokoyama *et al.*, 2009).

**Serotonina (5-HT):** La 5-HT representa un papel muy importante en el desarrollo de la neurofarmacología. Sus receptores forman un grupo característico por su heterogeneidad. Éstos receptores han sido clasificados en siete familias (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>) (Benjamin y Kennedy, 2005). Particularmente el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (acoplado a proteínas G) ha sido implicado en una amplia variedad de funciones del SNC, como ansiedad, la regulación del apetito, la liberación de hormonas de estrés, la locomoción y la termorregulación (Koek *et al.*, 1992). El sistema serotoninérgico proviene de los núcleos del rafe del tronco del encéfalo. Dentro del cerebro límbico es particularmente rica la inervación serotoninérgica del complejo septo-hipocámpico. La disminución de la transmisión serotoninérgica (bloqueo de receptores, lesiones, toxinas, depleción de 5-HT e inhibición de la síntesis) origina efectos ansiolíticos en el animal (Garakani *et al.*, 2006). Se ha informado que la buspirona (agonista parcial de los receptores de 5-HT<sub>1</sub>) inhibe selectivamente la recaptación de la 5-HT en el tratamiento de la ansiedad (Mongeau *et al.*, 1997).

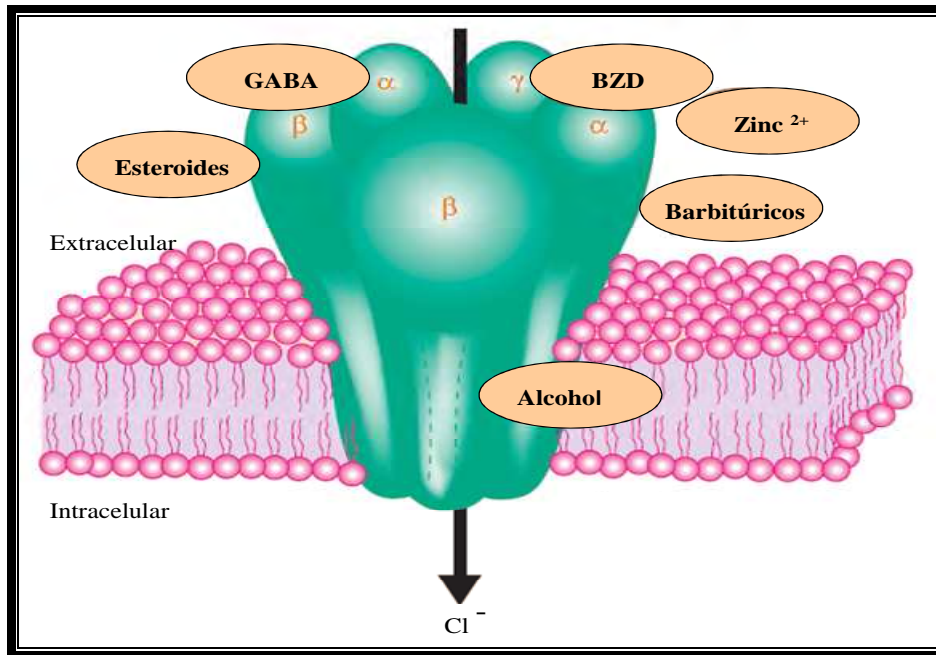
**Noradrenalina (NA):** Modula muchos componentes del comportamiento, autónomo y endocrino de la respuesta al estrés y puede tener un papel específico en la modulación de la ansiedad y el miedo (Charney *et al.*, 1992). En estados de ansiedad existe un exceso de liberación de NA debido a una disfunción en los receptores inhibidores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. La administración sistémica de  $\alpha_2$ - adrenérgicos como la yohimbina inducen la liberación de NA en el hipotálamo y

el hipocampo y originan comportamientos compatibles con la ansiedad y el miedo (Tjurmina *et al.*, 1999).

**Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA):** El receptor GABA es el principal neurotransmisor inhibitor en el SNC (Koch y Magnusson, 2009). Se han estudiado tres tipos de receptores GABA, los cuales se han clasificado en GABA<sub>A</sub>, de carácter ionotrópico asociado a las membranas postsinápticas, GABA<sub>B</sub>, de tipo metabotrópico y generalmente se encuentran en las terminales pre y postsinápticas y GABA<sub>C</sub>, que sólo se encuentra en la retina, de carácter ionotrópico (Bormann *et al.*, 1995).

El principal receptor implicado no sólo en la ansiedad, sino también en la sedación-hipnosis y la epilepsia, es el receptor GABA<sub>A</sub>. Los receptores de GABA<sub>A</sub> son moléculas proteicas oligoméricas, ensambladas a base de distintos tipos de subunidades polipeptídicas que, en número de cinco, conforman el receptor y delimitan el canal transmembranal preferentemente selectivo a iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) (Mehta y Ticku, 1999). En este receptor han sido identificadas las siguientes subunidades: 6 variantes  $\alpha$ , 4 variantes  $\beta$ , 4 variantes  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  y  $\theta$  (Jones-Davis y Macdonald, 2003). Las subunidades más abundantes y estudiadas son las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La combinación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  produce receptores GABA<sub>A</sub> funcionales, pero no fijan las benzodiazepinas. El papel de las subunidades  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  y  $\theta$  que tienen una expresión limitada en el cerebro, no está claro, pero es posible que ejerzan funciones similares a las de la subunidad  $\gamma$  (Möhler *et al.*, 2001). Estudios genéticos y farmacológicos sugieren un importante papel de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del receptor GABA<sub>A</sub> en la mediación de ansiedad (Atack *et al.*, 2005, Rudolph y Mohler, 2002). El receptor GABA<sub>A</sub> es el sitio de acción de una variedad fármacos con aplicaciones terapéuticas importantes entre las cuales se incluyen, además del GABA, otros compuestos como: benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides neuroactivos, picrotoxina, cationes metálicos como el zinc y el etanol (Roth-Schechter *et al.*, 1983), como se muestra en la Fig. 1.





**Figura 1.** Receptor GABA<sub>A</sub> y sus sitios de unión (Russek, 2006).

Los receptores GABA<sub>B</sub> comprenden un lugar de reconocimiento y un canal iónico, de calcio o de potasio, con el que están acoplados indirectamente, mediante proteínas G. La activación de GABA<sub>B</sub> en las neuronas periféricas como las del ganglio raquídeo posterior lleva a una reducción de la entrada de calcio en la célula, mientras que en el SNC, como en el caso de las células piramidales del hipocampo, produce un aumento de flujo de potasio hacia el exterior de la neurona. La activación presináptica del receptor reduce la liberación de monoaminas, aminoácidos excitadores, neuropéptidos y hormonas, así como el mismo GABA (Grant y Heei, 1991). El GABA también puede inducir una respuesta inhibitoria con un lento comienzo por la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> postsinápticos (Rudolph *et al.*, 1999).

Los receptores GABA<sub>C</sub> se localizan predominantemente en la retina. Se diferencian de los receptores GABA<sub>A</sub> en que son insensibles a los antagonistas clásicos de los receptores GABA<sub>A</sub> como la bicuculina, así como tampoco poseen afinidad por baclofeno (agonista del receptor GABA<sub>B</sub>) y su función no está regulada por las benzodiazepinas (Luddens y Korpi, 1996).

El diazepam es un compuesto químico con estructura de benzodiazepina que posee dos átomos de nitrógeno en posición 1 y 4 (1,4-benzodiazepina). Éste fármaco se utiliza como prototipo, ya que tiene una amplia aplicación terapéutica como tranquilizante, sedante-hipnótico, relajante muscular y anticonvulsivante, cuyo mecanismo de acción involucra la unión a un modulador ubicado en los receptores GABA<sub>A</sub>. El diazepam modifica la disposición estructural tridimensional del receptor aumentando la frecuencia de apertura del canal del Cl<sup>-</sup>, por la acción del GABA (Biach *et al.*, 2009).

#### **2.2.1.2.2. Modelos animales de ansiedad**

La investigación preclínica en el área de la ansiedad utiliza cerca de 30 modelos animales que permiten observar y cuantificar conductas de diversa índole. Estas conductas responden de una manera específica al tratamiento con compuestos ansiolíticos (Gómez *et al.*, 2002). Los modelos animales para el estudio de la ansiedad son clasificados de acuerdo a la naturaleza del estímulo aversivo y de la respuesta que se produce en dos categorías: modelos condicionados y modelos no condicionados, ver Tabla 3. En los modelos condicionados (modelos de conflicto) se incluyen procedimientos de castigo. El castigo consiste en un estímulo aversivo, generalmente el uso de descargas eléctricas, aplicado a un animal entrenado o condicionado para emitir una respuesta condicionada (Rodgers *et al.*, 1997a).

Los modelos no condicionados se han desarrollado mediante la clasificación del repertorio conductual natural de diferentes especies animales. Estos modelos tienen un mayor grado de validez neurobiológica, no requieren entrenamiento y son menos susceptibles a la inferencia de procesos motivacionales (Gómez *et al.*, 2002, Bourin, 2007). Entre los modelos no condicionados se encuentran el modelo del cilindro de exploración y el laberinto en cruz elevado. El modelo de cilindro de exploración, también llamado de exploraciones verticales, consiste en colocar los ratones tratados de manera individual en un cilindro durante un tiempo predeterminado (generalmente 5 min) y cuantificar las veces que el roedor se eleva sobre sus patas traseras con el

objetivo de explorar. Se considera que la disminución en las exploraciones con respecto al control, es debido al efecto ansiolítico y sedante del fármaco (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007).

**Tabla 3.** Modelos animales para el estudio de ansiedad (Modificado de Rodgers *et al.*, 1997a)

Respuestas condicionadas	Respuestas no condicionadas
1. Pruebas de conflicto: Geller-Seifter Vogel	1. Pruebas exploratorias: Laberinto en cruz elevado Transiciones luz/oscuridad Campo abierto Tablero perforado
2. Otras: Respuesta emocional condicionada Evitación activa/pasiva Supresión condicionada de la ingesta de líquidos Vocalizaciones ultrasónicas condicionadas	2. Pruebas sociales: Vocalizaciones ultrasónicas inducidas por separación Interacción social
	3. Otras: Conducta defensiva de enterramiento

El modelo del laberinto en cruz elevado, es una de las pruebas de ansiedad más utilizadas y es el modelo mejor validado desde el punto de vista conductual, farmacológico y fisiológico para este fin (Pellow *et al.*, 1985). El modelo del laberinto es una estructura en forma de cruz, dos de sus ramas son abiertas y dos cerradas, de las mismas dimensiones, separadas por una zona central. Las ramas abiertas y cerradas se encuentran enfrentadas. El laberinto se levanta del suelo de modo que los brazos abiertos combinan elementos de la falta de familiaridad, la apertura y la elevación (Bourin *et al.*, 2007). El fundamento del modelo del laberinto en cruz elevado radica en que los ratones son animales de hábito nocturno, por lo que se estima que permanecerán, preferentemente en la rama cerrada (Pellow y File, 1986). Por lo anterior, la interpretación más aceptada es que la exposición a un estímulo novedoso promueve tanto la exploración como el miedo, generando un conflicto de aproximación-evitación y que la rama abierta elevada refuerza el miedo y la evitación, en relación a la rama cerrada. En este modelo la ansiedad se determina considerando el tiempo en el que el animal permanece en los brazos abiertos, por lo tanto la

administración de un fármaco ansiolítico incrementará la permanencia del animal en los brazos abiertos (Bourin *et al.*, 2007).

### **2.2.1.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica**

La sedación es definida como una disminución de la capacidad de respuesta con disminución en la actividad locomotora, modera la excitación y tranquiliza en general, en tanto que un hipnótico produce somnolencia y facilita la iniciación y la conservación de un estado de sueño similar al sueño natural en sus características electroencefalográficas (Barrett y Dimascio, 1966). El sueño consta de dos categorías principales: Sueño con movimientos oculares no rápidos (no MOR), que representa del 70-75% del sueño total y sueño con movimientos oculares rápidos (sueño MOR). El sueño no MOR pasa por cuatro etapas que se designan del I al IV. Ambos se presentan de manera cíclica durante un intervalo de 90 min (Murillo-Rodríguez *et al.*, 2007).

Los efectos que se producen por la administración de los sedantes-hipnóticos en los patrones del sueño normal son:

- 1) La latencia del inicio del sueño disminuye
- 2) La duración de la etapa II del sueño no MOR aumenta
- 3) La duración del sueño MOR disminuye
- 4) La duración de ondas lentas disminuye (Velasco, 1993).

En la prueba de sedación-hipnosis inducida por la administración de una dosis de pentobarbital sódico (0.1 ó 1 mg/kg) se evalúa la capacidad de los fármacos de interés de potenciar los efectos hipnóticos del barbitúrico (disminuye el tiempo de inducción y aumenta el periodo de hipnosis) o antagonizarlos (aumenta el tiempo de inducción y disminuye el periodo de hipnosis), entendiéndose por inducción de la hipnosis como la pérdida del reflejo de postura y como periodo de hipnosis aquella porción de tiempo que transcurre entre la pérdida y la recuperación de dicho reflejo (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007).

El pentobarbital es un barbitúrico que actúa provocando un efecto sedante-hipnótico al actuar sobre los receptores GABA<sub>A</sub> facilitando la neurotransmisión GABA, aumentando el tiempo de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> de los receptores GABA<sub>A</sub>, dicha interacción representa un papel importante en la acción anestésica de este fármaco. Dependiendo de su concentración el pentobarbital puede potenciar, activar o bloquear el canal del GABA<sub>A</sub>. El GABA y el pentobarbital inducen diferentes reordenamientos estructurales en el receptor y así activan al receptor mediante diferentes mecanismos (Muroi *et al.*, 1994).

#### **2.2.1.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva**

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, International Association for the Study of Pain) define al dolor como la experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño (IASP, 1986). La manifestación del dolor se debe a la presencia de mecanismos neurofisiológicos como la nocicepción, la cual es definida como el mecanismo por el cual un estímulo nocivo es transmitido al SNC, que se origina por la estimulación y activación de los receptores sensoriales (nociceptores) localizados en la periferia y que nos informan acerca del daño a algún tejido (Calixto *et al.*, 2000).

La actividad antinociceptiva puede evaluarse por medio de modelos animales del dolor, los cuales tratan de reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permiten el estudio de alternativas terapéuticas aplicables a la clínica humana o, al menos, el mejor conocimiento de las mismas. En este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas (González-Darder, 2000). De acuerdo al estímulo aplicado a los animales, los modelos para el estudio del dolor pueden ser clasificados como se indican en la Tabla 4. Los ensayos más comunes para la prueba de la nocicepción son los que utilizan un estímulo químico, como la prueba de la formalina.

**Tabla 4.** Pruebas animales para el estudio del dolor (Wilson y Mogyl, 2001)

Prueba	Ventajas	Desventajas	Comentarios
<b>Estímulo Mecánico</b>			
Presión sobre la pata	Aplicación precisa del estímulo (pata derecha vs pata izquierda)	Requiere entrenamiento	El umbral de vocalización puede no reflejar con precisión el umbral nociceptivo
Filamentos de Von Frey	No requiere entrenamiento	Respuesta inestable, laborioso, requiere mucho tiempo	Los filamentos se deben calibrar periódicamente. Sensible a la colocación precisa del filamento
<b>Estímulo Térmico</b>			
Placa caliente (hot plate)	Simplicidad	Puede desarrollar hiperalgesia. Requiere entrenamiento	El lamido, levantamiento, el salto o la sacudida de la pata son las conductas a evaluar
Retiro de la pata (hargreaves)	No requiere entrenamiento, aplicación precisa del estímulo	Respuesta inestable, requiere mucho tiempo, laborioso	Sensible a la temperatura ambiental
Retiro de la cola (Tail flick)	Respuesta estable, simplicidad	Requiere entrenamiento	Sensible al lugar y a la temperatura ambiental. La pigmentación de la cola afecta la absorción del calor
<b>Estímulo Químico</b>			
Estiramiento abdominal (writhing)	Sensible a los analgésicos débiles	Sensible (a no analgésicos), alta variabilidad	Los estiramientos tienen algún grado subjetivo
Formalina	Sensible a analgésicos opiáceos y no opiáceos	Laborioso, requiere mucho tiempo	Sensible a la habituación y temperatura ambiental

#### 2.2.1.4.1. Prueba de la formalina

En la prueba de la formalina se evalúa la forma en la que un animal responde a moderados y continuos estímulos nociceptivos generados por una lesión tisular (Abbott y Teng, 1998).

Además, tiene la ventaja ética de que la nocicepción provocada sobre los animales es de tiempo limitado y de corta duración comparado con modelos de carácter crónico como el de la artritis inducida por el adyuvante de Freund (Tjølsen *et al.*, 1992). La prueba consiste en la inyección de una solución de formalina, generalmente en el espacio subcutáneo de la cara dorsal de la pata de la rata o ratón (González-Darder, 2000). Los volúmenes que más a menudo han sido administrados son de 20-25  $\mu$ L en ratón y de 30-100  $\mu$ L en ratas y se sugiere que las concentraciones empleadas de formalina sean del 1-5% (Dubuisson y Dennis, 1977). En esta prueba la conducta responde a la inyección de formalina diluida dentro de la pata de un animal. En ratas adultas la respuesta consiste en lamer, morder, elevar, sacudir y/o proteger la pata administrada (Abbott y Teng, 1998), comúnmente las sacudidas son usadas para cuantificar la antinocicepción en rata (Wheeler-Aceto y Cowan, 1991).

La prueba de la formalina produce complejas respuestas que duran aproximadamente 60 min y cuya característica importante en roedores es que los animales muestran dos fases de comportamiento nociceptivo que parecen implicar a dos estímulos diferentes (Puig y Sorkin, 1996). La primera fase (aguda) inicia inmediatamente después de la inyección de formalina y finaliza aproximadamente a los 5 min (Rosland, 1991). Esto es debido probablemente a la estimulación química directa de los nociceptores, predominantemente en las fibras C y no en las A $\delta$  aferentes. Una segunda fase (tónica o fase tardía) de alta actividad de respuesta se produce tras un tiempo de latencia de unos 10-15 min y es observada de 20-30 min después de la inyección de formalina (Rosland, 1991), aunque puede extenderse más de 60 min y se debería al desarrollo de un proceso inflamatorio local con liberación de sustancias nociceptivas, así como a la puesta en marcha de mecanismos a nivel medular inducidos en la primera fase (González-Darder, 2000). La prueba de la formalina resulta ser particularmente influenciada por factores como el olor, los sonidos, la luz intensa, elevada presión atmosférica y la temperatura, la cual debe fluctuar entre 25-27°C para ratas y 22-23°C para ratones, debido a que ésta afecta la Fase II de esta prueba (Rosland, 1991).

### 2.2.1.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva

Una hipótesis siempre considerada en la fisiopatología de la epilepsia es que las alteraciones de los sistemas de inhibición son las principales responsables del comienzo de las crisis epilépticas. Más concretamente, se ha documentado de la participación crítica que tendrían las alteraciones de la inhibición procedente de las interneuronas que secretan el neurotransmisor inhibitor GABA. Del mismo modo, también se ha podido observar ampliamente que la activación de las sinapsis glutamatérgicas genera convulsiones (Cossart *et al.*, 2005). El desarrollo de sustancias útiles para el tratamiento de las crisis convulsivas depende de la disponibilidad de modelos adecuados para el estudio de la patofisiología y de la neurobiología de la epilepsia (Velasco, 1993). Para ello al evaluar la actividad anticonvulsiva de un compuesto o fármaco se utilizan más comúnmente modelos animales en los que se administran sustancias químicas o bien modelos animales en los que se aplican estímulos eléctricos (Webster y Jordan, 1989).

Dentro de los modelos en los que se administran sustancias químicas se ha señalado que muchos compuestos químicos pueden producir crisis generalizadas si se aplican en forma sistémica, como por ejemplo, penicilina, bicuculina, picrotoxina, pentilentetrazol (PTZ) y estriquina. Es el PTZ el más clásico de los agentes empleados. En el animal produce sacudidas mioclónicas y crisis generalizadas a tónico-clónicas. Parecería que estructuras como los cuerpos mamilares, los tractos mamilotalámicos y anterior talámico participan en las crisis generadas por el PTZ. Para algunos autores el PTZ bloquea la inhibición mediada por GABA (Granillo *et al.*, 2002). El PTZ es un antagonista no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub> que actúa en todo el SNC, pero es particularmente activo en regiones sensitivo-motoras de la corteza cerebral del mamífero. En 1960 se encontró que el PTZ era un compuesto convulsionante con un sitio de acción a nivel de la sinapsis y particularmente en la sinapsis excitatoria, en contraste con otras sustancias, como la estriquina que actúa a nivel de la sinapsis inhibitoria (Hernández, 2000).

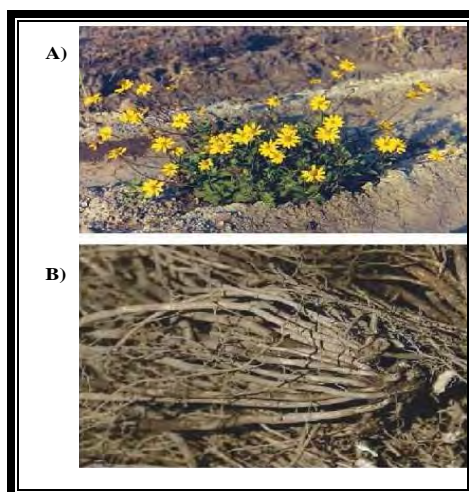
Como ya se ha mencionado el PTZ causa convulsiones mioclónicas, tónicas y clónicas. Las crisis mioclónicas se distinguen por ser sacudidas musculares bilaterales y simétricas, súbitas y breves, sin alteración de la conciencia y son originadas en los circuitos tálamo-corticales. Las crisis



tónicas son breves contracciones musculares más prolongadas, simétricas y bilaterales, con o sin pérdida de la conciencia y que con frecuencia causan la caída del sujeto, se originan en el tallo cerebral, mientras que las convulsiones clónicas se ha demostrado que surgen de la corteza cerebral y el cerebro anterior (André, 1998).

### 2.3. Antecedentes de *Heliopsis longipes*

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu Heliantheae de la familia Asteraceae (anteriormente Compuestas). La mencionada tribu comprende cerca de 2,500 especies agrupadas en 189 géneros y está fraccionada en diez subtribus (Bremer, 1994). *H. longipes* (Gray) Blake, es una planta silvestre, cuyas raíces al masticarse producen un abundante flujo de saliva. Ésta es una herbácea perenne de hojas opuestas ovadas y cabezuelas de color amarillo. Las raíces miden de 15-30 cm de largo por 33 mm de ancho, ver Fig. 2. La planta casi se seca en invierno, pero brota en la estación lluviosa de julio a septiembre (Martínez, 1990). Entre los nombre comunes asociados a *H. longipes* se encuentran *chilcuague*, *chilcuan*, *chilmecatl*, *chilicuau*, *pelitre*, *peritre*, *raíz azteca* o *raíz de oro* (Martínez, 1990, Molina-Torres y García-Chávez, 2001). Los lugares en México en los que se puede encontrar la planta de *H. longipes* son el Estado de Guanajuato, el sur de San Luis Potosí y norte de Querétaro (Martínez, 1990).



**Figura 2.** *H. longipes* (A) Parte aérea y flores (B) raíces (López-Bucio *et al.*, 2006).

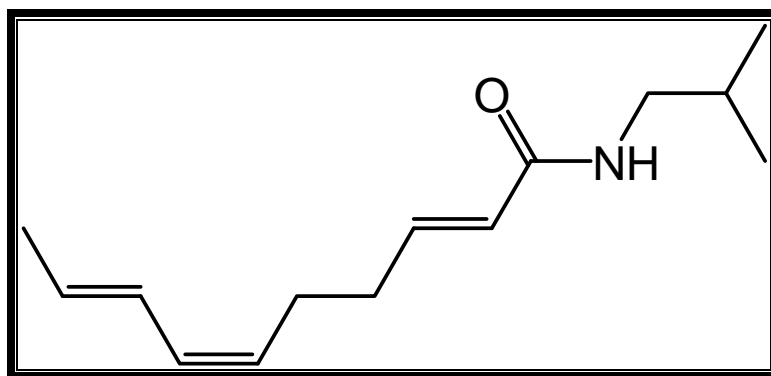
Las actividades biológicas atribuidas a *H. longipes* son la actividad antiviral, en el tratamiento de las aftas bucales y de algunas variedades de herpes, actividad fungicida y antimicrobiana, en el tratamiento de pie de atleta; actividad molusquicida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales (Molina-Torres y García-Chávez, 2001). Además, se distingue su uso tradicional como analgésico y antiinflamatorio en el dolor de muelas, como anestésico local, estimulante de la salivación y como antibiótico para infecciones de los aparatos digestivo y respiratorio (Correa *et al.*, 1971).

#### 2.4. Generalidades de las N-isobutilamidas

Las N-isobutilamidas (alcamidas) son un grupo de metabolitos secundarios derivados del grupo amida, comprenden alrededor de 200 compuestos relacionados y distribuidos en 10 familias de plantas, dentro de las cuales, adquieren una mayor importancia las familias Asteraceae, Piperaceae y Rutaceae, por la elevada concentración de alcamidas en sus tejidos. Desde el punto de vista biogénico, las alcamidas se originan al condensarse un ácido graso de una longitud de cadena que puede ser de ocho a dieciocho carbonos (lineal o alifática) con una amina proveniente de un aminoácido por descarboxilación (García-Chávez *et al.*, 2004). Las amidas cuya cadena acídica es alifática, dependiendo del tipo de enlaces insaturados que presenten, se pueden separar en dos grupos: las alcamidas olefínicas, con al menos una doble ligadura; y las alcamidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura (Greger, 1984).

Las N-isobutilamidas alifáticas con varias insaturaciones son poco estables en presencia de aire, lo que dificulta su purificación y caracterización, así como su evaluación biológica, ya que se dispone de ellas por poco tiempo (Elliot *et al.*, 1987, Hernández, 2000). Cada una las alcamidas tienen características individuales pero es interesante que sus moléculas bioactivas presentan estructuras químicas relacionadas. Dichos compuestos han demostrado su eficacia como medicinales, saborizantes e incluso en control biológico, por lo que son un grupo de metabolitos de gran interés actual (Molina-Torres y García-Chávez, 2001).

*H. longipes* fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcanida olefínica (Acree *et al.*, 1945). Sin embargo, la planta cuya muestra de raíces fue sometida para su análisis en laboratorio resultó erróneamente identificada como *Erigeron affinis* (Martínez, 1990) y así la amida aislada fue denominada afinina (N-isobutil-deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienamida), ver Fig. 3.



**Figura 3.** Estructura química de la afinina (N-isobutil-deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienamida), principal compuesto bioactivo aislado de *H. longipes* (Molina-Torres *et al.*, 1996).

De acuerdo a su estructura la afinina es un compuesto formado por un ácido graso alifático de 10 carbonos con tres insaturaciones, unido a una isobutilamina y pertenece al grupo de alcanidas olefínicas (Ramírez-Chávez, 2000). La presencia de la insaturación 2*E* ha sido asociada con la toxicidad de las alcanidas en insectos (Jacobson, 1954). Lo anterior también puede ser posible para la toxicidad observada en contra de las bacterias y hongos, ya que el principal isómero (la afinina) en el extracto de *H. longipes*, tiene un doble enlace *E*, en el carbono 2. Sin embargo, es necesario confirmar la toxicidad específica de esta isomería, ya que las alcanidas naturales alfa insaturadas pueden tener más de un mecanismo de interacción con tejidos diferentes (Molina-Torres, 1999). Una de las ventajas de obtener sustancias tales como la afinina, producidas por biosíntesis de plantas, es que no tienen efectos secundarios en el ecosistema, dado que pueden ser metabolizados por uno u otro organismo (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000). Por mucho tiempo se consideró a la afinina como único componente bioactivo presente en *H. longipes* (Romero *et al.*, 1989). Sin embargo, un análisis fitoquímico más detallado de *H. longipes* ha revelado la presencia de otros principios bioactivos con posibles propiedades antimicrobianas (Molina-Torres *et al.*, 1995). En la Tabla 5 se representan las N-isobutilamidas identificadas de *H. longipes*.

**Tabla 5.** N-isobutilamidas identificadas de *H. longipes* (García-Chávez, 2004)

<p>N-isobutil decanamida</p>	<p>N-isobutil-2E-decenamida</p>
<p>N-isobutil-6Z,8E-decadienamida</p>	<p>N-(2-metilbutil)-2E,6Z,8E-decatrienamida</p>
<p>N-isobutil-8,10-undecadiin-2Z-enamida</p>	<p>N-isobutil-8,10-undecadiin-2Z,4E-dienamida</p>
<p>N-isobutil-8,10-undecadiin-2E-enamida</p>	<p>N-isobutil-2E,4E,8Z,10E-dodecatetraenamida</p>
<p>N-(2-metilbutil)-2E,4Z,8Z,10E-dodecatetraenamida</p>	<p>2E,6Z,8E decatrinoato de bornilo</p>

## 2.5. Aspectos farmacológicos del extracto de *H. longipes* y la afinina

La utilidad de las plantas del género *Heliopsis* desde el punto de vista antropocéntrico se ha limitado a dos especies: *H. helianthoides*, comercializada en Estados Unidos como flor de ornato en jardinería bajo el nombre de falso girasol y *H. longipes* con aplicaciones más diversas en México (Molina-Torres y García-Chávez, 2001). Entre las actividades farmacológicas evaluadas del extracto de *H. longipes* y la afinina se tienen:

**Actividad Bactericida:** La afinina posee acción inhibitoria sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus subtilis* y *Sacharomyces cerevisiae* (Molina-Torres y García-Chávez, 1999).

**Actividad Insecticida:** Por sus propiedades insecticidas *H. longipes* fue una de las plantas descubiertas por los Estados Unidos durante la segunda guerra mundial, observando que los extractos de sus raíces tienen el mismo grado de acción paralítica y toxicidad contra moscas y otros insectos (Little, 1948). El extracto crudo obtenido de la raíz de *H. longipes* muestra actividad insecticida para controlar la antracnosis, ocasionada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en el cultivo de frijol en invernadero y campo. Estos compuestos pueden proteger al frijol al mismo nivel de otros fungicidas sintéticos (Salgado-Garciglia, 2008).

**Actividad Fungicida:** Se ha demostrado que la afinina purificada a una concentración promedio de 75 µg/mL, inhibe completamente el desarrollo del micelio de varias especies de hongos fitopatógenos (Molina-Torres *et al.*, 2004). Por otro lado al utilizar el extracto etanólico de *H. longipes* (EEHL) frente a *Sclerotium rolfii*, un hongo fitopatógeno, se observó que además de la afinina, otros compuesto del extracto ayudan a inhibir su crecimiento (Ramírez, 2000). Además, el EEHL muestra actividad fungicida en algunos hongos fitopatógenos como *S. cepivorum*, *Fusarium oxysporum* y *C. gloesporioides* (Molina-Torres y García-Chávez, 2001, Morales-López, 2007).

En relación a su **actividad larvicida** se tiene reportes de que el EHL posee actividad larvicida frente a la mosca doméstica y con poblaciones de un lepidóptero: *Diaphania hyalinata* y un díptero: *Aedes aegyti* (Jacobson *et al.*, 1971).

**Actividad en el SNC:** Se ha demostrado la actividad antinociceptiva del EHL y de la afinina en una prueba de dolor visceral (estiramiento abdominal) inducido por la administración de ácido acético. En esta evaluación inicialmente se determinó que la aplicación de un pedazo de raíz en la lengua produce un efecto adormecedor intenso que persistió durante 45-60 min. Posteriormente se evaluaron tres fracciones (la primera (A) fue el extracto crudo de acetato de etilo, la segunda el extracto usando como disolvente el agua (B) y la tercera fracción, la afinina), las cuales se administraron por vía oral y por cada fracción se realizó un grupo control (Ogura *et al.*, 1982). Los resultados obtenidos de esta prueba se mencionan en la Tabla 6.

En la fracción B no se presentaron manifestaciones farmacológicas graves. Los ratones que recibieron 25 mg/kg (oral) de la fracción A mostraron una cierta depresión inicial seguida de temblores leves. La actividad normal se reanudó después de 5-10 min, interrumpida por la presencia de temblores de periodos cortos y poco frecuentes, así como un decremento en la actividad motora. Los animales que recibieron 50 mg/kg de la fracción A presentaron temblores, sobre todo de la cabeza y las extremidades delanteras de 2-5 min después de la administración de la fracción A y continuaron durante unos 20 min. Se incrementó la respiración y la frecuencia cardíaca, seguida de una depresión severa observada 30 min después de la administración de la fracción A por lo que el 60% de los animales murieron; los animales restantes observaron una depresión de la actividad motora por más de 2 h. Para la afinina (7.5 mg/kg) se presentó una sola manifestación de toxicidad, ya que se observó una leve depresión, seguida de una supresión de la actividad motora que duró aproximadamente 10 min. El 40% de los animales que recibieron la dosis de 10 mg/kg de afinina, manifestaron una depresión en la actividad 40 min después de la administración de la afinina. Las 2 fracciones y la afinina presentaron una disminución en el número de estiramientos. Sin embargo, con respecto a la Tabla 6 la afinina muestra un mayor efecto antinociceptivo, ya que su efecto farmacológico se observa a menores dosis y presentó una

DE<sub>50</sub> menor que la de los extractos de *H. longipes*, así mismo, se observa una menor toxicidad con respecto a la fracción A (Ogura *et al.*, 1982).

**Tabla 6.** Evaluación antinociceptiva de los extractos de *H. longipes* y la afinina en la prueba de estiramiento abdominal con ácido acético (Ogura *et al.*, 1982)

Fracción	Dosis (mg/kg)	Número de animales	Promedio del número de estiramientos o contracciones	% de inhibición	Significancia estadística	DE <sub>50</sub> (mg/kg)
A	1	5	41.8	2.0	No	19.04
	2	5	40.2	5.7	Si	
	5	5	27.8	34.9	Si	
	10	5	24.6	42.3	Si	
	25	5	21.2	50.3	Si	
	50	*				
10% etanol		5	42.7			
B	50	5	39.4	16.3	Si	426.98
	75	5	34.4	26.8	Si	
	100	5	32.0	36.9	Si	
	200	5	30.7	34.5	Si	
	400	5	23.3	50.5	Si	
Agua		5	47			
Afinina	2.5	5	39.4	12.1	No	6.98
	5.0	5	30.6	31.7	Si	
	7.5	5	21.8	51.3	Si	
	10.0	5**	14.3	68.0	Si	
10% etanol		5	44.8			

\*3 animales (60%) murieron después de la administración del extracto, los restantes no fueron utilizados debido a la severa depresión que presentaron.

\*\* 2 animales (40%) murieron después de la administración de la afinina.

Estudios recientes han demostrado la actividad farmacológica de la interacción entre el EEHL y el diclofenaco, un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (Acosta-Madrid *et al.*, 2009). El objetivo principal de este estudio fue determinar la posible interacción farmacológica entre el EEHL y el diclofenaco en un modelo de hiperalgesia térmica en el ratón. Todos los tratamientos mostraron un efecto dosis-dependiente. Los datos sugieren que a bajas dosis en la combinación del diclofenaco-EEHL pueden interactuar de manera sinérgica a nivel sistémico y que esta asociación puede representar una ventaja terapéutica para el tratamiento clínico del dolor inflamatorio (Acosta-Madrid *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha informado que el EHL y la afinina tienen la capacidad de aumentar la liberación de GABA, de acuerdo a estudios realizados en cerebro de rata *in vitro*. Una solución de 10 µg/mL de extracto de diclorometano de esta planta mostró actividad analgésica determinada por medio de la liberación de GABA en rebanadas del cerebro de ratones. La afinina fue el único compuesto activo que provocó la liberación de GABA, por lo que los autores sugieren que la actividad analgésica del extracto crudo está asociada a la afinina (Ríos *et al.*, 2007).

Muy recientemente se ha evaluado el efecto antiinflamatorio del EHL, la afinina y la N-isobutil decanamida. El efecto antiinflamatorio fue evaluado en la oreja del ratón, por la administración de dos agentes irritantes, el ácido araquidónico (AA) y el forbol miristato acetato (FMA). *H. longipes*, la afinina y la N-isobutil decanamida mostraron un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis en el modelo de AA. La nimesulida (1 mg/oreja) fue utilizada como fármaco de referencia, ver Tabla 7.

**Tabla 7.** Efecto del extracto de *H. longipes*, afinina y la N-isobutil decanamida en la prueba de inducción de edema (ácido araquidónico) en la oreja del ratón (Hernández *et al.*, 2009)

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Extracto de <i>H. longipes</i>	Afinina	N-isobutil decanamida
		% de inhibición de edema		
Ácido araquidónico	1.0	-	-	-
EHL, AF, IBD	0.5	37	29.5	31.1
	1.0	46.2	46.8	62.1
	2.0	62.9	72.6	81.4
	3.0	91.3	72.4	79.3
	Nimesulida	1.0	66.7	66.7
DE <sub>50</sub> (mg/oreja)		0.8	1.2	0.9

EHL= Extracto de *H. longipes*, AF= Afinina, IBD= N-isobutil decanamida. Cada grupo estuvo formado de 7-10 animales.

En el modelo de FMA, el extracto y las dos N-isobutilamidas (afinina y N-isobutil decanamida), también mostraron una relación dosis-dependiente en el efecto antiinflamatorio. La indometacina



(3 mg/oreja) fue utilizada como fármaco de referencia (Hernández *et al.*, 2009). Los resultados de esta prueba se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Efecto del extracto de *H. longipes*, afinina y la N-isobutil decanamida en la prueba de inducción de edema (forbol miristato acetato) en la oreja del ratón (Hernández *et al.*, 2009)

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Extracto de <i>H. longipes</i>	Afinina	N-isobutil decanamida
		% de inhibición de edema		
Forbol miristato acetato	0.002	-	-	-
EHL,AF, IBD	0.5	2.8	13.9	4.9
	1.0	39.8	28.4	20.7
	2.0	79.9	34.8	59.8
	3.0	80.3	72.4	82.9
Indometacina	3.0	98.6	98.6	98.6
DE <sub>50</sub> (mg/oreja)		2.0	13	11

EHL= Extracto de *H. longipes*, AF= Afinina, IBD= N-isobutil decanamida. Cada grupo estuvo formado de 7-10 animales.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante las dos últimas décadas, el tratamiento farmacológico con fármacos psicoactivos y analgésicos ha sido cada vez más reconocido como eficaz en el tratamiento de la ansiedad, los trastornos del sueño, el dolor y los convulsivos. Sin embargo, el uso prolongado de tranquilizantes, psicofármacos o analgésicos conduce a una variedad de efectos secundarios graves. Por otra parte, tanto los trastornos de ansiedad y los convulsivos constituyen los problemas psiquiátricos y neurológicos de mayor prevalencia en nuestro medio, siendo también el dolor la causa más común de estrés psíquico y fisiológico y el motivo más frecuente para buscar atención médica. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas dentro de las cuales podrían incluirse a los principios activos derivados de las plantas medicinales, ya que estos han demostrado una mejor eficacia y menor toxicidad que los fármacos sintéticos.

En este sentido, las alcanidas son un grupo de metabolitos secundarios de gran interés actual a las cuales se le han atribuido diversas actividades biológicas. La afinina, una alcanida olefínica aislada de la planta mexicana *H. longipes* ha sido utilizada en la medicina tradicional como analgésico, a pesar de su uso existen muy pocos estudios farmacológicos que avalen este efecto terapéutico. Por otro lado, se desconoce si presenta otras actividades en el SNC, como ansiolítico, sedante-hipnótico o anticonvulsivo, los cuales de demostrarse podrían representar una nueva alternativa farmacológica para el tratamiento de los trastornos de ansiedad, los trastornos del sueño y/o los convulsivos. Por lo anterior, fue indispensable la realización de un determinado número de pruebas que permitieron establecer el perfil neurofarmacológico, a través de las cuales pudo ser definido un primer perfil farmacológico con la finalidad de determinar nuevas aplicaciones en el SNC, que ayuden a mejorar la calidad de vida del ser humano. Así, este trabajo tuvo como objetivo realizar un perfil neurofarmacológico de la afinina, aislada de *H. longipes*, ya que esto fue de utilidad para determinar el potencial terapéutico de éste compuesto, además la información generada de este proyecto servirá para corroborar, documentar y establecer de manera preliminar el uso farmacológico de la afinina.

#### IV. HIPÓTESIS

La afinina es un compuesto que actúa en el SNC, por lo que presentará efecto sobre la conducta exploratoria, actividad ansiolítica, sedante-hipnótica, antinociceptiva y anticonvulsiva.

#### V. OBJETIVO

##### 5.1 Objetivo general

Evaluar el perfil neurofarmacológico de la afinina, alcalamida aislada de *H. longipes* mediante: la determinación del efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica, la actividad sedante-hipnótica, la antinociceptiva y la anticonvulsiva en animales de experimentación.

##### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la afinina sobre la conducta exploratoria administrada por vía intraperitoneal en las pruebas de campo abierto y del tablero perforado en ratones.
- Determinar la actividad ansiolítica de la afinina administrada por vía intraperitoneal en las pruebas del cilindro de exploración y del laberinto en cruz elevado en ratones.
- Determinar la actividad sedante-hipnótica de la afinina administrada por vía intraperitoneal en la prueba de inducción de la hipnosis por pentobarbital sódico en ratones.
- Determinar la actividad anticonvulsiva de la afinina administrada por vía intraperitoneal en la prueba de inducción de convulsiones por pentilentetrazol en ratones.
- Determinar la actividad antinociceptiva de la afinina administrada por vía subcutánea en la prueba de la formalina en ratas.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Aislamiento y caracterización de afinina

La muestra de afinina fue aislada y caracterizada por la Dra. María Yolanda Ríos y Dra. A. Berenice Aguilar-Guadarrama en el Instituto de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Las muestras fueron proporcionadas constantemente de marzo a julio del 2009. Inmediatamente de que fue aislado el compuesto, éste fue evaluado farmacológicamente.

Para la obtención de la afinina se realizó un extracto con hojas frescas de *H. longipes* (4.725 kg) con acetona a temperatura ambiente (3x24 L, cada 48 h), el cual se concentró a vacío hasta sequedad con un rendimiento de (76.5 g de extracto). Este extracto se fraccionó por cromatografía abierta (silica gel, 100-230) utilizando el siguiente gradiente de concentración hexano-acetona (100:0-40:60); se colectaron 124 fracciones de 250 mL cada una, la presencia de afinina fue monitoreada por cromatografía en capa fina utilizando una referencia de la sustancia pura ( $R_f=0.33$ , hexano-acetona 80:20). Se reunieron varios grupos de fracciones de los cuales se purificaron 14.09 de afinina por cromatografía en columna (silica gel 230-400, eluyente hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  70-30. velocidad de flujo 2 mL/min) como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Fracciones reunidas y cantidad obtenida de afinina por cromatografía en columna

Fracciones reunidas	Cantidad reunida de las fracciones (g)	Cantidad obtenida de afinina en la cromatografía (g)*
17-29	2.39	1.97 (2.58%)
30-73	9.34	7.34 (9.59%)
74-107	5.55	4.78 (6.25%)

Total= 14.09 g

\* % con respecto al peso del extracto.

La estructura de la afinina fue establecida con base a sus espectros de Infrarrojo, Ultravioleta, Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, de Carbono 13 y espectro de masas. Los datos experimentales se compararon con los datos previamente documentados (Correa *et al.*, 1971). La pureza de la afinina fue de 96.15 %, establecida por su análisis gases-masas.

## 6.2. Material biológico

Se utilizaron ratones macho de la cepa *ICR* (25-30 g) y ratas *Wistar* macho (200-220 g), los cuales se mantuvieron en ciclos de 12 h luz/oscuridad a una temperatura de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , los animales recibieron agua y comida a libre demanda. Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de 5 días antes de la realización de los experimentos y fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Todos los experimentos se realizaron en un horario de 12:00-17:00 h, los animales se utilizaron sólo una vez y se sacrificaron después de cada evaluación.

Los grupos de animales para la evaluación del efecto sobre conducta exploratoria, actividad ansiolítica y actividad sedante-hipnótica estuvieron formados por ocho animales por tratamiento, mientras que para la evaluación del efecto antinociceptivo y anticonvulsionante los grupos estuvieron conformados por seis animales por cada tratamiento.

## 6.3. Fármacos y reactivos

El PTZ se adquirió de Biomedicals INC., el diazepam de Roche y el pentobarbital sódico (PB) de Pfizer, mientras que el formol se adquirió de J.T. Baker. Los fármacos fueron preparados el día de los experimentos. La afinina y el diazepam se disolvieron en carboximetilcelulosa al 1% (CMC) disuelta en agua inyectable, el pentilentetrazol y el PB se disolvieron en solución salina isotónica al 0.9%. El formol fue utilizado en solución al 1% en agua inyectable.

Los animales control recibieron el vehículo (CMC al 1%) y el fármaco de referencia utilizado para la evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica, sedante-hipnótica y anticonvulsiva fue el diazepam (1 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.). Las pruebas mencionadas se realizaron de forma consecutiva con el mismo ratón.

El volumen administrado tanto del vehículo, los fármacos y la afinina para la evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica, sedante-hipnótica y anticonvulsiónante fue de 0.1 mL/10 g de peso del ratón (i.p.), mientras que para la evaluación de la actividad antinociceptiva fue de 50  $\mu$ L, en la superficie dorsal de la pata derecha (Ipsilateral, IL) de la rata o de la pata izquierda (Contralateral, CL), según el grupo tratado.

### **6.4. Determinación de las dosis de afinina**

Inicialmente, se determinaron las dosis a administrar de afinina para la evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica y la sedante-hipnótica, para lo cual se realizaron 3 grupos conformados por 3 animales cada uno. El primer grupo fue administrado con una dosis baja de afinina (10 mg/kg, i.p), el segundo con una dosis media (45 mg/kg, i.p) y el tercero con una dosis elevada (85 mg/kg). A la dosis baja no se observó ningún tipo de efecto sobre la conducta exploratoria y a la dosis de 85 mg/kg se presentó la muerte de los ratones. Las dosis en las que se esperaba observar el efecto terapéutico fueron de 30-75 mg/kg. Para la determinación de la actividad antinociceptiva (en la prueba de la formalina) inicialmente se evaluaron 4 grupos de 6 animales cada uno. Al primer grupo se le administró la dosis de 0.1 mg/pata, al segundo 1 mg/pata, al tercero 2 mg/pata y al último 3 mg/pata. La afinina mostró efecto terapéutico a bajas dosis 0.1-2 mg/pata y a dosis mayores de 2 mg/pata se observó efecto nociceptivo. Por lo anterior, se utilizaron dosis logarítmicas de afinina (0.1-1.7 mg/pata). En la determinación de la actividad anticonvulsiva inicialmente se evaluaron 2 grupos de 3 animales, a los cuales se les administró la dosis de 75 mg/kg y de 55 mg/kg (i.p), respectivamente. En ambos grupos, todos los animales murieron después de la administración del PTZ, por lo que las dosis de afinina fueron de 7.5-45mg/kg, i.p.

## 6.5. Evaluaciones neurofarmacológicas

### 6.5.1 Evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria

#### 6.5.1.1. Modelo de campo abierto

Los ratones fueron administrados con afinina (30-75 mg/kg, i.p.). Quince min después se realizó la prueba colocando al ratón en el centro de una caja dividida en 9 plazas (4 cm x 5 cm), ver Fig. 4. El número de plazas exploradas por cada ratón se registró como conducta exploratoria en un intervalo de 2 min (González-Trujano *et al.*, 2006), ver Diagrama 1. Se consideró como conducta exploratoria que el ratón tuviera al menos la cabeza en otra plaza.



**Figura 4.** Modelo de campo abierto para determinar el efecto sobre la conducta exploratoria en ratones.

#### 6.5.1.2. Modelo del tablero perforado

Los ratones antes mencionados fueron colocados individualmente en el centro de un tablero perforado (con 9 orificios de 2 cm de diámetro ubicados de manera equidistante), ver Fig. 5. El número de inclinaciones de la cabeza (head dipping) dentro de los orificios del tablero perforado fue registrado durante 3 min (Clark *et al.*, 1997), ver Diagrama 1. Se consideró como conducta exploratoria que el ratón inclinará la cabeza dentro de los orificios hasta el nivel de las orejas.

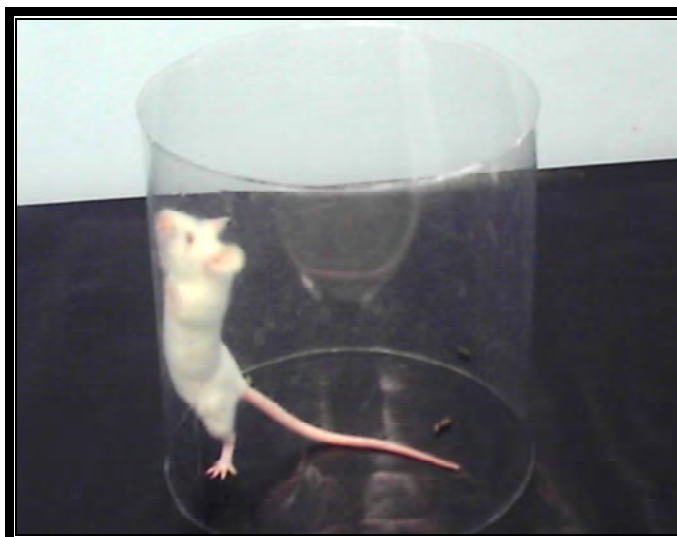


**Figura 5.** Modelo del tablero perforado para determinar el efecto sobre la conducta exploratoria en ratones.

## 6.5.2. Evaluación de la actividad ansiolítica

### 6.5.2.1. Modelo del cilindro de exploración

Cada ratón se colocó individualmente en un cilindro de acrílico (16 cm de altura y un diámetro de 11 cm), como se muestra en la Fig. 6 y se registró el número de levantamientos sobre sus patas traseras, que realizó el animal en un periodo de 5 min (Hiller y Zetler, 1996), ver Diagrama 1.



**Figura 6.** Modelo del cilindro de exploración para determinar la actividad ansiolítica en ratones.



### 6.5.2.2. Modelo del laberinto en cruz elevado

Los ratones fueron colocados en el centro de la plataforma, mirando hacia un extremo abierto, su comportamiento se observó durante 5 min y se registró el tiempo de permanencia del animal en las zonas abiertas, ver Fig. 7 (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007). Se consideró que el animal se encontraba dentro de la zona abierta siempre que sus cuatro patas se encontrarán en dicha zona, ver Diagrama 1.



**Figura 7.** Modelo del laberinto en cruz elevado para determinar la actividad ansiolítica en ratones.

### 6.5.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica

Inmediatamente después de las pruebas anteriores se administró PB (40 mg/kg, i.p.) y se registró la latencia para la pérdida de coordinación motora (fase sedante), la pérdida del reflejo (hipnosis) y la duración de la hipnosis (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007), ver Diagrama 1.

#### **6.5.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva en la prueba de la formalina**

La temperatura en el laboratorio se mantuvo constante de 25-27°C. Para disminuir las condiciones de estrés en los animales, las ratas requirieron de un periodo de ambientación en el laboratorio de 60 min antes del inicio de los experimentos, para lo cual se colocaron individualmente en cilindros de acrílico de 30 cm de diámetro, situando espejos detrás de estos para facilitar la observación, ver Fig. 8.

Una vez transcurrido el periodo de ambientación, la rata fue removida para la inyección subcutánea de afinina (0.1-1.7 mg/pata, 50 µL) en la región dorsal de la pata inferior IL y fueron devueltas a la cámara de observación. 15 min después las ratas fueron inyectadas con 50 µL de formalina al 1% en la superficie dorsal de la pata IL e inmediatamente se cuantificó el comportamiento nociceptivo mediante el número de sacudidas de la pata inyectada durante un min en periodos de 5 min durante 60 min. La conducta nociceptiva en este modelo es bifásica. La primera fase se presenta inmediatamente después de la administración de la formalina y termina aproximadamente al min 10, la fase tardía comienza a partir de los 20-25 min (Wheeler-Aceto y Cowan, 1995), ver Diagrama 2. Sólo las sacudidas rápidas y de corta duración de la pata administrada se definieron como una conducta adecuada de nocicepción. En este modelo la disminución en el número de sacudidas se interpretó como efecto antinociceptivo.

Con la finalidad de evaluar si el efecto antinociceptivo de la afinina fue debido a una acción local en el sitio inflamado o a una acción sistémica se emplearon dos grupos, en los que se administró subcutáneamente el vehículo y la afinina (1.7 mg/pata) respectivamente, en la región dorsal de la pata CL, 15 min después se administró la formalina en la pata IL. En cada procedimiento experimental se utilizaron seis animales por grupo.

Los animales control recibieron el vehículo (CMC 1%). En la prueba de la formalina se construyeron curvas del número de sacudidas/min en función del tiempo. Los datos se presentan como el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales del número de sacudidas/min. El ABC

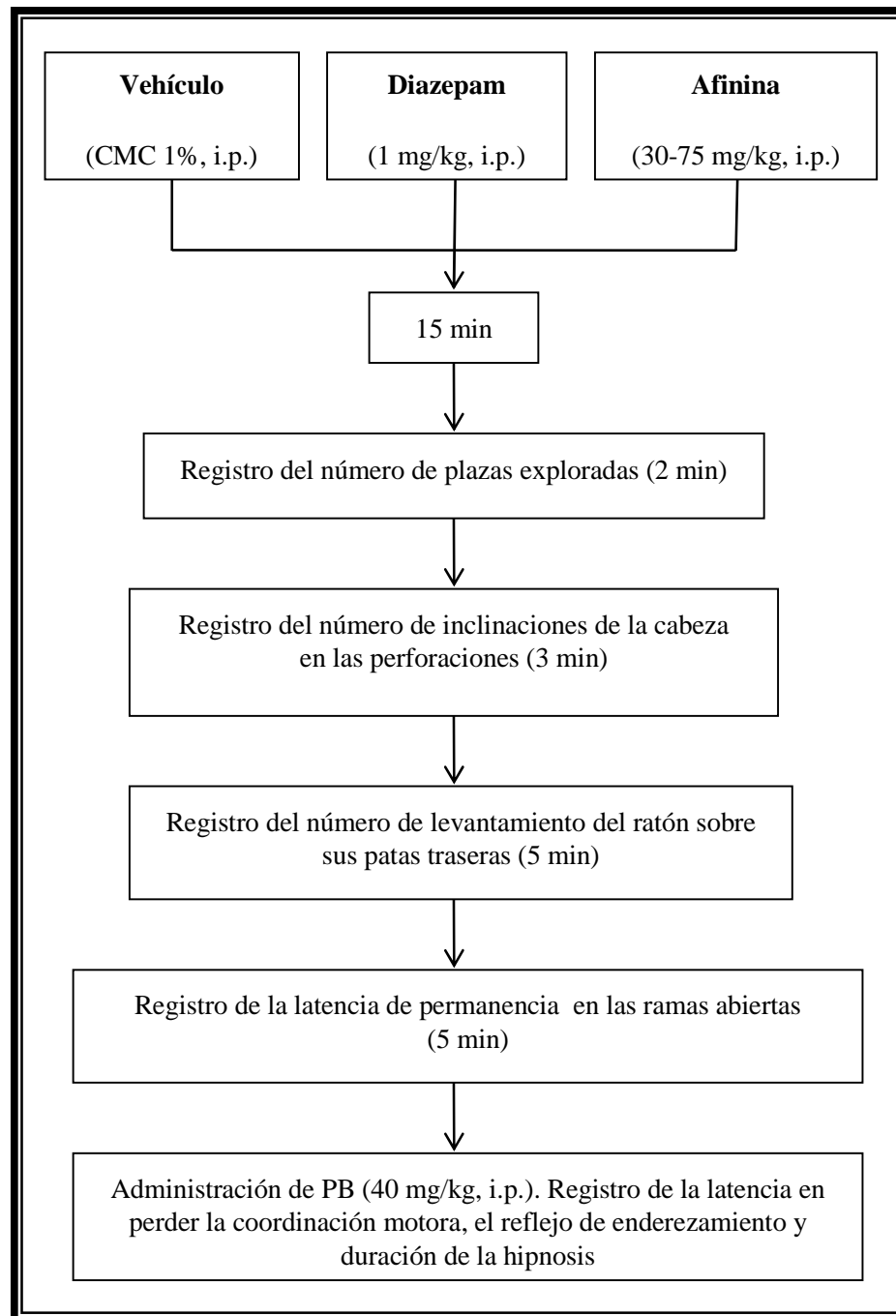
se determinó por el método de los trapecios y representa el efecto antinociceptivo de las sustancias administradas.



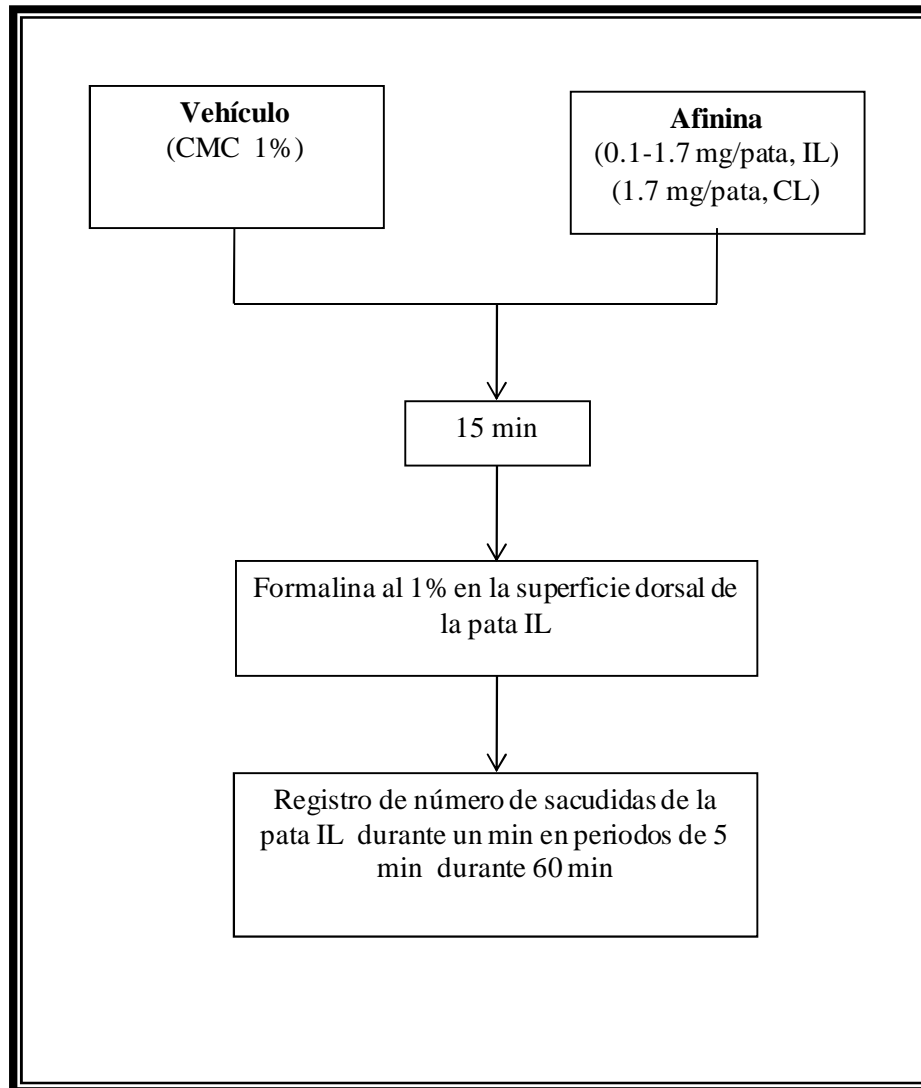
**Figura 8.** Forma de ambientación de las ratas en la prueba de la formalina.

#### **6.5.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva**

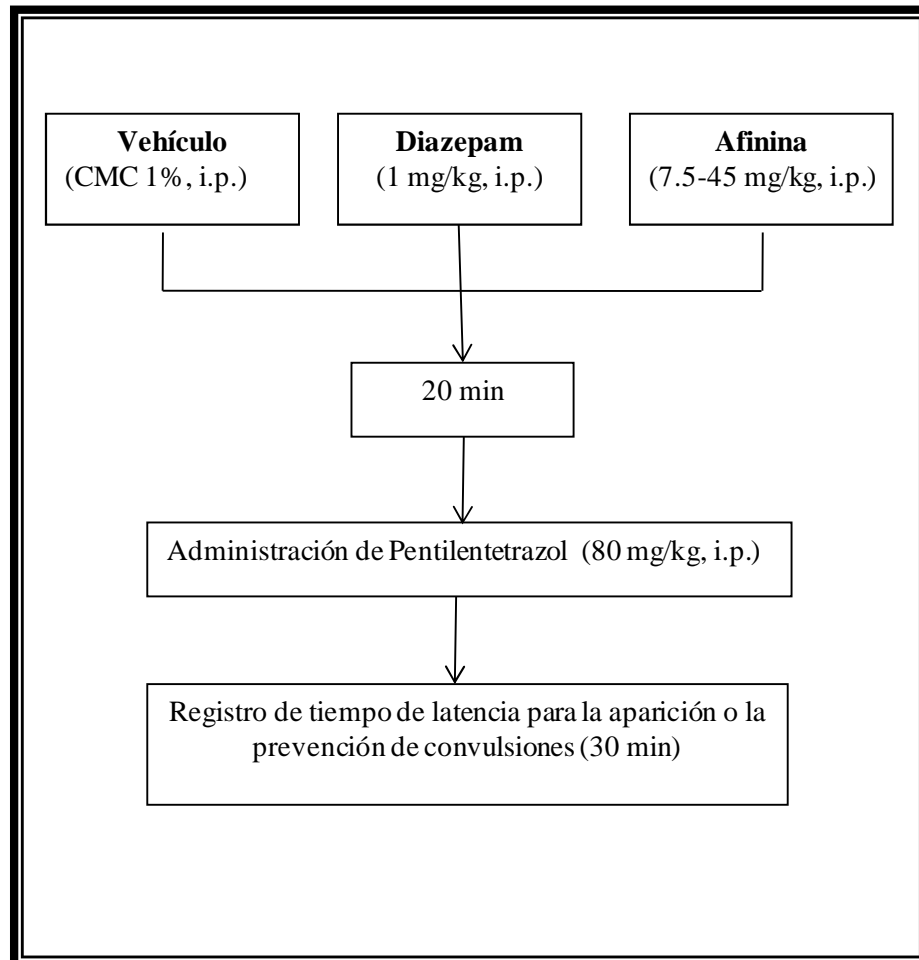
El PTZ se utilizó para inducir convulsiones tónicas y clónicas. Una dosis de PTZ (80 mg/kg, i.p.) se administró 20 min después de la administración de afinina (7.5-45 mg/kg, i.p.). Se registró el tiempo de latencia para la aparición de convulsiones tónicas y clónicas, así como el número de muertes que se presentaron en cada grupo, durante 30 min después de la inyección de PTZ (Martínez *et al.*, 2006), ver Diagrama 3.



**Diagrama 1.** Procedimiento general para determinar el efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica y la sedante-hipnótica en ratones. Cada grupo estuvo formado por ocho animales.



**Diagrama 2.** Procedimiento general para la evaluación de la actividad antinociceptiva en la prueba de la formalina en ratas. Cada grupo estuvo formado por seis animales.



**Diagrama 3.** Procedimiento general para la evaluación de la actividad anticonvulsiva en ratones. Cada grupo estuvo formado por seis animales.

### **6.5.6. Análisis estadístico**

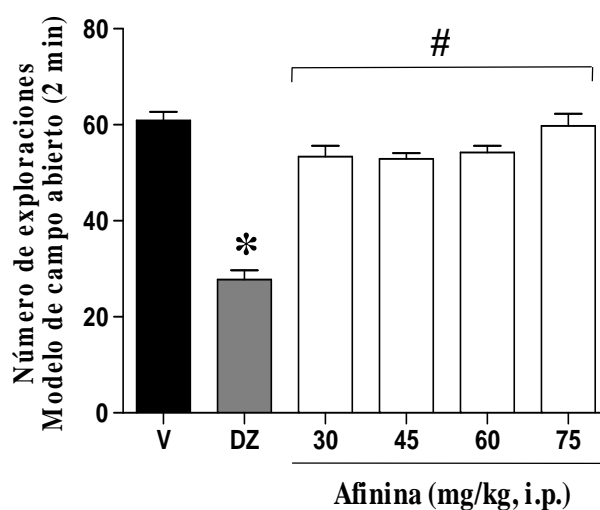
Todos los datos obtenidos se expresan como el promedio de 6-8 animales por grupo  $\pm$  el error estándar medio (E.E.M.). Para determinar diferencias estadísticas significativas se utilizó un análisis de varianza (ANOVA, una vía), seguido por una prueba de comparaciones múltiples (post-hoc) de Tukey, utilizando un criterio de significancia estadística de  $p \leq 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria

#### 7.1.1. Modelo de campo abierto

La afinina aislada de *H. longipes* no produjo cambios significativos sobre la conducta exploratoria en ninguna de las dosis evaluadas en el modelo de campo abierto. En la Gráfica 1 se muestra el comportamiento en el número de plazas exploradas en un grupo de ocho ratones en un periodo de 2 min. En la gráfica se observa que el número de plazas exploradas no fue modificada por la administración a dosis crecientes de afinina (30-75 mg/kg, i.p.), 15 min antes de la evaluación. Sin embargo, se observó un pequeño aumento en el número de plazas en la dosis más alta (75 mg/kg, i.p.) sin diferencia significativa con respecto al vehículo. Todas las dosis administradas fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al diazepam (1 mg/kg, i.p.), el cual fue evaluado como fármaco de referencia.



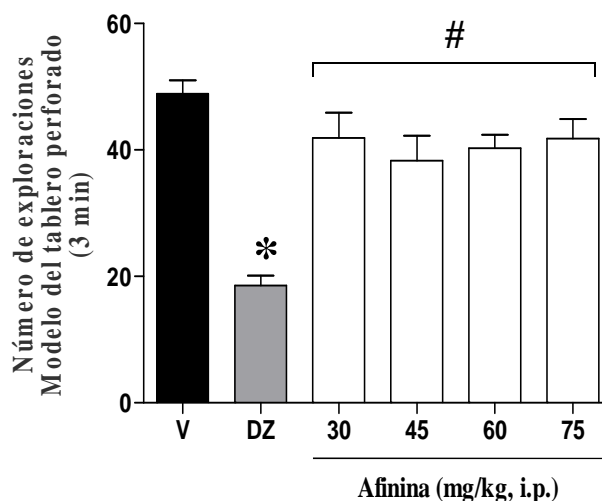
**Gráfica 1.** Número de plazas exploradas por los ratones *ICR* después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo de campo abierto en un periodo de 3 min. Cada barra representa el promedio de ocho animales  $\pm$  E.E.M.

\*estadísticamente significativo con respecto al vehículo, # estadísticamente significativo con respecto al DZ.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).



### 7.1.2. Modelo del tablero perforado

En el modelo del tablero perforado se cuantificó el número de inclinaciones de la cabeza del ratón en las perforaciones del tablero durante 3 min. La administración de afinina (30-75 mg/kg, i.p.) no produjo una respuesta significativamente diferente a la del vehículo. La dosis en la que se presentaron mayor número de exploraciones fue en la dosis de 75 mg/kg. Todas las dosis administradas son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al diazepam (1 mg/kg, i.p.), el cual mostró una disminución en el número de exploración con respecto al grupo control.



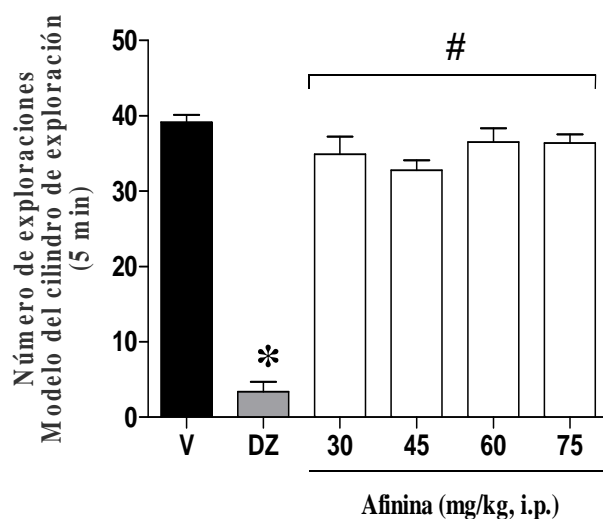
**Gráfica 2.** Número exploraciones por los ratones *ICR* después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo del tablero perforado en un periodo de 2 min. Cada barra representa el promedio de ocho animales  $\pm$  E.E.M.

\*estadísticamente significativo con respecto al vehículo, # estadísticamente significativo con respecto al DZ.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).

## 7.2. Evaluación de la actividad ansiolítica

### 7.2.1. Modelo del cilindro de exploración

El número de levantamientos sobre las patas traseras del ratón en el cilindro de exploración, ver Gráfica 3, fue evaluado durante 5 min. En dicha prueba la afinina no mostró efecto ansiolítico en ninguna de las dosis evaluadas (30-75 mg/kg, i.p.). Se observó un aumento en el número de exploraciones en las dosis de 60 y 75 mg/kg. Por el contrario, el diazepam (1 mg/kg, i.p.) mostró un decremento significativamente diferente con respecto al vehículo. El efecto de la administración de la afinina es significativamente diferente con respecto al diazepam ( $\#p \leq 0.05$ ).

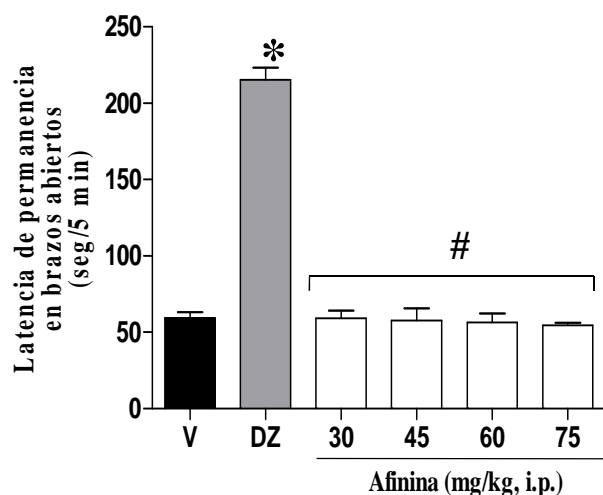


**Gráfica 3.** Número de exploraciones verticales por los ratones *ICR* después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo del cilindro de exploración en un periodo de 5 min. Cada barra representa el promedio de ocho animales  $\pm$  E.E.M.

\*estadísticamente significativo con respecto al vehículo, # estadísticamente significativo con respecto al DZ.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).

### 7.2.2. Modelo del laberinto en cruz elevado

En la Gráfica 4 se representa el efecto de la administración de afinina (30-75 mg/kg, i.p.) sobre la latencia de permanencia en brazos abiertos en el modelo de laberinto en cruz elevado, durante 5 min. La administración de afinina (30-75 mg/kg, i.p.) no provocó un aumento en la latencia de permanencia en los brazos abiertos, ya que los valores obtenidos para tales grupos son similares a los valores del grupo control. La administración de diazepam (1 mg/kg, i.p.) ocasionó un aumento del periodo de latencia en los brazos abiertos, el cual resultó significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al vehículo.

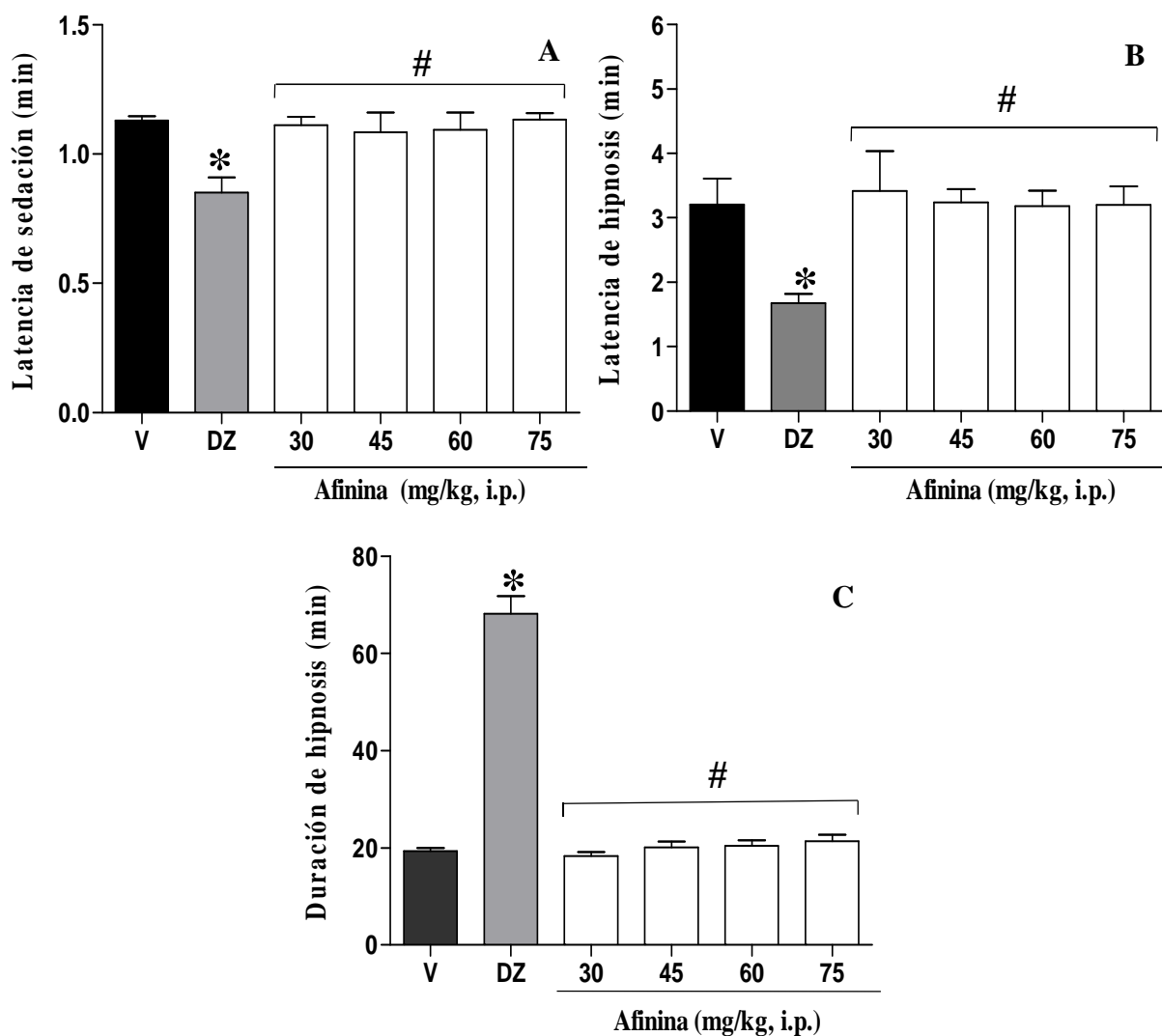


**Gráfica 4.** Tiempo de permanencia en los brazos abiertos por los ratones *ICR* después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.) en el modelo del laberinto en cruz elevado en un periodo de 2 min. Cada barra representa el promedio de ocho animales  $\pm$  E.E.M.

\*estadísticamente significativo con respecto al vehículo, # estadísticamente significativo con respecto al DZ.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).

### 7.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica

La Gráfica 5 representa el efecto de la administración de la afinina (30-75 mg/pata) sobre la inducción de la sedación-hipnosis por la administración de PB (40 mg/kg, i.p.). En el panel A referente a la latencia de sedación se muestra un efecto constante sobre la respuesta, en el panel B tiende a disminuir la latencia de hipnosis y en el panel C se observó una tendencia a aumentar la duración de la hipnosis. El comportamiento de la afinina no fue significativamente diferente con respecto al vehículo. El diazepam en el panel A mostró una disminución en la latencia de sedación, en el panel B mostró una disminución en la latencia de hipnosis y en el panel C, se observó un aumento en la duración de la hipnosis.

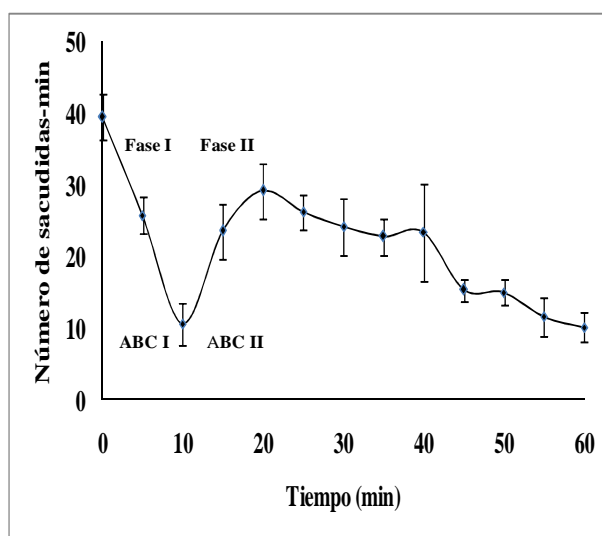


**Gráfica 5.** Efecto sobre la latencia de sedación (PANEL A), latencia de hipnosis (PANEL B) y duración de la hipnosis (PANEL C) después de la administración del vehículo (V, CMC 1%), diazepam (DZ, 1 mg/kg, i.p.) y afinina (30-75 mg/kg, i.p.), en la prueba de sedación-hipnosis, después de la administración de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.). Cada barra representa el promedio de ocho animales  $\pm$  E.E.M. \*estadísticamente significativo con respecto al vehículo, # estadísticamente significativo con respecto al DZ.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).

## 7.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva

### 7.4.1. Conducta nociceptiva inducida por formalina

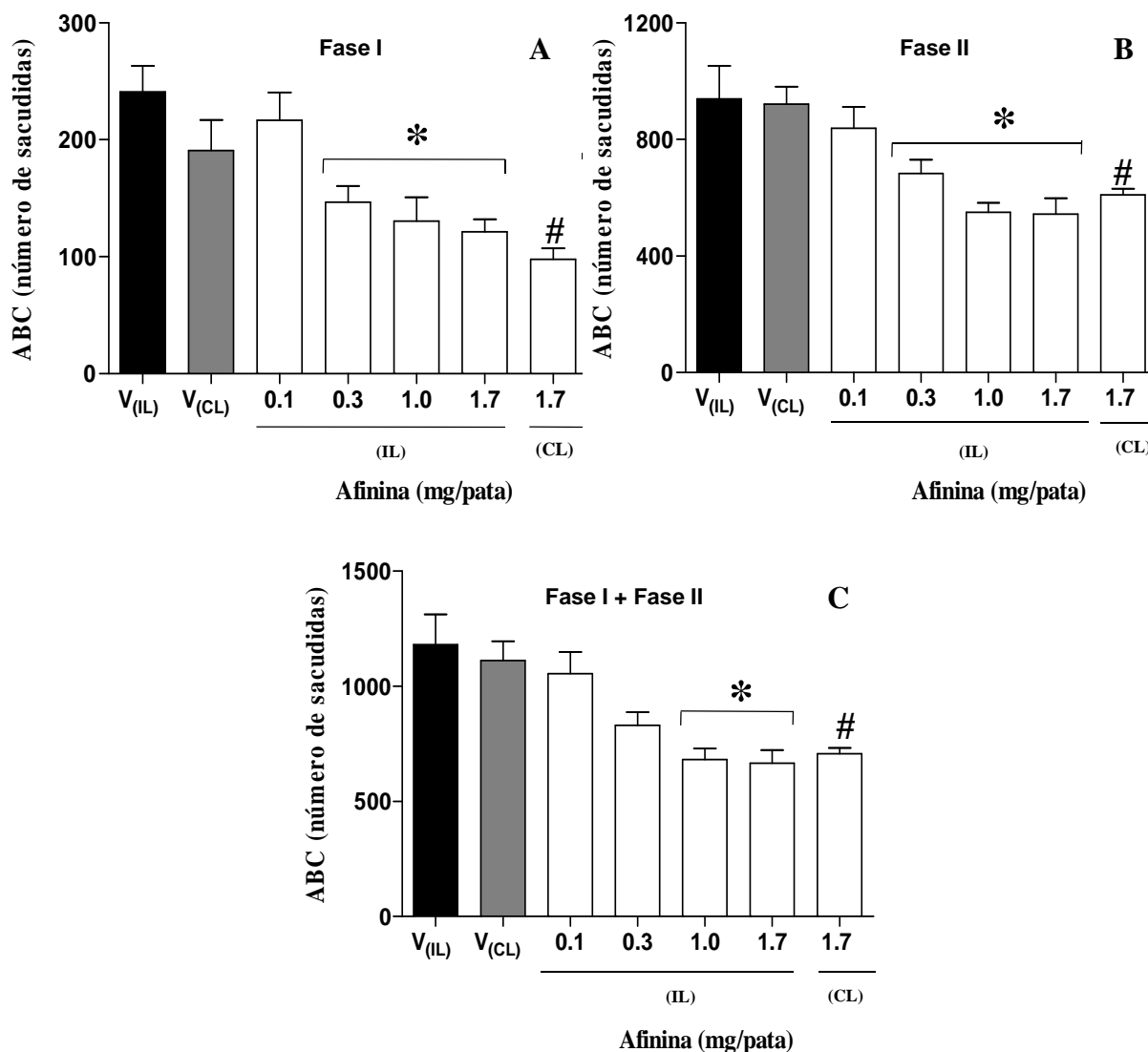
En la prueba de la formalina, la inyección subcutánea de formalina al 1% en la pata de la rata produjo la conducta nociceptiva típica de sacudida caracterizada por el retiro breve y rápido de la pata inyectada. El número de sacudidas se graficó en función del tiempo, ver Gráfica 6. En esta gráfica se observó un comportamiento bifásico característico de este modelo. La primera fase se presentó inmediatamente después de la administración de la sustancia algésica y terminó en el min 10, la segunda fase se observó a partir de los 10 min y se caracterizó por un incremento gradual en el número de sacudidas, observándose un efecto máximo de nocicepción a los 20 min, conforme el tiempo transcurrió, la conducta nociceptiva fue disminuyendo.



**Gráfica 6.** Efecto nociceptivo por la administración de la sustancia algésica en la prueba de la formalina en ratas, en un grupo administrado con el vehículo (CMC 1%).

#### 7.4.2. Efecto de la afinina en la prueba de la formalina

La Gráfica 7 muestra el efecto de la administración de afinina (0.1-1.7 mg/pata) sobre la conducta nociceptiva inducida por la formalina (1%). En cada uno de los paneles se observa una disminución del ABC del número de sacudidas, lo cual representa el efecto antinociceptivo del compuesto. Para conocer si la conducta antinociceptiva que ejerció la afinina fue debido a una acción local en el sitio inflamado o a una acción sistémica se evaluó un grupo (con su respectivo grupo control) en el que se administró la dosis más alta de afinina (1.7 mg/pata) en la pata CL y 15 min después la formalina en la pata IL. En los paneles A y B se muestra el ABC del número de sacudidas en la Fase I y II respectivamente. En ambos paneles (A y B) se presentó efecto antinociceptivo dependiente de la dosis. La diferencia significativa ( $*p \leq 0.05$ ) con respecto al vehículo IL fue a partir de la dosis de 0.3 mg/pata. El panel C representa el ABC del número de sacudidas de las Fases I y II. Las diferencias significativas se presentaron en las dosis de 1 y 1.7 mg/pata. En ninguno de los paneles se encontraron diferencias significativas entre los grupos  $V_{IL}/V_{CL}$  y la dosis 1.7 mg/pata administración IL y la dosis 1.7 mg/pata administración CL.



**Gráfica 7.** Efecto antinociceptivo de la afinina (0.1-1.7 mg/pata) en la prueba de la formalina en ratas. Cada barra representa el ABC en la fase I (panel A), en la fase II (panel B) y de ambas fases (panel C), como un promedio de seis animales  $\pm$  E.E.M, evaluado durante 60 min. \*estadísticamente significativo con respecto al vehículo IL, # estadísticamente significativo con respecto al vehículo CL.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).

V<sub>(IL)</sub>, vehículo (CMC 1%), administración ipsilateral  
V<sub>(CL)</sub>, vehículo (CMC 1%), administración contralateral



### 7.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva

La administración de PTZ (80 mg/kg, i.p.) produjo convulsiones tónicas y clónicas, las cuales se presentaron en el 100% de los ratones tratados con vehículo. Después de la administración de afinina (7.5-45 mg/kg, i.p.) se presentó un efecto proconvulsionante dependiente de la dosis, en todos los grupos. No fue afectada la latencia para la presencia de convulsiones clónicas a medida que aumentó la dosis. Sin embargo, el tiempo en el que se presentaron las convulsiones tónicas disminuyó en las dosis de 7.5 y 30 mg/kg. Por otro lado, la mortalidad también mostró un efecto dosis-dependiente al administrarse la afinina. El diazepam (1 mg/kg, i.p.) presentó un efecto preventivo sobre las convulsiones clónicas y tónicas, así como para la mortalidad.

**Tabla 10.** Efecto anticonvulsivo después de la administración de afinina (7.5-45 mg/kg, i.p.) y el diazepam (1 mg/kg, i.p.) sobre la aparición de convulsiones clónicas y tónicas en la prueba inducción de convulsiones con pentilentetrazol (80 mg/kg, i.p.). Cada grupo estuvo formado por seis animales.

Grupo	Dosis (mg/kg, i.p.)	Latencia (min)		Mortalidad
		Clónicas	Tónicas	
Vehículo	—	0.8±0.2	6.2±1.3	7/7
Afinina	7.5	1.1±0.2	4.0±1.6*	2/7
	15	1.1±0.3	5.5±1.4	2/7
	30	1.1±0.2	3.1±0.8*	4/7*
	45	1.4±0.7	6.3±1.3	6/7*
Diazepam	1.0	30±0.0*	30±0.0*	0/7*

\*estadísticamente significativo con respecto al vehículo.  $p \leq 0.05$ , ANOVA (1 vía) seguida de post-hoc (Tukey).

## VIII. DISCUSIÓN

El uso de las plantas medicinales y/o sus principios activos han representado una alternativa terapéutica en México. En este caso *H. longipes* de la cual se ha aislado el principal compuesto bioactivo, la afinina, ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades como anestésico y analgésico principalmente (Correa *et al.*, 1971). Sin embargo, existen muy pocos estudios farmacológicos *in vivo* que avalen su actividad como analgésico y por otra parte, es completamente desconocida otra actividad en el SNC, para lo cual fue necesario realizar las pruebas de un perfil neurofarmacológico, dentro del cual fue posible evaluar el efecto de la afinina sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica, la sedante-hipnótica, la antinociceptiva y la anticonvulsiva.

### 8.1. Evaluación del efecto sobre la conducta exploratoria

En el modelo de campo abierto se considera que el número de cuadrados avanzados es una medida de la conducta exploratoria, por lo que la disminución de esta variable indica un efecto de tipo ansiolítico y sedante (Viola *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos indican que el número de cuadrados avanzados por los ratones tratados con afinina (30-75 mg/kg, i.p.) no fueron modificados con respecto al grupo control. Por otra parte, en el modelo del tablero perforado se mide básicamente la curiosidad del animal. Se considera que la curiosidad es un acto instintivo, pero al enfrentarse a una situación novedosa pueden originar 2 tipos de respuesta: aproximación hacia el estímulo o bien producir una anulación de éste. Se utiliza como indicativo del estado de ansiedad o depresión del animal al evaluar el comportamiento de los psicofármacos sobre el SNC (CYTED, 1998). En el modelo del tablero perforado la afinina no ocasionó diferencias en el número de exploraciones entre los grupos en estudio (30-75 mg/kg, i.p) con respecto al grupo control. Los resultados de ambos modelos sugieren que la afinina (administración sistémica) es un compuesto que no posee efecto depresor en el SNC.

Los resultados anteriores no corresponden a los reportados por Ogura *et al.* (1989), quien documentó que la administración oral de afinina (10 mg/kg) produjo en el 40 % de los animales una supresión de la actividad motora que duró aproximadamente 40 min después de la administración de la afinina. Lo anterior podría deberse a las diferencias en la vía de administración, las dosis, el peso, la edad, el género y la cepa de los ratones utilizados en los ensayos. Por otro lado la administración de una sustancia ansiolítica como el diazepam en animales de experimentación provoca a bajas dosis (0.1 mg/kg) un efecto ansiolítico, es decir un aumento en la conducta exploratoria y a altas dosis (1 mg/kg) se observa un efecto depresor (disminución de la conducta exploratoria, sedante) (Takeda *et al.*, 1998). La administración de diazepam (1 mg/kg, i.p) produjo la disminución del número de exploraciones (modelo de campo abierto y tablero perforado), lo cual corresponde a lo documentado por González-Trujano *et al.* (2006).

## 8.2. Evaluación de la actividad ansiolítica

Los modelos animales de ansiedad son pruebas en las que se evalúa la actividad motriz y la conducta de exploración, dichas pruebas son utilizadas para evaluar fármacos psicotrópicos. Se basan en la hipótesis de que los roedores por naturaleza exploran nuevos lugares y por consiguiente les producen ansiedad, lo cual depende de lo novedoso de la situación. Los fármacos que son capaces de reducir estos mecanismos aumentan los niveles exploradores y reducen la ansiedad (Alcocer, 2009). En el modelo del cilindro de exploración se determina el grado de ansiedad y de exploración del animal. La disminución de la actividad en este modelo, indica un efecto de tipo ansiolítico del fármaco administrado (Hiller y Zetler, 1996). Mientras tanto en el modelo del laberinto en cruz elevado el aumento de tiempo de permanencia en los brazos abiertos, es un parámetro indicativo de la disminución de la ansiedad por parte de los ratones (Ruarte y Álvarez, 1999).

En esta investigación la administración de afinina (30-75 mg/kg, i.p.) no produjo cambios en el número de levantamientos sobre las patas traseras del ratón (cilindro de exploración), ni en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado, ya que al estar

sometidos a ese medio en el cual no había tenido experiencia previa, manifiestan ansiedad (Lister, 1990). Los resultados obtenidos de ambos modelos permiten suponer que la afinina es un compuesto que no posee capacidad ansiolítica, ni inhibitoria en el SNC, ya que la administración de un ansiolítico disminuiría considerablemente los parámetros antes mencionados.

La afinina mostró un comportamiento diferente al diazepam en los modelos del cilindro de exploración y el laberinto en cruz elevado. El diazepam pertenece al grupo de las benzodiazepinas con efecto ansiolítico, sedante-hipnótico y anticonvulsivo (Mrugnandam *et al.*, 2000), el cual actúa aumentando el nivel de actividad inhibitoria al acoplarse a un sitio específico en el receptor GABA<sub>A</sub> provocando un aumento en el flujo de iones Cl<sup>-</sup> (Stephenson, 1988). Los fármacos ansiolíticos incrementan el comportamiento exploratorio y la actividad locomotora, pero en dosis más altas causa sedación del aparato locomotor (Belzung y Berton, 1997).

### **8.3. Evaluación de la actividad sedante-hipnótica**

En los resultados la administración (30-75 mg/kg, i.p.) de afinina no modificó la latencia de sedación, la de hipnosis, ni la duración de la hipnosis, con respecto al vehículo, después de la administración de PB (40 mg/kg, i.p.). Lo anterior sugiere que la afinina no presenta actividad depresiva en el SNC, ya que la administración de un sedante-hipnótico (diazepam) disminuye la latencia de sedación y de hipnosis y aumenta la duración de la hipnosis. Hasta este momento no existen estudios farmacológicos que demuestren que la afinina o alguna otra alcalamida puedan actuar o no a nivel del SNC, por lo que se desconocen los mecanismos de acción farmacológicos en el SNC de este tipo de compuestos. El efecto de la afinina difiere de lo observado con el diazepam, el cual disminuye la latencia de sedación y de hipnosis y aumenta la duración de la hipnosis al actuar sobre los receptores GABA<sub>A</sub>. La participación de los receptores GABA<sub>A</sub> en la ansiedad, los trastornos del sueño y la epilepsia ha sido ampliamente estudiada y confirmada (Nemeroff, 2003). El receptor GABA<sub>A</sub> es una proteína de la membrana compuesta de cinco subunidades, cuyo canal de iones conduce a la inhibición en el SNC. Es conocido que el pentobarbital implica la activación de los receptores de GABA<sub>A</sub>. Sin embargo, se ha informado

que la prolongación del tiempo de sueño inducido por este barbitúrico puede ser debido a una inhibición enzimática en el metabolismo hepático (Gyamfi *et al.*, 2000). Por lo tanto, una inhibición sináptica, en particular, no necesariamente resulta en la depresión de las funciones complejas del SNC. La acción fisiológica de GABA se puede observar, por ejemplo, en el inicio del sueño. GABA en las neuronas del tálamo empieza a inhibir el flujo de señales o continuar de otro modo para llegar a la corteza cerebral, como es el caso durante la vigilia (Mehta y Ticku, 1999).

#### **8.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva**

En la prueba de la formalina se observó una respuesta bifásica, la primera fase (dolor agudo) comenzó inmediatamente después de la administración de la formalina y se debe a la estimulación directa de los nociceptores, mientras que la última fase (crónica o tardía) que inició a partir de los 10 min posteriores a la administración de la formalina, se debe directamente a una respuesta inflamatoria subsiguiente y/o de los cambios producidos en el SNC (Dubuisson y Dennis, 1977). Los resultados obtenidos en la prueba de la formalina indican que la administración subcutánea de la afinina (0.1-1.7 mg/pata) provoca un efecto antinociceptivo a nivel periférico, debido a que se observó una disminución del número de sacudidas (ABC) de forma dependiente de la dosis en la fase I, en la cual se ha documentado que la formalina genera irritación y liberación de mediadores inflamatorios que actúan a nivel local (Tjølsen *et al.*, 1992). En la Fase II se observó una disminución del ABC del número de sacudidas, por lo que se sugiere que la afinina ejerce efecto antinociceptivo también a nivel central, ya que en esta segunda fase se mide el efecto inflamatorio debido a la liberación preferentemente de mediadores que contribuyen al proceso nociceptivo central (Tjølsen *et al.*, 1992). De acuerdo a Shibata *et al.* (1989b) en la prueba de la formalina la sustancia P y la bradicinina participan en la primera fase, mientras que la histamina, serotonina, prostaglandinas y la bradicinina son liberados durante la segunda fase.

Los resultados anteriores indican que el posible mecanismo antinociceptivo es diferente al de los AINE's (analgésicos antiinflamatorios no esteroideos) (Acosta-Madrid, 2009), los cuales reducen

la nocicepción en la fase tardía, pero tienen poco o ningún efecto sobre la respuesta en la primera fase en la prueba de la formalina (Shibata *et al.*, 1989). Se ha sugerido que la afinina puede tener efectos antiinflamatorios similares al de la indometacina y superiores que los de nimesulida (modelo de inflamación en el oído provocado por ácido araquidónico), asociados a la acción inhibitoria de la alcamida sobre la ciclooxigenasa y la 5-lipooxigenasa. Estos resultados podrían representar una importante contribución para la comprensión de los efectos antiinflamatorios documentados por el uso de *H. longipes* y otras plantas medicinales utilizadas por las diferentes culturas (Hernández *et al.*, 2009).

Cabe señalar que al observarse efecto antinociceptivo de la afinina y para conocer si el compuesto tenía un efecto local en el sitio inflamado o a una acción sistémica se administró la afinina en la pata izquierda y la sustancia algésica en la derecha. Los resultados mostraron que la afinina tiene la propiedad de actuar a nivel del SNC, dicho efecto podría resultar de la liberación de GABA y la inhibición de la excitación excesiva de los circuitos nociceptivos en el tálamo y la corteza provocada por la lesión tisular (Millán, 2002).

### **8.5. Evaluación de la actividad anticonvulsiva**

Los modelos experimentales de epilepsia han sido fundamentales para demostrar la efectividad de los nuevos fármacos anticonvulsivos. De esta forma se considera que las crisis convulsivas en animales provocadas experimentalmente, pueden integrar un modelo válido de epilepsia cuando los anticonvulsivos que son efectivos para los animales de experimentación sean también efectivos para el ser humano (Hernández, 2000). La prueba más ampliamente utilizada en la selección de nuevos fármacos antiepilépticos es la de PTZ (Vlainić y Pericić, 2009). En esta determinación la afinina (7.5-45 mg/kg, i.p.) mostró un efecto proconvulsivo y mortalidad dosis-dependiente. Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Hernández (2000). Se sabe que las convulsiones ocasionadas por el PTZ se deben a la despolarización neuronal inducida por este fármaco, lo cual ocasiona la apertura de canales de  $Ca^{+2}$  tipo T, en particular en

el tálamo anterior, generando las sacudidas tan particulares de las crisis de ausencia (Ramanjaneyulu y Ticku, 1984).

El mecanismo del PTZ por el que se cree que ejerce su acción es que actúa como un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (Vlainić y Pericić, 2009), de modo que la prueba es particularmente sensible a los medicamentos GABA<sub>miméticos</sub> (Meldrum, 1997). Por otro lado los estudios experimentales han demostrado que el deterioro del sistema GABA puede originar la presencia de convulsiones (Löscher y Schmidt, 1988). Sin embargo, en cuestión de la afinina no se tiene referencia sobre cuál es el mecanismo por el que ejerce actividad convulsiva. Estudios realizados sobre la actividad convulsiva de una N-isobutilamida denominada alfa-sanshool (N-isobutil-dodeca-2E,6Z,8E,10E-tetraenamida) con estructura similar a la de afinina, concluyeron que este tipo de compuestos ejercen un mecanismo de acción similar al del PTZ, presentando convulsiones tónico-clónicas y difiere considerablemente de las convulsiones provocadas por otros agentes convulsionantes (Hernández, 2000).

El diazepam (1 mg/kg, i.p.) utilizado como fármaco de referencia fue altamente eficaz contra las convulsiones tónicas y clónicas inducidas por la administración de PTZ (80 mg/kg, i.p.) tal como fue demostrado anteriormente por Gasior *et al.* (2000). El diazepam actúa como un modulador alostérico sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, aumentando la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup>, lo que produce la hiperpolarización de la membrana y disminuye la probabilidad de disparo del impulso eléctrico (Söderpalm, 2002). Por otro lado, se cree que el aumento en la estimulación de glutamato podría estar implicado en los mecanismos celulares subyacentes a la iniciación y propagación de crisis epilépticas y los procesos que conducen a la epileptogénesis (Löscher, 1998).

## IX. CONCLUSIONES

- La afinina (administrada i.p. en un rango de dosis de 30-75 mg/kg en ratón) no posee efecto depresor en el SNC, en las pruebas del efecto sobre la conducta exploratoria, la actividad ansiolítica y la sedante-hipnótica.
- La administración de afinina a nivel local (0.1-1.7 mg/pata) ejerció efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina en ratas *Wistar*, así mismo, se demostró que dicho compuesto posee actividad antinociceptiva sistémica.
- La afinina (7.5-45 mg/kg) presenta el inconveniente de ser un compuesto proconvulsivante a nivel sistémico, por lo cual su utilidad antinociceptiva sería a nivel local.



## X. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos se propone:

- Evaluar la actividad anestésica de la afinina, debido a que *H. longipes* es una especie medicinal que se utiliza tradicionalmente como anestésico.
- Realizar la caracterización de las propiedades convulsionantes de la afinina, evaluando el tipo de convulsiones que produce, el tiempo de latencia y la DE<sub>50</sub>, así como los mecanismos farmacológicos involucrados.
- Estudiar los posibles mecanismos de acción implicados en la actividad antinociceptiva de la afinina.
- Determinar si los isómeros de la afinina (obtenidos por síntesis química) tienen o no actividad antinociceptiva.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, F.V., Teng, J.C. (1998). The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain* **76**: 337-347.
- Acosta-Madrid, I.I., Castañeda-Hernández, G., Cilia-López, V.G., Cariño-Cortés, R., Pérez-Hernández, N., Fernández-Martínez, E., Ortíz, M.I. (2009). Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test. *Phyomedicine* **16** (4): 336-341.
- Acree, F.M., Jacobson, Haller, H.L. (1945). The structure of affinin, the insecticidal amide from *Erigeron affinis* D.C. *J Org Chem* **10**: 449-451.
- Aguirre-Hernández, E., Martínez, A.L, González-Trujano, M.E., Moreno, J., Vibrans, H., Soto-Hernández, M. (2007). Pharmacological evaluation of anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. mexicana in mice. *J Ethnopharmacol* **109**: 140-145.
- Alcocer, C.N., (2009). Evaluación del efecto ansiolítico de malatonina, por sus análogos (M1A, M2C, M3A) y buspirona por medio de interacciones farmacológicas con sus antagonistas. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo), UNAM, Facultad de Química. México, pág. 79.
- Amos, S., Abbah, J., Chindo, B., Edmond, I., Binda, L., Adzu, B., Buhari, S., Odutola, A.A., Wambebe, C., Gamaniel, K. (2005). Neuropharmacological effects of the aqueous extract of *Nauclea latifolia* root bark in rats and mice. *J Ethnopharmacol* **97**: 53-57.
- André, V., Pineau, N., Motte, J.E., Marescaux, C., Nehlig, A. (1998). Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* **10** (6): 2094-2106.
- Atack, J.R. (2005). The benzodiazepine binding site of GABA (A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics. *Expert Opin Investig Drugs* **14** (5): 601-618.

- Badillo, D.L, Espinosa, M.R., Martínez, M.R., Ron, E.O., Salgado-Garciglia, R., García, F.A., Raya, G.D., Martínez, P.M. (2008). The Mexican Medicinal Plants with Antifungal Properties are an Economic and Health Opportunity area. *Pharmacologyonline* **3**: 61-77.
- Barrett, J.E., DiMascio, A. (1966). Comparative effects on anxiety of the "minor tranquilizers" in "high" and "low" anxious student volunteers. *Dis Nerv Syst* **27** (7): 483-486.
- Belzung, C., Berton, F. (1997). Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety. *Behav Pharmacol* **8**: 541-548.
- Benjamin, J., Kennedy, J. (2005). Anxiety Disorders. *Encyclopedia of life Sciences* John Wiley & Sons 1-4.
- Bianchi, T.M., Botzolais, J.E., Lagrange, H.A., Macdonald, L.R. (2009). Benzodiazepine modulation of GABAA receptor opening frequency depends on activation context: A patch clamp and simulation study. *Epilepsy Res* **85**: 212-220.
- Bormann, J., Feigenspan, A. (1995). GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Neurosci* **18** (12): 515-519.
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Dhonnchadha, B.N., Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundament Clin Pharmacol* **21** (6): 567-574.
- Bremer, K. (1994). Asteraceae: cladistics & classification. Timber Press. Portland. 752.
- Butler, M.S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* **67** (12): 2141-2153.
- Calixto, J., Beirich, A., Ferreira J., Santos, A., Filho, V., Yunes, R. (2000). Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Best Prac Res Clin Anesthesiol* **21**: 31-49.

- Charney, D.S., Woods, S.W., Krystal, J.H., Nagy, L.M., Heninger, G.R. (1992). Noradrenergic neuronal dysregulation in panic disorder: the effects of intravenous yohimbine and clonidine in panic disorder patients. *Acta Psychiatr Scand* **86** (4): 273-282.
- Clark, G., Koster, A.G., Person, D.W. (1997). Exploratory behaviour in chronic disulfotan poisoning in mice. *Berl Psychopharmacol* **20**: 169-171.
- Correa, J., Roquet, S., Díaz, E. (1971). Multiple NMR analysis of the affinin. *Org Magn Reson* **3**: 1-5.
- Cossart, R., Bernard, C., Ben-Ari, Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* **28** (2): 108-15.
- CYTED. Ciencia y tecnología para el desarrollo. 1998. 1ª Reuniao do proyecto X-4. Obtenção de medicamentos innovadores com atividade anti-hipertensiva e vasodilatadora através de validação orientada de plantas medicinais Iberoamericanas. Recife, Brazil.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R. (2001). The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ Health Perspect* **109**: 69-75.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* **4** (2): 161-174.
- Elliot, M., Farnham, A.W., James, N.F., Johnson, D.M., Pulman, D.A. (1987). Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amide. Part I. Introductory survey and discovery of an active synthetic compound. *Pestic Sci* **1**: 191-201.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2001). Secretaria De Salud. 1ª Edición. México, D.F.
- Garakani, A., Mathew, S.J., Charney, S.D. (2006). Neurobiology of Anxiety Disorders and Implications for Treatment. *J Medic* **73** (7): 941-949.

- García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J. (2004). El Género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las Alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana* **69**: 115-131.
- Gasior, M., Jaszyna, M., Peters, J., Goldberg, S.R. (2000). Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J Pharmacol Exp Ther* **295** (3): 1101-1111.
- Gómez, C., Saldivar-González, J.A., Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud mental* **25**: 14-25.
- González-Darder, J.M. (2000). Animal pain models and ethical issues regarding animal experimentation. *Rev Soc Esp Dolor* **7**: 313-318.
- González-Trujano, M.E., Carrera, D., Ventura-Martínez, R., Cedillo-Portugal, E., Navarrete, A. (2006). Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *J Ethnopharmacol* **106**: 129-135.
- Granillo, J.R., Zanniello, G., Cristiano, A. (2002). Epilepsias. Modelos Experimentales. Epileptogénesis. *Arg Rev Neurol* **27**: 31-40.
- Grant, S.M., Heel, R.C. (1991). Vigabatrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in epilepsy and disorders of motor control. *Drugs* **41**: 889-926.
- Greger, H. (1984). Alkamides: structural relationships, distribution and biological activity. *Planta Med* **50** (5): 366-375.
- Gyamfi, M.A., Hokama, N., Oppong-Boachie, K., Aniya, Y. (2000). Inhibitory effects of the medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolizing enzymes of rats. *Hum Exp Toxicol* **19** (11): 623-631.

- Hernández, I., Márquez, L., Martínez, I., Dieguez, R., Delporte, C., Prieto, S. (2009). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. *J Ethnopharmacol* **124** (3): 649-652.
- Hernández, M.M. (2000). Estudio de las propiedades convulsionantes de alfa-sanshool en ratón albino. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México.
- Hiller, K., Zetler, G. (1996). Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* behavioral and anticonvulsant properties. *Phytother Res* **10**:145-151.
- IASP. (1986). Pain terms a current list with definitions and notes on usage. *Pain* **3**: S215-S221.
- Jacobson, M. (1954). Constituents of *Heliopsis* species. III. cis-trans Isomerism in affinin. *J Am Chem Soc* **76**: 4606-4608.
- Jacobson, M. (1971). The insaturated isobutilamides. In Naturally Occurring insecticides. Jacobson, M., and D.G Crosby (eds). Marcel Dekker. New York. 137-173.
- Jones-Davis, D., Macdonald, L.R. (2003). GABA(A) receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus. *Curr Opin Pharmacol* **3**; 12-18.
- Koch, U., Magnusson, K.A. (2009). Unconventional GABA release: mechanisms and function. *Curr Opin Neurobiol* **19**:1-6
- Koek, W., Jackson, A., Colpaert, F.C. (1992). Behavioral pharmacology of antagonists at 5-HT<sub>2</sub>/5-HT<sub>1C</sub> receptors. *Neurosci Biobehav Rev Spring* **16**: 95-105.
- Little, E. (1948). El chilcuague (*Heliopsis longipes*). Planta insecticida. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **7**: 23-27.

- López-Bucio, J., Acevedo-Hernández, G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Herrera-Estrella, L. (2006). Novel signals for plant development. *Curr Opin Plant Biol* **9** (5): 523-529.
- Löscher, W. (1998). Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. *Prog Neurobiol* **54** (6): 721-741.
- Löscher, W., Schmidt, D. (1988). Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* **2** (3): 145-181.
- Luddens, H., Korpi, E. (1996). GABA A receptors: pharmacology, behavioral roles, and motor disorders. *Neuroscientist* **2**: 15.
- Martínez, A.L., Domínguez, F., Orozco, S., Chávez, M., Salgado, H., González, M., González-Trujano, M.E. (2006). Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia de albata* Zucc. leaves in mice. *J Ethnopharmacol* **106** (2): 250-255.
- Martínez, M. (1990). Las plantas medicinales de México. 6a ed. México: Editorial Botas: 113-1115.
- Mehta, A.K., Ticku, M.K. (1999). An update on GABAA receptors. *Brain Res Rev* **29**: 196-217.
- Meldrum, B.S. (1997). Identification and preclinical testing of novel antiepileptic compounds. *Epilepsia* **38** (9): S7-S15.
- Millan M.J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66** (6): 355-474.
- Möhler, H., Crestani, F., Rudolph, U. (2001). GABAA-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **1**: 22-25.
- Molina-Torres, J., García-Chávez, A. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva* **20**: 377-387.

- Molina-Torres, J., García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J Ethnopharmacol* **64** (3): 241-248.
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C.J, Armenta-Salinas, C., Ramírez-Chavéz, E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *J Agric Food Chem* **52** (15): 4700-4704.
- Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E., Del Río, R.E. (1995). Presence of the bornyl ester of deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *J Nat Prod* **50**: 1590-1591.
- Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramírez-Chávez, E., Del Río, R.E. (1996). Purely Olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem Syst Ecol* **24**: 43-47.
- Mongeau, R., Blier, P., Montigny, C. (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Rev* **23** (3): 145-195.
- Morales-López, M.E., Martínez-Muñoz, R.E., Ron-Echeverría, O., Rubio, M.N., Martínez-Pacheco, M.M., Salgado-Garciglia, R. (2007). Effect of bornyl-*O*-deca-2*E*,6*E*,8*E*-trienate on growth of several pathogens. *Pharmacologyonline* **3**: 96-103.
- Murillo-Rodríguez, E., Vázquez, E., Millán-Aldaco, D., Palomero-Rivero, M., Drucker-Colin, R. (2007). Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on the sleep-wake cycle, c-Fos expression and dopamine levels of the rat. *Eur J Pharmacol* **562** (1-2): 82-91.
- Muroi, Y., Theusch, C.M., Czajowski, C., Jackson, M.B. (2009). Distinct structural changes in the GABAA receptor elicited by pentobarbital and GABA. *J Biophys* **96** (2): 499-509.
- Mrugnandam, A.V., Kumar, V., Bhattacharya, S.K. (2000). Status report on neuropharmacology. *Indian J Pharmacol* **32**: S119-S133.



- Nemeroff, C.B. (2003). The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* **37** (4): 133-146.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* **17** (3), 215-234.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaria de Salud. México.
- Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* **62**: 12-15.
- Ogura, M., Cordell, G.A., Quinn, M.L., Leon, C., Benoit, P.S., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R. (1982). Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem—oral use of *Heliopsis longipes*—by means of a multidisciplinary approach. *J Ethnopharmacol* **5**: 215-219.
- Organización Mundial de la Salud (2002). Estrategias de la OMS sobre la medicina tradicional. 2002-2005.
- Osuna, T.L., Tapia, Pérez, M.E., Aguilar, C.A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Universitat: 173.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14** (3): 149-167.
- Pellow, S., File, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **24** (3): 525-529.
- Phillipson, J.D. (1999b). Radioligand-receptor binding assays in the search for bioactive principles from plants. *J Pharm Pharmacol* **51**: 493-503.

- Puig, S., Sorkin, L.S. (1996). Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers-systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* **64** (2): 345-355.
- Pushpam, K. (2004). Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Curr Sci* **86**: 930-937.
- Ramanjaneyulu, R., Ticku, M.K. (1984). Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor ionophore complex. *Eur J Pharmacol* **98**: 337-345.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* **34**: 207-215.
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. *Trends Pharmacol Sci* **29** (10): 493-498.
- Ríos, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B., Gutiérrez, M.C. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J Ethnopharmacol* **110** (2): 364-367.
- RIVAPLAMED, Rede iberoamericana de validação de plantas medicinais. 1996. I Curso Iberoamericano de Validação de Plantas Mediciniais com actividade Sedativa/Tranquilizante. 8-19 Julho, Universidad de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A. (1997a). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* **30** (3): 289-304.
- Rodríguez, A.E., Oliveira, K.R., Bosco, L.C., Matos, I.A. (2009). Anxiolytic and Anticonvulsant Effects on Mice of Flavonoids, Linalool, and  $\alpha$ -Tocopherol Presents in the Extract of Leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *J Biomed Biotechnol* 1-6.

- Romero, C.M., Del Castillo, A.R., Martínez, A.C., Calderón, C.J. (1989). Preliminary studies on the antibacterial, insecticidal and toxicological effects of the chilcuan root *Heliopsis longipes*. *Veterinaria* **20**: 151-156.
- Rosland, J.H. (1991). The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain* **45** (2): 211-216.
- Roth-Schechter, B.F., Ebel, C., Mallorga, P. (1983). Chronic pentobarbital diminishes GABA-and pentobarbital-enhanced [3H] diazepam binding to benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* **87**: 169-170.
- Ruarte, M.B., Alvarez, E.O. (1999). Behavioral profiles displayed by rats in an elevated asymmetric plus-maze: effects of diazepam. *Braz J Med Biol Res* **32**: 99-106.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Martín, J.R., Bluethmann, H., Möhler, H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid (A) receptor subtypes. *Nature* **401**: 796-800.
- Rudolph, U., Möhler, H. (2002). Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 475-498.
- Russek, J.S. (2006). g-Aminobutyric Acid (GABA) Receptors. *Encyclopedia of life science &*, John Wiley & Sons.
- Salgado-Garciglia, R., Molina-Torres, J., Joel, E., López-Meza, Loeza-Lara, P. (2008). Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, micorrización y nodulación del frijol. *Agrociencia* **42**: 679-686.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. (1989). Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* **38** (3): 347-352.

- Shillito, E.E. (1970). A method for investigating the effects of drugs on the exploratory behaviour of mice. *Br J Pharmacol* **40**: 113-116.
- Söderpalm, B. (2002). Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *Eur J pain* **6**: A3-A9.
- Stephenson, F.A. (1988). Understanding the GABAA receptor: a chemically gated ion channel. *J Biochem* **249**: 21-32.
- Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* **350**: 21-29.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**: 5-17.
- Tjurmina, O.A., Goldstein, D.S., Palkovits, M., Kopin, I.J. (1992). Alpha2-adrenoceptor-mediated restraint of norepinephrine synthesis, release, and turnover during immobilization in rats. *Brain Res* **826** (2): 243-252.
- Vlainić, J., Perićić, D. (2009). Effects of acute and repeated zolpidem treatment on pentylentetrazole-induced seizure threshold and on locomotor activity: Comparison with diazepam. *Neuropharmacol* **56** (8): 1124-1130.
- Viola, H., Wolfman, C., Levi de Stein, W.C., Peña, C., Medina, J.H., Paladini, A.C. (1994). Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *J Ethnopharmacol* **44**: 47-53.
- Velasco, M. (1993). *Farmacología*. México D.F; Ed. Interamericana Mc Graw Hill: 388-391.

## Perfil Neurofarmacológico de Afinina

---

- Yokoyama, F., Yamauchi, M., Oyama, M., Okuma, K., Onozawa, K., Nagayama, T., Shinei, R., Ishikawa, M., Sato, Y., Kakui, N. (2009). Anxiolytic-like profiles of histamine H3 receptor agonists in animal models of anxiety: a comparative study with antidepressants and benzodiazepine anxiolytic. *Berl Psychopharmacol* **205** (2): 177-187.
- Webster, R.A., Jordan, C.C. (1989). Neurotransmitters, Drugs and Disease. London: Blackwell Scientific **3**: 302-304.
- Wei, W.M., Hao, X., Chen, K. (2007). Biological screening of natural products and drug innovation in China. *Phil Trans R Soc B* **362**: 1093-1105.
- Wheeler-Aceto, H., Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Berl Psychopharmacol* **104**: 35-44.
- Williamson, M.E., Okpako, T.D., Evans, J.F. (1996). Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. New York: John Wiley & Sons:169-189.
- Wilson, S.G., Mogyl, J.S. (2001). Measuring pain in the (knockust) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res* **125**: 65-73.