



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEPRESOR DE  
EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIES DEL GÉNERO  
*ANNONA* EN MODELOS EXPERIMENTALES EN  
RATONES.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

ROBERTO SILVESTRE SOSA RODRÍGUEZ



México, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Rachel Mata Essayag.  
VOCAL: Profesor: Alejandro Ortiz Osornio.  
SECRETARIO: Profesora: María Eva González Trujano.  
1er. SUPLENTE: Profesora: Ruth Ivonne Téllez Ballesteros.  
2º SUPLENTE: Profesor: Héctor Isaac Rocha González.

El trabajo de investigación de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" y en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias.

---

Dra. María Eva González Trujano.

Asesor del tema.

---

Roberto Silvestre Sosa Rodríguez.

Sustentante.

## **DEDICATORIAS.**

### **A mis padres: Roberto Sosa y María de Lourdes Rodríguez.**

Porque gracias a su cariño, paciencia y apoyo incondicional he logrado completar la primera etapa de mi desarrollo profesional. Gracias Mamá y Papá, los amo, este trabajo es para ustedes.

### **A mi hermano: Diego Sosa.**

Por que se que en todo momento cuento con su apoyo incondicional y espero que alcance sus metas profesionales y personales.

### **A mis abuelos:**

#### **Abelardo Rodríguez y Elvia Suarez.**

Porque los recordamos con cariño y sabemos que en algún lugar nos están cuidando.

#### **Silvestre Sosa y Bertha Rodríguez.**

Por cada una de sus enseñanzas y el cariño que nos brindan.

### **A mis amigos: Adriana Valenzuela, Ismael Sánchez, Laura Gisela González, Janet Jazmín Quintana, Norma Beatriz Olguín, Julián Garduño, Francisco Alberto Huertas y Jorge Luis Cruz.**

Por brindarme su amistad y hacer más pleno mí desarrollo profesional.

## ***AGRADECIMIENTOS.***

### **A la Dra. María Eva González Trujano.**

Con admiración y respeto por ser un excelente ser humano, tanto profesionalmente como personalmente. Gracias por todo el apoyo y la confianza brindada.

### **A la Dra. Eva Aguirre Hernández y al Biól. Roberto Enrique Llanos Romero del laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias.**

Por el apoyo en el análisis cualitativo de los extractos mediante cromatografía en capa fina.

### **Al Q.F.B Julián Garduño González.**

Por el apoyo en los ensayos biológicos.

### **A cada uno de los integrantes del laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz".**

## ÍNDICE.

	Página.
Abreviaturas.	I
Índice de tablas.	III
Índice de figuras.	IV
Resumen.	VIII
1. Marco teórico.	1
1.1 Ansiedad.	2
1.1.1 Definición y naturaleza de la ansiedad.	2
1.1.2 Epidemiología de los trastornos de ansiedad.	2
1.1.2.1 Prevalencia de los trastornos de ansiedad en la población general.	2
1.1.2.2 Edad de inicio.	3
1.1.2.3 Comorbilidad.	4
1.1.3 Clasificación de los trastornos de ansiedad.	4
1.1.4 Mecanismos neuroquímicos en los trastornos de ansiedad.	5
1.1.4.1 El papel del GABA.	5
1.1.4.2 El papel de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico en los trastornos de ansiedad.	6
1.1.5 Fármacos ansiolíticos e hipnóticos.	7
1.1.5.1 Benzodiazepinas.	8
1.1.5.2 Buspirona.	9

1.1.5.3	Barbitúricos.	9
1.1.5.4	Otros fármacos utilizados como ansiolíticos.	10
1.1.6	Modelos animales de ansiedad.	10
1.1.6.1	Modelo del campo abierto.	10
1.1.6.2	Modelo del tablero con orificios.	11
1.1.6.3	Modelo de exploración en cilindro.	13
1.2	Epilepsia.	13
1.2.1	Epidemiología de los trastornos epilépticos.	13
1.2.2	Definición y etiología de las crisis epilépticas.	14
1.2.3	Clasificación de las crisis epilépticas.	14
1.2.3.1	Crisis parciales.	15
1.2.3.2	Crisis generalizadas.	15
1.2.4	Mecanismos neuroquímicos de la epilepsia.	17
1.2.4.1	Hipótesis gabaérgica.	17
1.2.4.2	Hipótesis glutamatérgica.	19
1.2.4.3	Catecolaminas.	20
1.2.4.4	Péptidos opioides.	20
1.2.5	Fármacos anticonvulsivos.	20
1.2.5.1	Mecanismos de acción de fármacos anticonvulsivos.	22
1.2.6	Modelo de inducción de convulsiones agudas con PTZ.	23
1.3	El género <i>Annona</i> .	25
1.3.1	Botánica.	26
1.3.2	Fitoquímica.	28

2	Planteamiento del problema.	29
3	Hipótesis.	30
4	Objetivos.	31
4.1	Objetivo general.	31
4.2	Objetivos particulares.	31
5	Materiales y métodos.	32
5.1	Materiales.	32
5.1.1	Equipo.	32
5.1.2	Fármacos y reactivos.	32
5.1.3	Material biológico.	33
5.1.4	Material vegetal.	33
5.2	Metodología.	34
5.2.1	Obtención del extracto.	34
5.2.2	Preparación del extracto y los fármacos.	34
5.2.3	Grupos experimentales.	34
5.2.4	Modelo del campo abierto.	35
5.2.5	Modelo del tablero con orificios.	36
5.2.6	Modelo de exploración en cilindro.	36
5.2.7	Potenciación de sueño inducido con pentobarbital sódico.	37
5.2.8	Modelo de inducción de convulsiones agudas clónico-tónicas con PTZ.	38
5.2.9	Análisis cualitativo de los extractos acuosos mediante cromatografía en capa fina.	39



5.2.10	Análisis estadístico.	39
6.	Resultados.	41
6.1	Actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de las anonas.	41
6.1.1	<i>Annona reticulata.</i>	41
6.1.2	<i>Annona cherimolia.</i>	41
6.1.3	<i>Annona purpurea.</i>	44
6.1.4	<i>Annona diversifolia.</i>	45
6.1.5	Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del flavonoide rutina.	46
6.2	Potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico en presencia de los extractos acuosos de las anonas.	48
6.2.1	<i>Annona reticulata.</i>	48
6.2.2	<i>Annona cherimolia.</i>	50
6.2.3	<i>Annona purpurea.</i>	51
6.2.4	<i>Annona diversifolia.</i>	51
6.2.5	Evaluación del efecto del flavonoide rutina en la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico.	53
6.3	Evaluación de la actividad anticonvulsiva de extractos acuosos de especies del género <i>Annona.</i>	55
6.3.1	<i>Annona reticulata.</i>	55
6.3.2	<i>Annona cherimolia.</i>	56
6.3.3	<i>Annona purpurea.</i>	58
6.3.4	<i>Annona diversifolia.</i>	59

6.3.5	Evaluación de la actividad anticonvulsiva del fármaco de referencia etosuximida.	61
6.3.6	Evaluación de la actividad anticonvulsiva del flavonoide rutina.	61
6.4	Presencia de componentes de naturaleza flavonoide en los extractos acuosos de especies del género <i>Annona</i> .	62
7.	Discusión.	66
8.	Conclusión.	72
9.	Perspectivas.	73
10.	Bibliografía.	74
	Apéndice A.	85

## ABREVIATURAS.

$\alpha$	Alfa.
B	Beta.
$\Gamma$	Gama.
K	Kappa.
$\mu$	Mu.
5-HT	5-hidroxi-triptamina.
ANADEVA	Análisis de varianza.
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico.
$Ca^{2+}$	Ión calcio.
CCF	Cromatografía en capa fina.
$Cl^{-}$	Ión cloruro.
Cm	Centímetro.
EEG	Electroencefalograma.
EEM	Error estándar de la media.
G	Gramo.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
GAD	Decarboxilasa del ácido glutámico (siglas en inglés).
GLU	Glutamato.
ILAE	International League Against Epilepsy.
i.p.	Administración intraperitoneal.
$K^{+}$	Ión potasio.
Kg	Kilogramo.
M	Metro.

Mg	Miligramo.
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol.
Min	Minuto.
mL	Mililitro.
Mm	Milímetro.
$Na^+$	Ión sodio.
NPR	Natural product reagent.
NMDA	N-metil-D-aspartato.
PTZ	Pentilentetrazol.
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero (siglás en inglés).
SW	Swiss Webster.

## ÍNDICE DE TABLAS.

		Página.
Tabla 1	Tasas de comorbilidad en personas que han experimentado un trastorno de ansiedad en algún momento de su vida.	4
Tabla 2	Propiedades de las benzodiazepinas.	8
Tabla 3	Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos.	21
Tabla 4	Relación entre mecanismos de epileptogénesis y mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos.	22
Tabla 5	Rendimiento obtenido para cada uno de los extractos.	34
Tabla 6	Valores de $R_f$ correspondientes a la placa mostrada en la figura 25.	62
Tabla 7	Valores de $R_f$ correspondientes al máximo valor de % A.	64

## ÍNDICE DE FIGURAS.

		Página
Figura 1	Clasificación de las crisis epilépticas de acuerdo con la "Commission on Classification and Terminology of International League against Epilepsy", 1981, 1989.	16
Figura 2	Crisis epilépticas inducidas en un ratón administrado con 85 mg/Kg de PTZ vía i.p.	24
Figura 3	Hojas y fruto de la <i>Annona purpurea</i> , la <i>A. reticulata</i> , la <i>A. cherimolia</i> y la <i>A. diversifolia</i> .	27
Figura 4	Modelo del campo abierto.	35
Figura 5	Modelo del tablero con orificios.	36
Figura 6	Modelo de exploración en cilindro.	36
Figura 7	Prueba de potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico.	37
Figura 8	Crisis generalizada y tónica inducidas con PTZ.	38
Figura 9	Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la <i>A. reticulata</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	41
Figura 10	Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la <i>A. cherimolia</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	42

Figura 11	Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la <i>A. purpurea</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	43
Figura 12	Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la <i>A. diversifolia</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	45
Figura 13	Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del flavonoide rutina (20, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control.	46
Figura 14	Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la <i>A. reticulata</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	48
Figura 15	Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la <i>A. cherimolia</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	49
Figura 16	Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la <i>A. purpurea</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	51
Figura 17	Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la <i>A. diversifolia</i> (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control.	52

Figura 18	Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico del flavonoide rutina (20, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control.	53
Figura 19	Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la <i>A. reticulata</i> (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.).	54
Figura 20	Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la <i>A. cherimolia</i> (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.).	56
Figura 21	Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la <i>A. purpurea</i> (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.).	58
Figura 22	Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la <i>A. diversifolia</i> (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.).	59
Figura 23	Evaluación de la actividad anticonvulsiva del fármaco de referencia etosuximida (3, 10, 30, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.).	60



Figura 24	Evaluación de la actividad anticonvulsiva del flavonoide rutina (30, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.).	61
Figura 25	Cromatografía en capa fina de extractos acuosos de especies del género <i>Annona</i> obtenidos por infusión y por decocción.	62
Figura 26	Intensidad de la absorción a una longitud de onda de 200 nm de extractos acuosos de especies del género <i>Annona</i> observados en CCF.	63

# **EVALUACIÓN DEL EFECTO DEPRESOR DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *ANNONA* EN MODELOS EXPERIMENTALES EN RATONES.**

## **RESUMEN.**

En el presente estudio se describe el efecto depresor sobre el sistema nervioso central (SNC) de extractos acuosos de especies del género *Annona*, los cuales fueron obtenidos mediante procesos de infusión y decocción. Los modelos del campo abierto, tablero con orificios y de exploración en cilindro se utilizaron para evaluar el efecto ansiolítico y/o sedante de dichos extractos; así como el modelo de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico y el modelo de inducción de convulsiones agudas con pentilentetrazol (PTZ) para evaluar su efecto como depresor y la actividad anticonvulsiva, respectivamente. Lo anterior con la finalidad de acreditar mediante la investigación básica las propiedades terapéuticas como depresores del SNC atribuidas a los extractos acuosos de las especies *Annona reticulata*, *A. cherimolia*, *A. purpurea* y *A. diversifolia*. Para la evaluación del efecto ansiolítico y/o sedante y de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico se utilizaron ratones machos Taconic (25-35 g), mientras que para la evaluación de la actividad anticonvulsiva se utilizaron ratones hembras Taconic (SW) (25-35 g). La evaluación en el modelo del campo abierto, del tablero con orificios y de exploración en cilindro se realizó  $60 \pm 2$  min después de la administración de los extractos acuosos (30, 100, 300 mg/Kg, i.p.,  $n \geq 6$ ), del fármaco de referencia buspirona (10 mg/Kg, i.p.,  $n \geq 6$ ) o del flavonoide rutina (20, 100 y 300 mg/Kg, i.p.,  $n \geq 6$ ). El efecto ansiolítico y/o sedante se manifestó por una disminución en el número de rectángulos explorados, de orificios explorados o de levantamientos realizados para el modelo del campo abierto, del tablero con orificios y de exploración en cilindro, respectivamente. Después

de las pruebas antes mencionadas, los ratones fueron administrados con 42 mg/Kg i.p. del sedante-hipnótico pentobarbital sódico. Una disminución significativa en la latencia de sedación y de hipnosis, o el aumento significativo en la duración de la hipnosis fueron indicativos de actividad depresora y potenciación del efecto central de otro depresor. Sesenta min después de la administración de los extractos acuosos (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg, i.p.,  $n \geq 6$ ), del fármaco de referencia etosuximida (3, 10, 30, 100 y 300 mg/Kg, i.p.,  $n \geq 6$ ) o del flavonoide rutina (30, 100 y 300 mg/Kg, i.p.,  $n \geq 6$ ) se indujeron las crisis convulsivas con una dosis de 80 mg/Kg vía i.p. del agente convulsivante PTZ. La respuesta anticonvulsiva se demostró por un incremento significativo en la latencia a la primer mioclonía, a la primera crisis generalizada (clónico-tónica) y a la crisis tónica.

Tanto la infusión como la decocción de cada uno de los extractos evaluados produjeron, desde la dosis de 30 mg/Kg, una disminución significativa en las diferentes conductas de exploración respecto al control sugiriendo que dichos extractos producen un efecto ansiolítico-sedante. Por otra parte, los extractos mostraron un aumento significativo en el sueño inducido con pentobarbital sódico, el cual en la mayoría de los casos también fue significativo a partir de dicha dosis. El fármaco de referencia buspirona (10 mg/kg) y el flavonoide rutina (300 mg/Kg) produjeron efecto ansiolítico y sedante, así como potenciador del sueño de manera significativa con respecto al control en los respectivos ensayos biológicos.

Cada uno de los extractos produjo aumento significativo con respecto al grupo control en la latencia a las diferentes conductas de crisis convulsivas. En general las dosis de 100 y 300 mg/Kg fueron las más eficaces, tanto en infusiones como en decocciones, mientras que en la mayoría de los casos, en la dosis de 1000 mg/Kg se presentaron reducciones en el retardo de las latencias, lo cual puede ser asociado a efectos de inespecificidad producidos con el incremento de la dosis. La etosuximida y la rutina produjeron sus

efectos de manera dosis-dependiente y significativa con respecto al control en la dosis de 300 mg/kg.

Con el fin de averiguar sobre la naturaleza de los compuestos presentes en los diferentes extractos acuosos de las 4 anonas se realizó un análisis cualitativo mediante cromatografía en capa fina y en presencia de reveladores específicos para alcaloides y flavonoides. Las placas reveladas con la solución del reactivo 2'-aminoetildifenilborato al 1% metanol (NPR), el cual forma complejos coloreados con compuestos de naturaleza fenólica como los flavonoides fue positiva, donde el  $R_f$  de una de las manchas obtenidas con los diferentes extractos fue similar al del flavonoide de referencia rutina sugiriendo su presencia en los extractos acuosos de las 4 especies del género *Annona* preparadas como infusión y decocción en este proyecto.

### 1. MARCO TEÓRICO.

Psiquiatría y salud mental son términos que con frecuencia se emplean para referirse a un conjunto de actividades para atender los desórdenes del sistema nervioso central (SNC). La psiquiatría es una especialidad médica a la que se atribuye la responsabilidad de atender los trastornos mentales, en tanto que el término "salud mental" tiene una acepción mucho más amplia, y se refiere a una condición peculiar de bienestar y desarrollo de las potencialidades individuales y colectivas. La atención psiquiátrica consiste entonces en el conjunto de principios científicos, métodos, tendencias y recursos para contender con las llamadas enfermedades mentales, aceptadas como tales por la Organización Mundial de la Salud (Benassini, 2001).

La Décima Revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE - 10, Organización Mundial de la Salud, 1992) contiene en su capítulo V, dedicado a los "Trastornos Mentales y del Comportamiento". Estos trastornos producen en quienes los padecen diversos grados de discapacidad, y el déficit adaptativo consecutivo en uno o más ámbitos de su actividad y de su desarrollo, el evidente malestar subjetivo y el deterioro de su calidad de vida, influyen notablemente en la forma en que perciben su estado de salud (Benassini, 2001).

Es necesario aclarar que México dispone de muy poca información epidemiológica. Durante la realización de la primera Encuesta Nacional de Adicciones (1988) se llevó a cabo la Encuesta Nacional de Salud Mental en una sub-muestra probabilística compuesta por 2 025 adultos de entre 12 y 65 años de edad, que respondieron a un cuestionario estandarizado que exploraba importantes áreas de psicopatología. Algunos de sus resultados

destacan la magnitud e importancia de los problemas psíquicos, la epilepsia, la depresión y los trastornos obsesivos (Benassini, 2001).

### **1.1 ANSIEDAD.**

#### **1.1.1 DEFINICIÓN Y NATURALEZA DE LA ANSIEDAD.**

La ansiedad es una sensación desagradable de tensión, aprensión o incomodidad, un miedo que parece proceder de un origen desconocido. La respuesta de miedo normal ante los estímulos amenazadores consta de varios componentes, tales como comportamientos defensivos, reflejos autónomos, estado de excitación y alerta, secreción de corticosteroides y emociones negativas. En los estados de ansiedad, estas reacciones ocurren con carácter anticipatorio y son independientes de los estímulos externos. No existe un límite claro que permita separar el estado de ansiedad patológico del normal, aunque podría establecerse en el punto en que los síntomas interfieren en las actividades productivas cotidianas (Mycek *et al.*, 2006).

#### **1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD**

##### **1.1.2.1 Prevalencia de los trastornos de ansiedad en la población general.**

Una serie de estudios primarios han establecido que los trastornos de ansiedad son muy comunes en la población general. Junto con los trastornos afectivos y el abuso de sustancias son los más comunes desordenes mentales. Tanja y cols. (2007) realizaron una detallada revisión de los más recientes e importantes estudios epidemiológicos que examinan los trastornos de ansiedad en la población general de países occidentales.

En estos estudios, la tasa de prevalencia a lo largo de la vida (proporción de personas de una muestra representativa de la población que ha experimentado el trastorno en algún momento de su vida, anterior al momento de la evaluación) vario de 13.6 % a 28.8 %. Por otra parte las tasas de prevalencia a los 12 meses (proporción de la muestra que ha experimentado el trastorno en un periodo de 12 meses anteriores al estudio) varían de 5.6 % a 19.3 %, son un poco más bajas en comparación a las tasas de de prevalencia a lo largo de la vida, lo cual indica que la etiopatogenia es, en la mayoría de los casos pero en todos, de naturaleza crónica (Tanja et al., 2007).

### **1.1.2.2 Edad de inicio.**

En general, los trastornos de ansiedad se desarrollan relativamente temprano en la vida de los pacientes. En 80-90% de los casos, el desorden se manifiesta antes de los 35 años, y el periodo 10 a 25 años de edad parece ser de alto riesgo para desarrollar algún trastorno de ansiedad. Sin embargo, hay diferencias significativas entre los diferentes trastornos de ansiedad, en lo que se refiere a la edad de inicio.

- Las fobias específicas o sociales con frecuencia inician en niños o adolescentes y, en general, se han manifestado antes de la edad de 20 años.
- El trastorno de ansiedad generalizada típicamente se desarrolla al final adolescencia y al principio de la vida adulta; el promedio de la primera manifestación se encuentra entre los 25 y los 35 años. El trastorno de ansiedad generalizada es el único trastorno de ansiedad que muestra un incremento de prevalencia en las personas de la tercera edad.
- El trastorno obsesivo-compulsivo característicamente se desarrolla entre los 15 y 39 años de edad.

- El inicio del trastorno de estrés postraumático es más variado, ya que depende de la edad en la cual el trauma ocurrió (Tanja et al., 2007).

### 1.1.2.3 Comorbilidad.

En los Estados Unidos un estudio nacional encontró que tres cuartas partes de las personas que han experimentado un trastorno de ansiedad en algún momento de su vida (prevalencia a lo largo de la vida), presentaron también algún otro desorden mental. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla No. 1.

Tabla 1. Tasas de comorbilidad en personas que han experimentado un trastorno de ansiedad en algún momento de su vida.

Trastorno.	Tasa de comorbilidad (%).
Cualquier trastorno de ansiedad.	74.1
Trastorno de pánico.	92.2
Agorafobia.	87.3
Fobia social	81.0
Fobia específica.	83.4
Trastorno de ansiedad generalizado.	91.3
Trastorno de estrés postraumático	81.0

### 1.1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD

- *Trastorno de ansiedad generalizado* (o estado constante de ansiedad excesiva que no obedece a una razón u origen claro).
- *Trastorno de angustia* (crisis de miedo abrumador asociadas a importantes síntomas somáticos tales como sudoración, taquicardia, dolor torácico, temblores, sensación de ahogo, etc.); estas crisis pueden desencadenarse en personas normales con infusión de lactato sódico y parece que el cuadro tiene un componente genético.



- *Fobias* (temor intenso a cosas o situaciones específicas, p. ej., serpientes, espacios abiertos, volar, relaciones sociales).
- *Trastorno de estrés postraumático* (ansiedad desencadenada por el recuerdo insistente de una experiencia estresante anterior).

Es necesario mencionar que el tratamiento de estos trastornos consiste, en general, en métodos psicológicos en primer lugar o en la combinación con la administración de fármacos no solo ansiolíticos, sino además, antidepresivos y antipsicóticos (Rang *et al.*, 2003).

### **1.1.4 MECANISMOS NEUROQUÍMICOS EN LOS TRASTORNOS DE ANSIEDAD.**

#### **1.1.4.1 El papel del GABA**

Diversas alteraciones en el sistema GABAérgico han sido relacionadas a la fisiopatología de los trastornos de ansiedad. Es ampliamente aceptado que pacientes que sufren de trastornos de ansiedad presentan una reducción en la unión de las benzodiazepinas a su sitio receptor en varias regiones del cerebro, en comparación con los grupos control (Lydiard *et al.*, 2003). Consistentemente con la hipótesis de una regulación a la baja del sistema GABAérgico, se han encontrado bajos niveles del GABA en pacientes que padecen de trastorno de pánico (Tiihonen *et al.*, 1997; Malizia *et al.*, 1998). Sin embargo, los resultados de estudios en los cuales se midió la concentración del GABA en plasma y en el fluido cerebroespinal son contradictorios, lo cual en parte se debe a diferencias en el diseño, metodología, sitio de obtención de la muestra biológica y pacientes utilizados. Además los resultados obtenidos en dichos estudios sugieren que no hay diferencias basales en los niveles del GABA entre los pacientes con

trastornos de pánico e individuos sanos, ya sea en fluido cerebroespinal o en plasma. Por lo tanto, la relación entre las concentraciones del GABA en el cerebro, plasma y fluido cerebroespinal y el grado en el que dichas concentraciones individual o colectivamente reflejan la actividad del GABA en el SNC sigue siendo incomprendida (Lydiard *et al.*, 2003).

### **1.1.4.2 El papel de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico.**

Las publicaciones sugieren que diversas anomalías en los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico juegan un papel clave en la fisiopatología de la depresión y los trastornos de ansiedad. La mayoría de dichos estudios sugieren una activación deficiente del sistema serotoninérgico y una compleja desregulación del sistema noradrenérgico, mas consistentemente, una sobreactivación de este sistema (Kerry *et al.*, 2000).

La hipótesis catecolaminérgica inicial propuso que una baja disponibilidad de noradrenalina podría conducir a un estado de depresión, mientras que una elevada disponibilidad de la misma podría conducir a un estado de euforia y ansiedad (Schildkraut, 1965). Después de años de investigación, varios estudios demostraron que esta simple dicotomía claramente no es cierta. Más bien parece haber una compleja desregulación en los niveles de noradrenalina y secreción de esta misma en el *locus coeruleus*, en estados de depresión y ansiedad, lo que puede conducir a un incremento o decremento en la liberación de noradrenalina junto con una alterada sensibilidad de los receptores postsinápticos y presinápticos (Kerry *et al.*, 2000). Históricamente, la medición de la noradrenalina y sus metabolitos fue la manera más directa para evaluar la funcionalidad del sistema noradrenérgico. Generalmente incrementos en los niveles de MHPG han tenido una buena correlación con los trastornos de ansiedad (Sevy *et al.*, 1989). Una hipersecreción de noradrenalina en plasma y fluido

cerebroespinal fue reportada en pacientes que sufren de trastornos de ansiedad (Sevy et al., 1989). Otro estudio reportó alteraciones en la densidad y sensibilidad de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y  $\beta$  (Meana et al., 1992).

Por lo tanto, la combinación de incrementos o decrementos en la liberación de noradrenalina con los incrementos o decrementos en la sensibilidad de sus receptores sugiere que una variedad de mecanismos de desregulación pueden conducir a los mismos cambios funcionales (Kerry y Nemeroff, 2000). Por otra parte, algunos estudios sobre los trastornos de ansiedad han encontrado disminución de los niveles de serotonina (5-HT) en el fluido cerebroespinal (Brewerton et al., 1995). Otro estudio reportó una reducción de la unión de la 5-HT a su transportador en trastornos de ansiedad generalizada (Iny et al., 1994). En general los datos son bastante consistentes, indicando que el sistema serotoninérgico exhibe una disminución general en su actividad (Kerry y Nemeroff, 2000).

### **1.1.5. FÁRMACOS ANSIOLÍTICOS E HIPNÓTICOS.**

Los ansiolíticos son los fármacos que se prescriben con mayor frecuencia y son utilizados de manera regular hasta en un 10% de la población en la mayoría de los países desarrollados (Rang et al., 2003). Se han fabricado y ensayado miles de compuestos, de los cuales se utilizan clínicamente unos 20, los cuales son esencialmente de tipo benzodiazepina y algunos de los más empleados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las benzodiacepinas en el ser humano

Fármaco.	Semivida del fármaco original (h).	Metabolito activo.	Semivida del metabolito. (h).	Duración global de la acción (h).	Aplicaciones más importantes.
Triazolam*, midazolam.	2-4.	Derivado hidrolizado.	2.	Ultracorta (<6).	Hipnótico, midazolam se usa como anestésico intravenoso.
Loracepam, oxacepam, temacepam, lormetacepam.	8-12.	No.		Corta (12-18).	Ansiolítico, hipnótico.
Alprazolam.	6-12.	Derivado hidrolizado.	6.	Media (24).	Ansiolítico, antidepresivo.
Nitracepam.	16-40.	No.		Media.	Hipnótico, ansiolítico
Diacepam, clordiacepóxido.	20-40.	Nordacepam.	60.	Larga (24-48).	Ansiolítico, relajante muscular. Diacepam se usa como anticonvulsionante por vía intravenosa.
Fluracepam.	1.	Desmetil-fluracepam.	60.	Larga.	Ansiolítico.
Clonacepam.	50.	No.		Larga.	Anticonvulsivante, ansiolítico.

\*Triazolam se retiró del mercado británico debido a sus efectos secundarios. Tomada de Rang *et al.*, 2003.

### 1.1.5.1 Benzodiacepinas.

Las benzodiacepinas son el grupo más importante de fármacos utilizados como ansiolíticos e hipnóticos. Actúan de manera selectiva sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, que intervienen en la transmisión sináptica inhibitoria rápida de todo el SNC. Las benzodiacepinas potencian la respuesta al GABA, facilitando la apertura de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por éste. Se unen de manera específica al lugar regulador del receptor, que es distinto del lugar

de unión del GABA, y actúan de forma alostérica produciendo un aumento en la afinidad del GABA por su receptor (Rang *et al.*, 2003).

### 1.1.5.2 Buspirona.

La buspirona es un agonista parcial de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> que se utiliza en el tratamiento de diversos trastornos de ansiedad. También se une a los receptores de dopamina, pero es probable que las acciones relacionadas con la 5-HT sean las más importantes en cuanto a la supresión de la ansiedad, ya que otros compuestos ansiolíticos similares (ipsapirona, gepirona) muestran una gran especificidad por los receptores los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, autoreceptores inhibidores que reducen la liberación de 5-HT y otros mediadores. También inhiben la actividad de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* y, por tanto, interfieren en las reacciones de excitación. Sin embargo, la buspirona tarda días o semanas en producir sus efectos en el ser humano, lo que apunta hacia un mecanismo de acción indirecto y más complejo. La buspirona es ansiolítico, pero carece de efecto sedante apreciable (Rang *et al.*, 2003).

### 1.1.5.3 Barbitúricos.

En la actualidad están prácticamente abandonados a favor de las benzodiazepinas y solo se utilizan en anestesia y en el tratamiento de la epilepsia. En dosis altas provocan la muerte por depresión respiratoria y cardiovascular, lo que es una de las principales razones para que en la actualidad sean muy poco usados como ansiolíticos e hipnóticos. Los barbitúricos comparten con las benzodiazepinas la capacidad de potenciar la acción del GABA<sub>A</sub>, pero su lugar de unión es distinto y su acción menos específica (Rang *et al.*, 2003).

### 1.1.5.4 Otros fármacos utilizados como ansiolíticos

- Antagonistas del receptor  $\beta$  adrenérgico (propranolol).
- Antidepresivos tricíclicos (imipramina, amitriptilina).
- Inhibidores de la monoaminooxidasa (fenelzina).

Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (fluvoxamina, paroxetina). (Argyropoulos *et al.*, 2000).

### 1.1.6 MODELOS ANIMALES DE ANSIEDAD

#### 1.1.6.1 Modelo del campo abierto

Hall (1934) originalmente describió el modelo del campo abierto ("*open-field test*") para el estudio de las emociones en ratas. El procedimiento consiste en someter a un animal, usualmente un roedor, a un ambiente desconocido del cual no puede escapar. El aparato de Hall consiste de un soporte circular iluminado de aproximadamente 1.2 m de diámetro, el cual se divide en dos anillos por una línea y está cerrado por una pared de 0.45 m de alto. Las ratas fueron colocadas individualmente en el anillo exterior del aparato y su comportamiento se observó por 2 min. La evaluación se realizó algunas veces después de 24 o 48 h de privación de alimentos, donde se observó que las ratas caminaban más cuando eran privadas de alimentos. Por lo tanto, las ratas que tuvieron acceso a los alimentos cruzaron menos la línea que dividía ambos anillos en comparación a las ratas que fueron privadas de alimentos. El modelo del campo abierto es ahora uno de los más populares procedimientos en los estudios de psicología animal. Actualmente se dispone de diferentes versiones, en cuanto a la forma geométrica del ambiente (circular, cuadrada o rectangular), iluminación (iluminación desde arriba con un foco sobre el campo abierto o iluminación desde abajo con una bombilla colocada bajo la superficie transparente del campo abierto,

algunas veces es usada luz roja), la presencia de objetos dentro del aparato como plataformas, columnas, túneles, etc. El animal se coloca en el centro o cerca de las paredes del aparato y los siguientes elementos de su comportamiento son registrados por un periodo que va de 2-20 minutos: locomoción horizontal (numero de cruzamientos de las líneas marcadas en la superficie), actividad vertical (frecuencia de levantamientos) y si el animal defeca durante el periodo de la evaluación. En tal situación, los roedores prefieren espontáneamente la periferia del aparato a la actividad en la parte central del campo abierto. De hecho los ratones y las ratas caminan cerca de las paredes, un comportamiento llamado tigmotaxis. Un aumento en el tiempo que los roedores pasan en la parte central del aparato sin modificación de la locomoción total o una disminución en el número de cruzamientos de las líneas marcadas en la superficie y de la actividad vertical son indicadores de sedación (Hall, 1934).

Los efectos de muchos diferentes fármacos han sido estudiados en el modelo de *open-field*. En general los estudios muestran que el modelo de open field solo es sensible a los efectos ansiolíticos producidos por benzodiazepinas clásicas y agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Por otra parte el modelo de open field no muestra sensibilidad a algunos otros fármacos ansiolíticos como son alprazolam y los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (Prut y Belzung, 2003).

### **1.1.6.2 Modelo del tablero con orificios.**

El modelo del tablero con orificios ("*hole-board test*"), el cual fue utilizado por primera vez por Boissier y Simon (1962), ofrece una manera simple para medir la respuesta de un animal a un ambiente desconocido. Una de las ventajas de este modelo es que varias conductas pueden ser fácilmente observadas y cuantificadas, lo cual hace posible una descripción detallada

del comportamiento de los animales. Sin embargo, al igual que en otros modelos animales para el estudio de la ansiedad, en el modelo del tablero con orificios los diversos estímulos ansiogénicos provocados por la manipulación pueden variar mucho entre los animales, lo cual puede afectar drásticamente el comportamiento de los mismos (Takeda *et al.*, 1998).

El aparato original utilizado para llevar a cabo el modelo del tablero con orificios consistió de un tablero cuadrado con un área de 40 cm cuadrados y un grosor de 1.8 cm, perforado con 16 orificios de 3 cm de diámetro igualmente distribuidos. Un ratón fue colocado en el centro del tablero. El observador registro el número de veces que el ratón introdujo la cabeza en alguno de los orificios, conducta conocida como "*head-dipping*" (Crawley, 1985).

Diversos trabajos han estudiado el efecto de fármacos ansiolíticos utilizando el modelo del tablero con orificios. Algunos autores como Crawley (1985) reportaron incrementos en el "*head-dipping*" después de que estos fueron tratados con fármacos ansiolíticos, mientras que otros autores como Martínez y cols. (2006) reportaron decrementos de la misma conducta después de la administración de fármacos ansiolíticos. Dicha controversia en estos trabajos se pudiera deber al nivel de estrés de los animales utilizados en cada estudio. Takeda y cols. (1998) reportaron que dosis de 0.05–0.5 mg/kg, i.p. de diazepam aumentaron el "*head-dipping*". En el mismo estudio se reportó que el diazepam en una dosis de 0.1 mg/kg, i.p. disminuyó el "*head-dipping*" cuando los animales fueron estresados previamente a la evaluación. Por otra parte, Bilkei-Gorzó y Gyertyán (1996) reportaron que el fármaco ansiolítico clordiazepóxido mostró actividad inhibitoria cuando los animales se encontraban en un ambiente aversivo (iluminación), mientras dicho fármaco no presentó actividad en ambientes no aversivos.



### 1.1.6.3 Modelo de exploración en cilindro.

Otro modelo utilizado para la búsqueda o estudio de fármacos con actividad ansiolítica es el modelo de exploración en cilindro. Dicho modelo resulta de gran utilidad para medir la actividad vertical de roedores previamente administrados con un determinado fármaco, y se basa en la asunción de que una disminución en el número de levantamientos espontáneos sobre los miembros posteriores implica un efecto ansiolítico (Hiller y Zetler, 1996; Olivia *et al.*, 2004; Ugalde *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006).

## 1.2 EPILEPSIA.

### 1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LOS TRASTORNOS EPILÉPTICOS

Actualmente la proporción estimada de la población mundial con epilepsia activa (es decir crisis convulsivas continuas o necesidad de tratamiento) se encuentra entre 4 a 10/1000 personas. Sin embargo, algunos estudios en países en desarrollo sugieren que la proporción se encuentra entre 6 a 10/1000 personas. Alrededor de 50 millones de personas en el mundo sufren epilepsia. En países desarrollados la tasa de nuevos casos anuales se encuentra entre 40 a 70/1000 personas en la población general. Cerca del 90 % de los casos de epilepsia en el mundo son encontrados en regiones en desarrollo. Alrededor del 70 % de los pacientes que padecen trastornos epilépticos responden favorablemente al tratamiento, sin embargo, se estima que tres cuartas partes de las personas afectadas en los países en desarrollo no reciben el tratamiento que necesitan (WHO. Epilepsy. Fact sheet N°999).

### 1.2.2 DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS.

La epilepsia se define como un trastorno cerebral caracterizado por una permanente predisposición a sufrir crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicosociales y sociales de esta afección. Para definirla como epilepsia requiere la ocurrencia de al menos una crisis corroborada mediante análisis electroencefalográfico (Fisher *et al.*, 2005).

Una crisis epiléptica es una ocurrencia transitoria de signos y /o síntomas debidos a una excesiva actividad o sincronización neuronal en el cerebro (Fisher *et al.*, 2005).

La descarga neuronal característica de la epilepsia es consecuencia de descargas eléctricas de una pequeña población de neuronas en algún lugar específico del cerebro conocido como foco primario. Desde el punto de vista anatómico, esta región tiene un aspecto por completo normal. Casi nunca hay causa identificable de la epilepsia, aunque ciertas áreas sufren alteraciones funcionales que pueden demostrarse mediante el desencadenamiento de la actividad epileptógena con diferentes factores ambientales, como la modificación de los gases en la sangre, pH, electrolitos o disponibilidad de glucosa (Mycek *et al.*, 2006).

### 1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS.

La clasificación clínica de la epilepsia distingue dos categorías principales de crisis: parciales y generalizadas, aunque con algunas superposiciones y muchas variantes en cada una de ellas. Las dos formas se dividen a su vez en simples (sin pérdida de consciencia) y complejas (con pérdida de consciencia) (Berg *et al.*, 2010).

### 1.2.3.1 Crisis parciales.

Las crisis parciales son aquellas en las que las descargas comienzan de forma local y, a menudo, así permanecen. Los síntomas dependen de las regiones encefálicas afectadas y consisten en contracciones musculares involuntarias, experiencias sensitivas o descargas autónomas anormales o efectos sobre el estado de ánimo y el comportamiento, por lo que con frecuencia se habla de epilepsia psicomotora. En este tipo de epilepsia, la descarga EEG suele limitarse a un solo hemisferio. Las crisis parciales a menudo se atribuyen a lesiones cerebrales locales y su incidencia aumenta con la edad. En las crisis parciales complejas, la pérdida de conciencia puede suceder al comienzo del episodio o algo después, cuando la descarga se extiende desde el lugar de origen a la sustancia reticular del tronco encefálico (Berg *et al.*, 2010).

### 1.2.3.2 Crisis generalizadas.

Las crisis generalizadas afectan a todo el encéfalo, incluido el sistema reticular, con una actividad eléctrica anormal de los dos hemisferios. Se caracteriza por una pérdida inmediata de la conciencia. Existen dos grupos importantes, las crisis tónico-clónicas (gran mal) y las ausencias (pequeño mal). La crisis tónico-clónica consiste en una fuerte contracción inicial de la totalidad de la musculatura que produce un espasmo rígido en extensión. La respiración se detiene a menudo y el paciente defeca, orina o segrega gran cantidad de saliva. Esta fase tónica dura alrededor de un minuto, tras lo cual aparece una serie de sacudidas violentas y sincrónicas que van cediendo de forma gradual entre 2-4 min (Berg *et al.*, 2010).

En los niños aparecen crisis de ausencia, que son mucho menos exageradas, pero que surgen con más frecuencia (muchos episodios cada día) que las crisis tónico-clónicas. El paciente interrumpe bruscamente la actividad que está llevando a cabo, a veces deja de hablar en medio de una

frase, y permanece ausente durante algunos segundos, pero con escasas o nulas alteraciones motrices. No es juicioso de lo que lo rodea y se recupera de manera brusca sin efectos posteriores (Berg *et al.*, 2010.).

La Clasificación Internacional de las Crisis Epilépticas (Comisión para la Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE-1981: International League Against Epilepsy) ha propuesto una clasificación en cuanto a los diferentes tipos de síndromes epilépticos (Yusta, 2005; Engel, 2006), una forma resumida de los tipos de epilepsia se presenta en la figura 1.

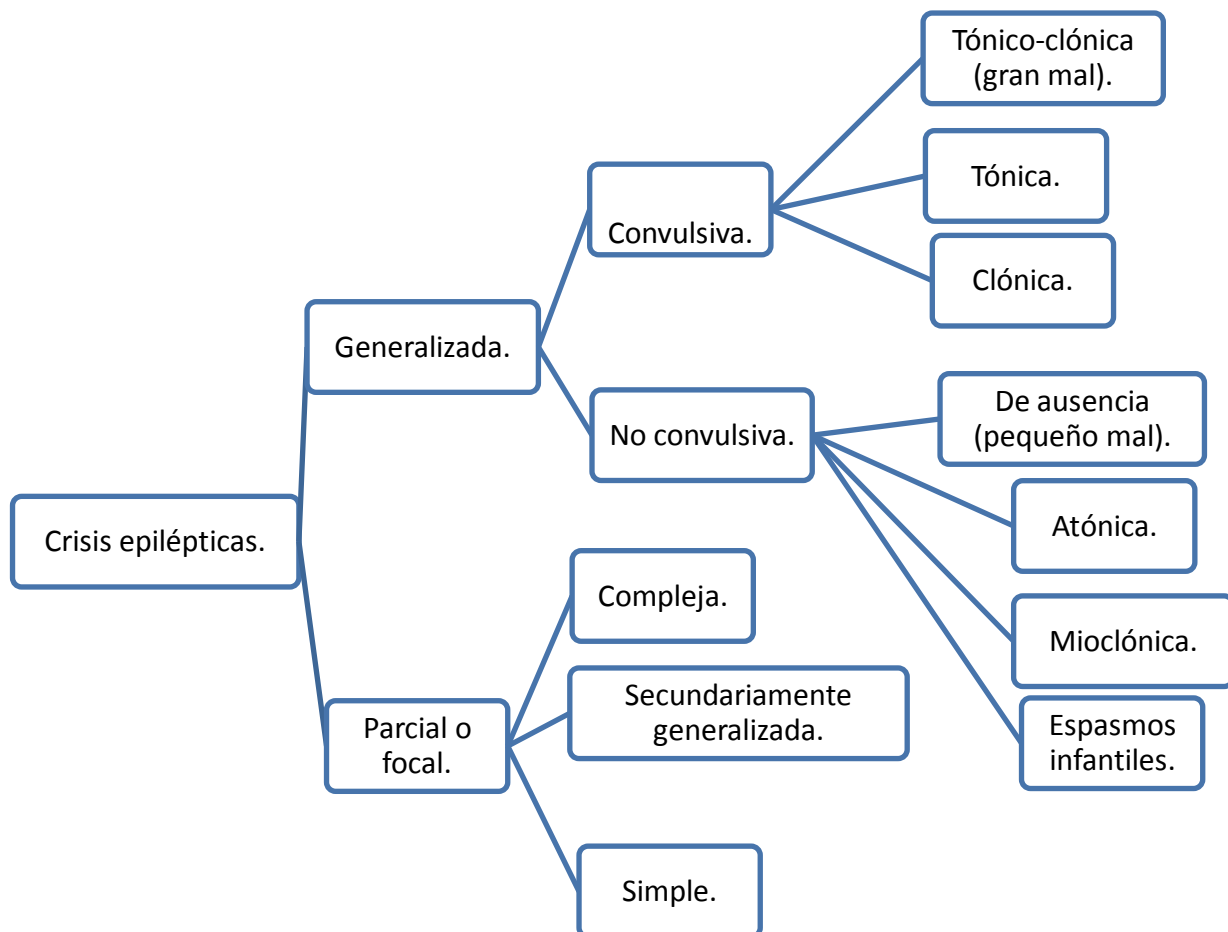


Figura 1. Clasificación de las crisis epilépticas de acuerdo con la "Commission on Classification and Terminology of International League Against Epilepsy", 1981, 1989.

### 1.2.4 MECANISMOS NEUROQUÍMICOS DE LA EPILEPSIA.

#### 1.2.4.1 Hipótesis GABAérgica.

Esta hipótesis refiere que la reducción de la inhibición GABAérgica promueve el trastorno epiléptico mientras que un aumento de la misma origina efecto antiepiléptico (Engelborghs *et al.*, 2000).

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más abundante del cerebro de los mamíferos, estimándose que aproximadamente un tercio de las sinapsis del sistema nervioso central (SNC) son GABAérgicas. La mayoría de las neuronas que utilizan este neurotransmisor parecen estar implicadas en circuitos locales, aunque también se conocen algunas proyecciones GABAérgicas. La síntesis de GABA es a partir del ácido glutámico que deriva de la glucosa, con la participación de la enzima ácido glutámico-descarboxilasa (GAD), presente en el SNC y órganos periféricos (hígado, riñón y páncreas). Cuenta con diferentes tipos de receptores, tanto centrales como periféricos, y su metabolización se realiza a través de la GABA-aminotransferasa (GABA-T), enzima mitocondrial específica del SNC. La acción del neurotransmisor inhibitorio GABA está mediada, al menos, por tres tipos diferentes de receptores, el GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Respecto a los dos primeros, existe abundante información acerca de su estructura, distribución y farmacología; sin embargo, aún no es mucho lo que se conoce acerca del receptor GABA<sub>C</sub>, un nuevo miembro de la familia de receptores GABAérgicos. Los tres subtipos de receptores difieren tanto en sus perfiles farmacológicos como en su distribución y, en algunos casos, en la sensibilidad a los iones, aunque la estimulación de GABA resulta casi siempre en inhibición neuronal en los tres subtipos de receptores (López y Navarro, 1997). Los receptores GABA<sub>A</sub> son pentaméricos, constituidos en mayor parte por tres subunidades distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), cada una de las cuales puede adoptar entre 3 y 6 subtipos

moleculares. Los receptores GABA<sub>A</sub>, de localización postsináptica, intervienen en la inhibición post-sináptica rápida, un canal con permeabilidad selectiva para el ión cloro. Como el potencial de membrana en equilibrio para el ión cloro suele ser negativo en relación con el potencial de reposo de la célula, el aumento de la permeabilidad al ión cloro hiperpolariza la célula y reduce su excitabilidad (Bradford, 1995).

Varios estudios han mostrado que el GABA está involucrado en la fisiopatología de la epilepsia, tanto en modelos experimentales con animales como en pacientes que sufren de trastornos de epilepsia. Los niveles del GABA y la actividad de GAD mostraron estar reducidos en focos epilépticos extirpados quirúrgicamente (De Deyn *et al.*, 1990). Por otra parte, se reporta una reducción de la unión de [<sup>3</sup>H]-GABA en tejido cerebral humano de pacientes con trastornos de epilepsia, mientras estudios PET demuestran una reducción de unión al receptor para benzodiazepinas en focos epilépticos humanos. El grado de reducción de la unión al receptor para benzodiazepinas mostro una correlación positiva con la frecuencia de crisis epilépticas (Savic *et al.*, 1996).

Varios convulsivantes endógenos (compuestos guanidino) y exógenos (bicuculina, picrotoxina, penicilina, pilocarpina, pentilentetrazol) inhiben la transmisión GABAérgica a través de la inhibición de la síntesis del GABA o a través de la interacción con distintos sitios del receptor post-sináptico GABA<sub>A</sub> (D'Hooge *et al.*, 1999). Por otra parte, varios fármacos anticonvulsivos que son análogos del GABA (vigabatrina, tiagabina, valproato) bloquean su metabolismo o facilitan sus efectos post-sinápticos (Engelborghs *et al.*, 2000).

### 1.2.4.2 Hipótesis glutamatérgica.

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC, en el cual se distribuye de manera ubicua (Hollmann *et al.*, 1994). Los estudios efectuados con agonistas y antagonistas selectivos permiten distinguir cuatro tipos principales de receptores para aminoácidos excitatorios: NMDA, AMPA, kainato y receptores metabotrópicos, todos los cuales se han clonado y estudiado con gran detalle (Dingledine *et al.*, 1999). Los tres primeros son receptores ionotrópicos, con nombres derivados de sus antagonistas específicos. Los receptores metabotrópicos son receptores monoméricos acoplados a una proteína G, relacionados con los sistemas de segundos mensajeros intracelulares (Bruno *et al.*, 2001). Los estudios de fijación demuestran que los receptores de glutamato son más abundantes en la corteza, los núcleos de la base y las vías sensitivas. En general los receptores NMDA y AMPA ocupan las mismas localizaciones, mientras que la distribución de los receptores de tipo kainato es mucho más limitada (Bradford, 1995).

La sinapsis glutamatérgica juega un papel crítico en la fisiopatología de la epilepsia. La activación de receptores postsinápticos ionotrópicos y metabotrópicos a glutamato es proconvulsivante. Antagonistas del receptor NMDA han mostrado ser poderosos anticonvulsivos en varios modelos animales de epilepsia. Por otra parte hay evidencia de alteraciones en la función del receptor NMDA en estudios de epilepsia adquirida, tanto en modelos animales como en humanos. Tal es el caso de la incrementada sensibilidad a la acción del glutamato en receptores NMDA fue vista en el hipocampo de ratas tratadas crónicamente con agentes químicos convulsivantes y en focos corticales de humanos que sufren de trastornos epilépticos (Engelborghs *et al.*, 2000).

### 1.2.4.3 Catecolaminas.

En varios modelos genéticos de epilepsia se han reportado anormalidades en los niveles de catecolaminas presentes en el SNC. En ratas con epilepsia espontánea se encontró que los niveles de dopamina decrecieron en el núcleo caudado mientras los niveles de noradrenalina mostraron un aumento en el mesencéfalo y el tronco cerebral (Hara *et al.*, 1993). En otro estudio se encontraron valores disminuidos de dopamina en focos epilépticos de pacientes que sufren epilepsia (Mori *et al.*, 1987). En modelos animales de ausencia epiléptica, las crisis convulsivas son exacerbadas por antagonistas de dopamina mientras los ataques epilépticos son aliviados por agonistas del mismo neurotransmisor (Snead, 1995). En otro modelo animal de ausencia epiléptica con ratones se demostró que la destrucción del sistema ascendente noradrenérgico en el nacimiento previene la aparición de dicho síndrome (Meldrum, 1994).

### 1.2.4.4 Péptidos opioides.

En estudios experimentales, los opiáceos y péptidos opioides mostraron propiedades tanto convulsivantes como anticonvulsivantes. Los agonistas del receptor  $\kappa$  suprimieron las descargas epilépticas en un modelo animal de ausencia epiléptica. Por otra parte péptidos agonistas del receptor  $\mu$  inducen crisis epilépticas cuando se administran intraventricularmente, lo cual posiblemente se deba a la inhibición de interneuronas inhibitorias (Przewlocka *et al.*, 1995). En pacientes con crisis parciales complejas, estudios PET señalan que la densidad del receptor  $\mu$  es incrementada en la corteza temporal (Mayberg *et al.*, 1991).

### 1.2.5 FÁRMACOS ANTICONVULSIVOS

Los fármacos antiepilépticos más frecuentemente usados y su mecanismo de acción son resumidos en la tabla 3.



Tabla 3. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos

Agente antiepiléptico.	Mecanismo(s) de acción
Benzodiacepinas.	Mejoran la acción del GABA. Reducen sostenidamente ataques repetitivos.
Carbamazepina.	Bloquea canales de sodio voltaje-dependientes.
Etosuximida.	Reduce corrientes de $Ca^{2+}$ tipo T.
Felbamato.	Inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica (reduce la acción del NMDA, bloquea el sitio de unión a glicina en el receptor de NMDA).
Gabapentina.	Análogo del GABA pero no actúa sobre los receptores GABAérgicos ni se convierte o metaboliza en GABA. Incrementa las sinapsis GABAérgicas: ¿activación de GAD? Puede bloquear el transporte de los aminoácidos. Se une a canales de $Ca^{2+}$ voltaje-dependientes reduciendo la concentración de $Ca^{2+}$ intraneuronal.
Lamotrigina.	Reduce la liberación de glutamato. Inhibe las corrientes de $Ca^{2+}$ voltaje-dependientes, bloquea canales de $Na^+$ voltaje-dependientes.
Levetiracetam.	Mecanismo de acción desconocido.
Oxcarbazepina.	Inhibición de canales de $Na^+$ voltaje-dependientes. Inhibición de corrientes de $Ca^{2+}$ voltaje-activadas.
Pentobarbital.	Mejora la acción del GABA. Reduce corrientes de $Ca^{2+}$ voltaje-dependientes.
Fenitoína.	Bloquea canales de $Na^+$ voltaje-dependientes. Reduce corrientes de $Ca^{2+}$ .
Primidona.	Bloquea corrientes de $Na^+$ voltaje-dependientes.
Progabida.	Agonista de los receptores GABA-A y GABA-B.
Remacemida.	Antagonista del receptor NMDA. Inactivación de los canales de $Na^+$ .
Tiagabina.	Inhibidor de la recaptura neuronal del GABA.
Topiramato.	Bloquea los canales de $Na^+$ . Reducción de las corrientes de $Ca^{2+}$ tipo L. Potenciación del GABA en el receptor GABA-A: aumento del flujo de $Cl^-$ . Inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica: bloqueo de los receptores AMPA/kainato. Inhibición de la anhidrasa carbónica.
Valproato.	Incrementa la síntesis y reduce el catabolismo del GABA. Bloquea las corrientes de $Ca^{2+}$ tipo T. Aumenta la inactivación de los canales de $Na^+$ .
Vigabatrina.	Inhibidor de la GABA-transaminasa. Inhibe la recaptura del GABA.
Zonisamida.	Bloquea los canales de $Na^+$ . Bloquea canales de $Ca^{2+}$ tipo T. Mejora la acción de GABA. Inhibe la anhidrasa carbónica.

Tomada de Engelborghs *et al.*, 2000.

**1.2.5.1 Mecanismos de acción de fármacos anticonvulsivos.**

La mayoría de los fármacos anticonvulsivos actualmente usados fueron descubiertos por "screening", sin fundamento en cuanto al mecanismo de acción. Ya que el conocimiento en cuanto a la fisiopatología de la epilepsia ha crecido considerablemente en los últimos años y los mecanismos de acción de la mayoría de los fármacos antiepilépticos son al menos parcialmente entendidos, es claro que la mayoría de dichos fármacos ejercen sus propiedades anticonvulsivas a través de solo unos pocos mecanismos neuroquímicos, que son precisamente los mecanismos fisiopatológicos básicos, que se piensa, causan las crisis epilépticas (Macdonald y Kelly, 1995). La asociación entre los mecanismos de la epileptogénesis y la terapia farmacológica anticonvulsiva es presentada en la Tabla 4.

Tabla 4. Relación entre mecanismos de epileptogénesis y mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos.

	Mecanismo de epileptogénesis.	Mecanismo de acción de fármacos antiepilépticos.
GABA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción del GABA en la corteza.</li> <li>• Reducción de unión al receptor para benzodiazepinas en el núcleo talámico medial.</li> <li>• Reducción de la densidad del receptor para benzodiazepinas en la región CA1.</li> <li>• Reducción de los niveles del GABA y la actividad de la GAD en focos epilépticos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la funcionalidad del GABA (vigabatrina, tiagabina).</li> <li>• Mejora en la inhibición GABAérgica (benzodiazepinas).</li> <li>• Actividad agonista en los receptores GABA-A y GABA-B (progabida)</li> <li>• Propiedades GABAérgicas débiles (pentobarbital, gabapentina, topiramato, valproato, zonisamida).</li> </ul>
GLU.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación a la baja de receptores ionotrópicos a glutamato.</li> <li>• Anticuerpos anti-gluR3.</li> <li>• Incremento de los niveles de glutamato en plasma.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la liberación de glutamato (lamotrigina).</li> <li>• Bloqueo del sitio de unión a glicina en el receptor NMDA (felbamato).</li> </ul>
Na <sup>+</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutaciones en los canales de sodio voltaje-dependientes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de las corrientes de sodio voltaje-dependientes. (carbamazepina, felbamato, lamotrigina, oxcarbazepina, fenitoína, topiramato, valproato, zonisamida).</li> </ul>
Ca <sup>2+</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción del flujo de calcio mediado por acetilcolina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo "T" (etosuximida, valproato).</li> </ul>

Tomada de Engelborghs *et al.*, 2000.

Los fármacos anticonvulsivos establecidos decrecen la excitabilidad de la membrana neuronal, interactuando con canales iónicos o con complejos receptores a neurotransmisores. Los fármacos antiepilépticos que decrecen la excitabilidad de la membrana neuronal a través de la interacción con canales iónicos, actúan en canales de sodio y calcio. La mayoría de los fármacos que interactúan con complejos receptores a neurotransmisores promueven la inhibición GABAérgica aunque algunos fármacos más recientes actúan también a través de la neurotransmisión excitatoria (Engelborghs *et al.*, 2000). Gracias al incremento en el uso de modelos animales de epilepsia, al mayor conocimiento en cuanto a la fisiopatología de dicho trastorno y los mecanismos de acción de fármacos anticonvulsivos, el diseño racional de dichos fármacos mostro un aumento considerable en la década pasada (Engelborghs *et al.*, 2000).

### **1.2.6 MODELO DE INDUCCIÓN DE CONVULSIONES AGUDAS CON PENTILENTETRAZOL**

El uso de modelos animales de epilepsia es esencial para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las crisis epilépticas.

A finales de 1940 y principios de 1950 varios documentos describen las propiedades del agente convulsivante PTZ en modelos animales. Desde entonces, tanto el modelo "kindling" inducido con PTZ como la inducción de convulsiones agudas inducidas con el mismo convulsivante han sido utilizadas para identificar la mayoría de agentes actualmente utilizados en el tratamiento contra las crisis epilépticas (Kupferberg, 2001).

El PTZ es un derivado tetrazol con una consistente acción convulsivante en ratones, ratas y primates. Cuando es dado por vía parenteral el PTZ inicialmente produce mioclonias y posteriormente puede conducir a crisis generalizadas clónico-tónicas. Los EEGs muestran descargas de espiga-onda

y poliespiga. Un ejemplo de un EEG de un ratón administrado con 85 mg/Kg de PTZ vía i.p. es mostrado en la figura 2.

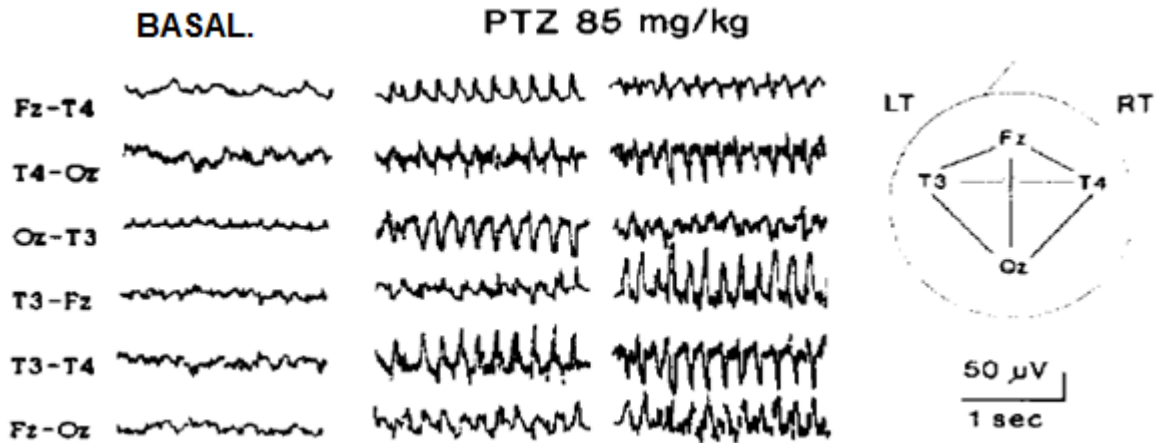


Figura 2. Crisis epilépticas inducidas en un ratón administrado con 85 mg/Kg de PTZ vía i.p. El EEG basal es mostrado a la izquierda. El panel central muestra dos segmentos del EEG separados en tiempos de 45 s después de la administración del PTZ (Krauss *et al.*, 1989).

Los modelos animales con PTZ se adoptaron como pruebas de detección de fármacos antiepilépticos, lo cual en parte se debió a que el agente anticonvulsivo etosuximida no alteró los umbrales convulsivos en el modelo del electroshock máximo. En contraste, algunos fármacos efectivos contra crisis inducidas mediante el modelo del electroshock máximo, tales como fenitoína y carbamazepina, son inefectivos contra las crisis inducidas con PTZ. Por otra parte algunos fármacos como pentobarbital, ácido valproico y diazepam responden efectivamente contra las crisis inducidas por ambos modelos (Fisher, 1989).

Aunque los modelos animales basados en la administración de PTZ, es decir "kindling", convulsiones agudas y umbral de las crisis inducidas con PTZ, han sido y aún son ampliamente usados para la búsqueda de fármacos, el mecanismo por el cual el PTZ actúa no es del todo entendido. Un mecanismo generalmente aceptado por el cual se piensa que el PTZ ejerce su acción, es actuando como un antagonista en el sitio de unión a la

microtoxina del complejo receptor GABA<sub>A</sub> (Ramanjaneyulu y Ticku, 1984). Estudios más recientes indican que el PTZ y la picrotoxina interactúan con superposición pero en distintos dominios del receptor GABA<sub>A</sub> (Huang et al., 2001). Pellar y Wilson (1977) mostraron que el PTZ reduce principalmente la conductancia del ión cloruro y en menor medida las de los iones potasio y sodio.

### 1.3 EL GÉNERO *ANNONA*.

El nombre de la familia Annonaceae es derivado del latín y significa *la cosecha anual*. Esta familia es económicamente importante por la venta de sus frutos y por la producción de aceites esenciales útiles para la industria de la perfumería (Estrada, 1994) y muchas de ellas son empleadas en la medicina tradicional como infusiones de la corteza, hojas o raíces de algunas de ellas, ya sea como analgésico o antiinflamatorio, para aliviar fiebres o para el tratamiento de desórdenes intestinales tales como la disentería, diarrea y cólicos; para aliviar malestares por dislocaciones o torceduras, como agente cicatrizante y en el tratamiento de la diabetes (Ruíz y Morett, 1997). Además se describe su uso como antiprotozoario y antineoplásico (Villamar *et al.*, 1994) y como ansiolítico-sedante y anticonvulsivo (N'Gouemo *et al.*, 1997).

En México, las anonas se cultivan en hortalizas familiares, principalmente en los estados de Colima, Guerrero y el Estado de México (Ruíz y Morett, 1997). Éstas son utilizadas para tratar la ansiedad y la epilepsia se han tratado frecuentemente con los remedios herbolarios. Gill en 1948 reportó que la decocción de plantas pertenecientes a las familias Annonaceae, Loganiaceae, Proteaceae y Rubiaceae eran usadas como antiepilépticos. Mientras que el grupo de N'Gouemo (1997) describen que el extracto de *Annona muricata* L. conocida comúnmente como "Guanábana" disminuye las crisis convulsivas en ratones. López-Ruvalcaba *et al.*, (2006) reportaron los efectos como ansiolítico de la *A. cherimolia*. Mientras que de la *A.*

*diversifolia* Saff. (ilama), un miembro de esta familia que es endémica de las montañas y laderas de México, Guatemala y El salvador, se han descrito su actividad como sedante y ansiolítico (González-Trujano *et al.*, 1998; 2006a), anticonvulsivo (González-Trujano *et al.*, 1998; 2006b; 2009) y antinociceptivo (Carballo-Villalobos *et al.*, 2010).

### 1.3.1 BOTÁNICA.

Las especies del género *Annona* presentan numerosas características en común, especialmente en lo relativo a la altura de las plantas, el sistema de las raíces, la corteza, los tallos, la flora biológica, la polinización y en el cuajado y tipo de fruto. Por otra parte hay importantes variaciones entre plántulas que pertenecen a la misma especie, afectando no solo el follaje maduro y la productividad de las plantas, sino también el tamaño del fruto, la forma, el color, la calidad, y el número de semillas en el fruto. Estas variaciones son a menudo bastante pronunciadas, lo cual resulta en el hecho de que una especie tenga varios nombres botánicos (Ochse *et al.*, 1974; Geurts, 1981; León, 1987).

En general, las anonas son arbustos o pequeños arboles, cuya altura varia de 5 a 11 m dependiendo de varios factores, tal como la especie, el clima, el suelo y el manejo de los cultivos. Dichas plantas son erectas, con corteza de color café-grisáceo, la cual comúnmente es áspera y corrugada. Generalmente, los tallos de las anonas son de color gris-ferruginoso, y tomentosos cuando son jóvenes, posteriormente se vuelven glabros. Las flores de las anonas son hermafroditas, usualmente fragantes, solitarias o en fascículos con 2 o 4 flores, con tres sépalos verdes y seis pétalos dispuestos en dos verticilos. El verticilo externo tiene tres pétalos de color amarillo-verdoso y el interno tiene tres pétalos amarillos (León, 1987).

## 1. MARCO TEÓRICO.

La floración comienza cuando la planta tiene 3 o 4 años de edad, aunque ocasionalmente esta puede presentarse más temprano, dependiendo de las condiciones ambientales (Pinto *et al.*, 2005).

La polinización es principalmente llevada a cabo por insectos o algunas veces por el viento. El hecho de que las flores sean protóginas (los pistilos maduran antes de que el polen sea liberado por las anteras) sugiere que la autopolinización no es una regla para las anonas. Debido a que las flores son protóginas, el cuajado de los frutos puede ser deficiente cuando la población de insectos polinizadores es pequeña, pudiéndose producir frutos pequeños y asimétricos, ya que el tamaño y forma de los frutos depende del número y posición de óvulos fertilizados. Como resultado, el número de frutos por planta, y la forma y tamaño de los mismos son altamente dependientes de la abundancia de insectos polinizadores o a la polinización manual en lugares donde los dichos insectos son escasos (Pinto *et al.*, 2005).

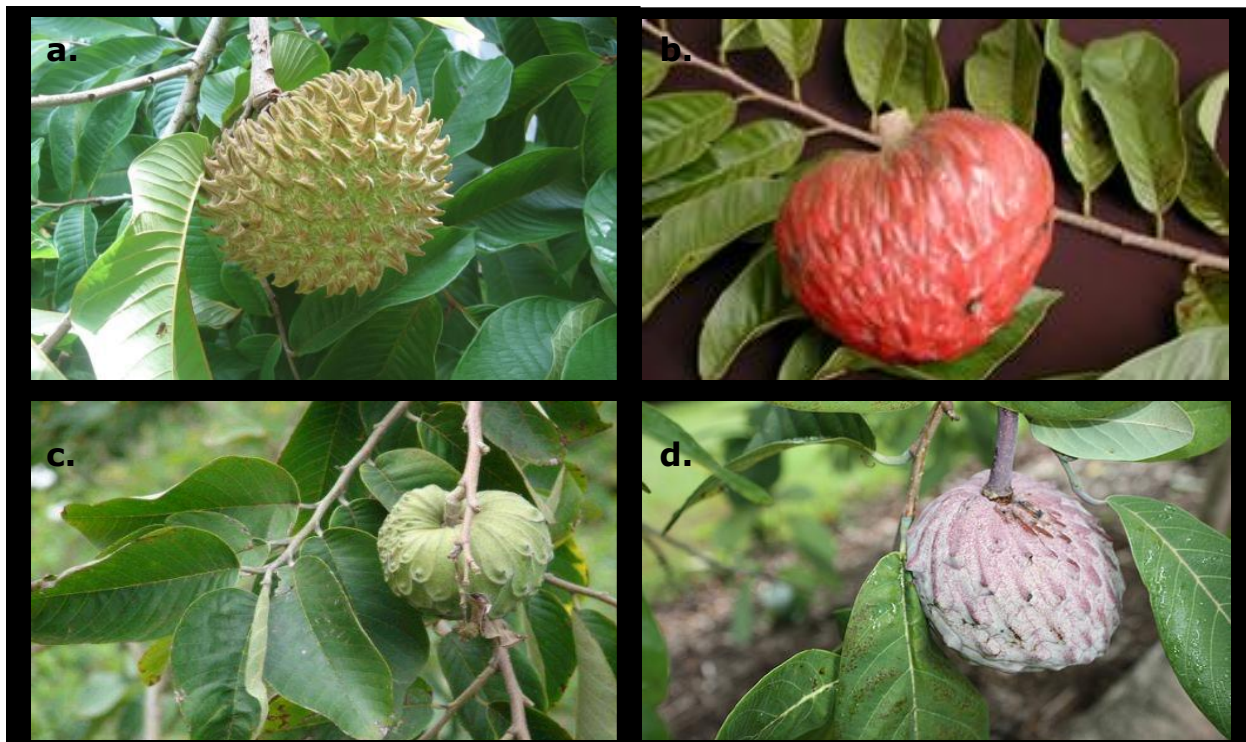


Figura 3. Hojas y fruto de la *A. purpúrea* (a), la *A. reticulata* (b), la *A. cherimolia* (c) y la *A. diversifolia* (d).

### 1.3.2 FITOQUÍMICA.

En las últimas dos décadas se han aislado varios compuestos como metabolitos de las especies del género *Annona*. La mayoría de dichos metabolitos pertenecen al grupo de las acetogeninas y de los alcaloides (ver Apéndice A). Al igual que en otros organismos, en las plantas los metabolitos se pueden clasificar como primarios y secundarios. Se llama metabolismo primario de las plantas a los procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Son procesos químicos pertenecientes al metabolismo primario de las plantas: la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas. Son metabolitos primarios de las plantas los compuestos químicos que intervienen en los procesos mencionados: los aminoácidos destinados a la formación de proteínas, los nucleótidos, los azúcares, los acilglicéridos. El concepto de metabolitos primarios fue creado en contraposición al de "metabolitos secundarios de las plantas", que no cumplen un rol directo en la supervivencia de la planta y por lo tanto su ausencia no es letal para ésta, aunque sí cumplen importantes roles de defensa, atracción de polinizadores, entre otros (Singer *et al.*, 2003).



### 2. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de los vertiginosos avances de la ciencia en general, y de la medicina en particular, se sigue buscando el tratamiento idóneo de diversas enfermedades, entre ellas las que afectan el SNC, ya sea por síntesis o derivados de origen natural como las plantas o animales. No obstante, es mayor la esperanza de encontrar nuevos medicamentos al indagar entre los recursos milenarios, como los utilizados en la dieta común, hacia los que se han enfocado los estudios científicos en busca de la quimiopreención de enfermedades múltiples. Por lo tanto, es imperante recuperar y revalorar el saber tradicional popular con respecto al uso de plantas, aprovecharlas como recurso, así como revalorizar y analizar las relaciones hombre-planta, desde el punto de vista antropológico, ecológico, botánico y medicinal.

Dentro de los padecimientos del SNC que aquejan a la población mexicana se pueden mencionar la ansiedad y la epilepsia (Adams *et al.*, 1999). En México, la ansiedad y la epilepsia se han tratado frecuentemente con los remedios herbolarios, dentro de los cuales destacan las especies del género *Annona*, de las cuales algunos estudios ya han reportado propiedades sedantes y/o ansiolíticas o anticonvulsivas, (Gill, 1948; N´Gouemo *et al.*, 1997; López-Ruvalcaba *et al.*, 2006; González-Trujano *et al.*, 1998; 2006a; 2006b; 2009). A pesar de la información referida sobre los efectos sobre el SNC de las especies del género *Annona* (Estrada, 1994), ninguno de los reportes da evidencia del efecto de los extractos acuosos de estas especies, que es la forma de preparación como la gente lo utiliza, de tal manera que el presente estudio se propone hacer una valoración de los efectos de los extractos acuosos de cuatro especies del género *Annona* más comúnmente utilizadas en la población mexicana para conocer su espectro de actividad sobre el SNC y comparar su eficacia y potencia farmacológica entre especies del mismo género preparadas por los procesos de infusión y decocción.

### 3. HIPÓTESIS.

Especies del género *Annona* se usan en la medicina tradicional por sus propiedades sedantes, ansiolíticas y anticonvulsivas; por lo tanto, se espera que los extractos acuosos de las mismas preparados por infusión y decocción produzcan un efecto depresor sobre el SNC en modelos experimentales en ratones.

### 4. OBJETIVOS.

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar del efecto depresor de extractos acuosos de especies del género *Annona* en modelos experimentales en ratones.

#### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Preparar los extractos acuosos por proceso de infusión y decocción de las hojas de especies del género *Annona* tales como: *Annona diversifolia*, *A. reticulata*, *A. cherimolia* y *A. purpurea*.
- Evaluar la actividad depresora del SNC de los extractos acuosos de 4 especies del género *Annona* seleccionadas mediante el uso de diferentes modelos experimentales.
- Realizar el análisis comparativo de la eficacia y potencia farmacológica sobre el SNC entre 4 especies de *Annona* y un fármaco de referencia.
- Determinar la naturaleza de los compuestos que están presentes en los diferentes liofilizados de los extractos acuosos de las 4 especies de *Annona* mediante técnicas de cromatografía en capa fina (CCF).

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 5.1 MATERIALES.

##### 5.1.1 EQUIPO.

Balanza analítica (Sartorius BL 2105).

Balanza para el pesado de los animales (Ohaus triple beam 700/800 series).

Cronómetros (Diager).

Cajas de acrílico (20x30x15 cm).

Cajas de acrílico (23x40x20 cm)

Jeringas de 1 mL con agujas de 0.40 mm x 13 mm (BD Plastipak).

Lámpara de luz ultravioleta (Spectroline CX-20).

Placas de sílica gel con indicador de fluorescencia UV 254 nm (Mackerey-Nagel) de 10 x 15 cm y 0.25 mm de espesor.

Aplicador automático para cromatografía de capa fina (CAMAG TLC4).

Densitómetro para cromatografía de capa fina (CAMAG TLC Scanner3).

##### 5.1.2 FÁRMACOS Y REACTIVOS.

Pentilentetrazol (SIGMA).

Etosuximida (SIGMA)

Clorhidrato de buspirona (SIGMA).

Pentobarbital (Sedalphorte)

Tween 80 (SIGMA).

Extractos acuosos de las hojas de especies del género Annona.

Solución salina isotónica al 0.9 %

Ácido acético glacial (J.T BAKER).

Ácido fórmico (J.T BAKER).

Metanol (J.T BAKER).

Acetato de etilo (J.T BAKER).

Rutina (SIGMA).

2'-aminoetildifenilborato (SIGMA).

Quercetina (SIGMA).

### 5.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

Ratones machos y hembras de la cepa Taconic (SW) (25-30 g. de peso corporal) mantenidos a temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  con ciclo de luz/obscuridad de 12 hrs. Con libre acceso a alimento y agua (*ad libitum*). Los experimentos se realizaron siguiendo las especificaciones emitidas por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y el Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

### 5.1.4 MATERIAL VEGETAL.

Las hojas de las especies de *Annona reticulata*, *A. purpurea*, *A. diversifolia* y *A. cherimolia* previamente recolectadas por el personal del Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz en localidades del Estado de Morelos, Guerrero y Chiapas en el 2010 se utilizaron en este estudio. Los números de referencia del espécimen de herbario son: pendiente, 26580; AN9702 y L1269901, respectivamente.

**5.2 METODOLOGÍA.****5.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.**

Cada lote de material vegetal constó de 50 g de hoja seca y molida, los cuales se prepararon por proceso de infusión y decocción en 500 ml agua. Los extractos acuosos se liofilizaron para conocer el rendimiento y permitir el pesado del material para la administración de las diferentes dosis evaluadas.

Tabla No 5. Rendimiento obtenido para cada uno de los extractos de *Annona*.

Especie.	Rendimiento (g).	
	Infusión	Decocción.
<i>A. reticulata</i>	1.65 (3.30 %)	0.65 (1.30 %)
<i>A. cherimolia</i>	1.17 (2.34 %)	0.62 (1.24 %)
<i>A. purpurea</i>	0.99 (1.98 %)	0.46 (0.92 %)
<i>A. diversifolia</i>	1.11 (2.22 %)	1.07 (2.14 %)

**5.2.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y LOS FÁRMACOS.**

Los extractos acuosos, el pentobarbital (Nembutal<sup>®</sup>), el pentilentetrazol (Sigma), la buspirona (Sigma), así como los flavonoides de referencia rutina (sigma) y quercetina (sigma) se disolvieron en el vehículo que consistió de solución salina (s.s.) al 0.9%. La etosuximida (Sigma) se preparó como una suspensión con tween 80 al 0.5 % en s.s. Todos los compuestos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) y en reciente preparación en cada ensayo biológico. Los controles consistieron de s.s. o tween 80.

**5.2.3 GRUPOS EXPERIMENTALES.**

En cada uno de los ensayos biológicos los grupos constaron de al menos un mínimo de 6 ratones cada uno. Los extractos se evaluaron en las dosis de

30, 100, 300 y 1000 mg/Kg; la etosuximida en las dosis de 3, 10, 30, 100 y 300 mg/Kg; la rutina en dosis de 20, 30, 100 y 300 mg/Kg y la buspirona en dosis única de 10 mg/Kg. Para cada uno de los tratamientos, se utilizó un volumen de 0.1-0.2 ml/10 g de peso corporal. La rutina se utilizó como metabolito de referencia y es representado en todos los gráficos de respuesta depresora en la dosis de 300 mg/kg a la cual produjo efectos significativos. Sesenta  $\pm$  2 min después de la administración del extracto, rutina, buspirona, o etosuximida, se iniciaron las pruebas. Antes de llevar a cabo la evaluación del efecto ansiolítico de los extractos acuosos y el fármaco de referencia los ratones se evaluaron para conocer su actividad ambulatoria mediante el modelo de campo abierto.

### 5.2.4 MODELO DEL CAMPO ABIERTO.

Los ratones se colocaron individualmente en una caja de acrílico (23x40x20cm) cuyo base interior está dividida en 12 rectángulos (9.5 cm x 7 cm). El número de rectángulos explorados por cada ratón se registró en un intervalo de tiempo de 2 min. Una disminución significativa en el número de cuadros explorados (reducción de la actividad ambulatoria) se tomó como referencia de un efecto sedante (Prut y Belzung, 2003).

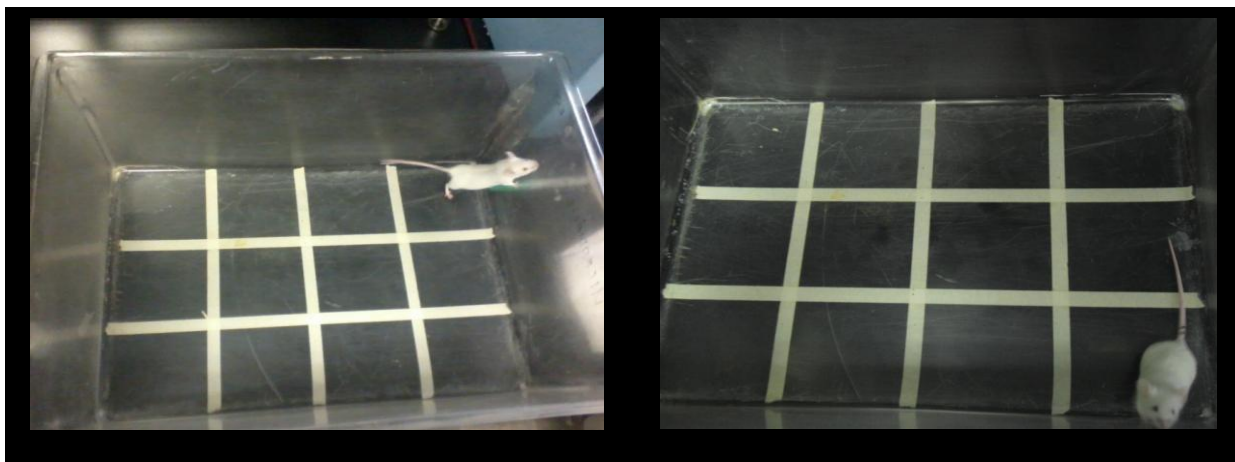


Figura 4. Modelo del campo abierto

### 5.2.5 MODELO DEL TABLERO CON ORIFICIOS.

Los ratones se colocaron individualmente sobre la superficie de una caja de madera (24x24x20cm). Dicha superficie está perforada con 16 orificios de 3 cm de diámetro igualmente distribuidos y se delimita por paredes de acrílico transparentes de 20 cm de alto. El número de veces que el ratón introduce la cabeza en alguno de los orificios se registra en un intervalo de tiempo de 3 min. La disminución significativa de la exploración de los orificios con respecto al control es indicativa de efecto como ansiolítico (Clark *et al.*, 1997).

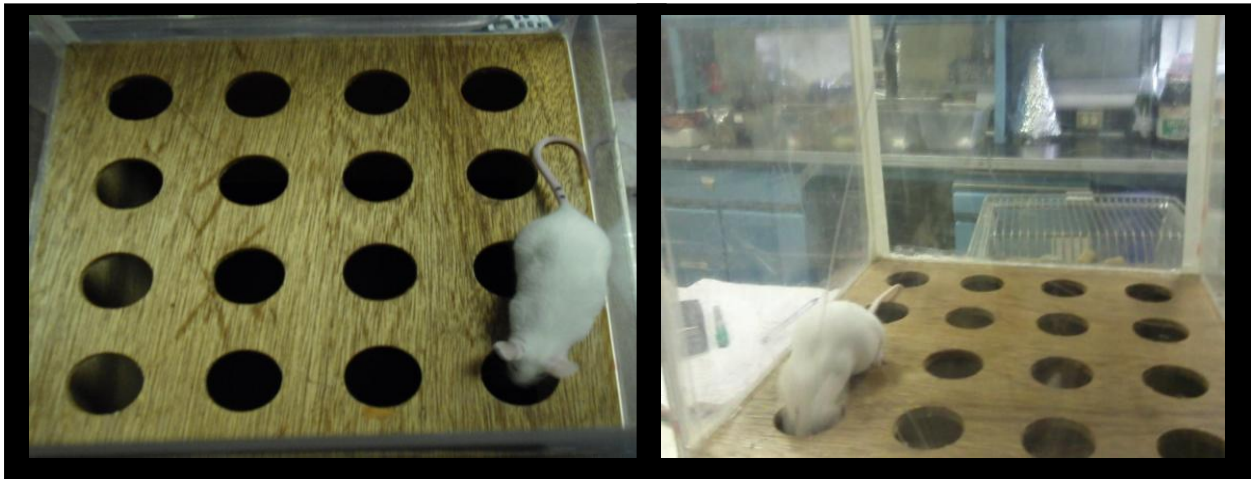


Figura 5. Modelo del tablero con orificios

### 5.2.6 MODELO DE EXPLORACIÓN EN CILINDRO.

Los ratones se colocaron individualmente dentro de un cilindro de vidrio (18 cm de altura x 12 cm de diámetro). El número de levantamientos espontáneos sobre ambas extremidades anteriores se registra durante 5 min. La disminución significativa del número de levantamientos con respecto al control es indicativa de efecto ansiolítico (Hiller y Zetler, 1996; Olivia *et al.*, 2004; Ugalde *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006).



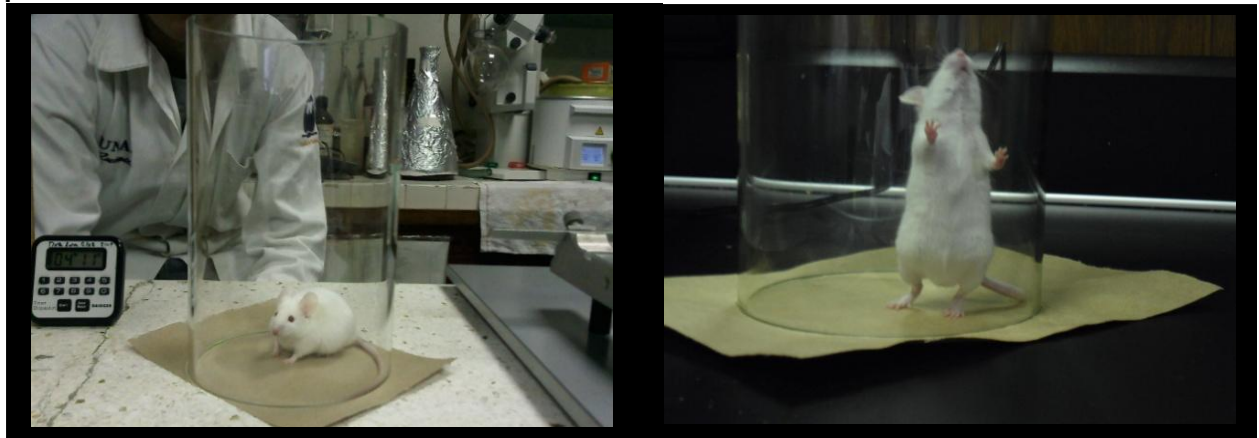


Figura 6. Modelo de exploración en cilindro

### 5.2.7 POTENCIACIÓN DE LA HIPNOSIS INDUCIDA CON PENTOBARBITAL SÓDICO.

Los ratones son administrados con 42 mg/Kg del sedante-hipnótico pentobarbital sódico (PS) y se colocan de manera individual en una caja de acrílico para registrar el inicio de incoordinación motora (latencia de sedación), seguida del registro del tiempo en que inicia la pérdida del reflejo de enderezamiento (latencia de hipnosis) y finalmente, del registro de tiempo en que se da la recuperación del reflejo de enderezamiento (recuperación de la hipnosis). La diferencia entre el tiempo registrado como inicio de la pérdida del reflejo de enderezamiento y recuperación del mismo es el dato de la duración de la hipnosis. Una disminución en las latencias o un aumento significativo en la duración de la hipnosis es indicativa de actividad depresora y potenciación del efecto central del depresor PS (González Trujano *et al.*, 1998).

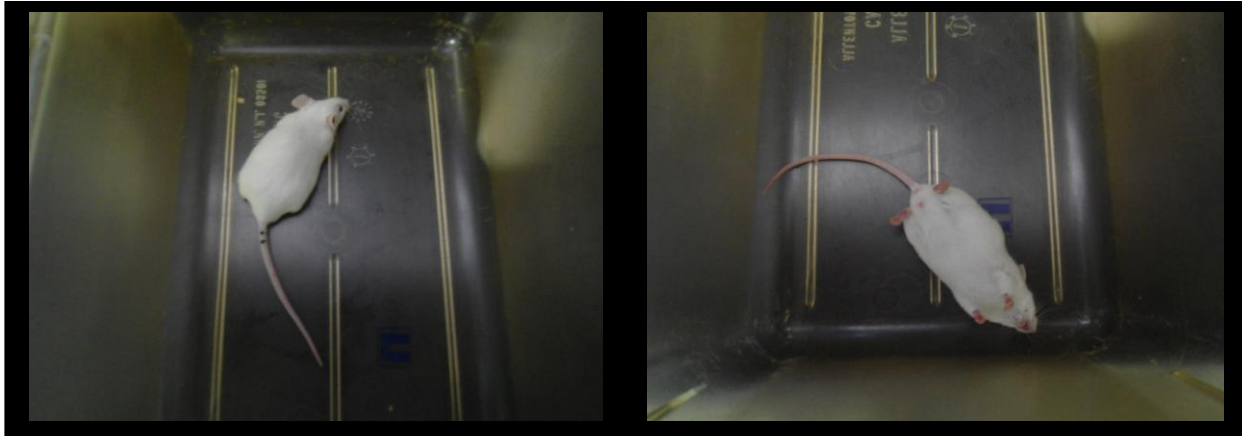


Figura 7. Prueba de potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico

### 5.2.8 MODELO DE INDUCCIÓN DE CONVULSIONES AGUDAS CLÓNICO-TÓNICAS CON PENTILENTETRAZOL.

Transcurridos 60 min de la administración del extracto, el agente convulsivante pentilentetrazol (PTZ, 80 mg/kg, i.p.) se administró para inducir crisis convulsivas de tipo clónico-tónico. Inmediatamente después de la inyección de PTZ los ratones se colocaron en cajas de acrílico transparente (20x30x15 cm) para la observación y registro de la latencia a la primer crisis mioclónica, a la primer crisis generalizada o clónico-tónica y a la crisis tónica. El registró se realizó durante 30 min después de la administración del PTZ (Kupferberg, 2001).

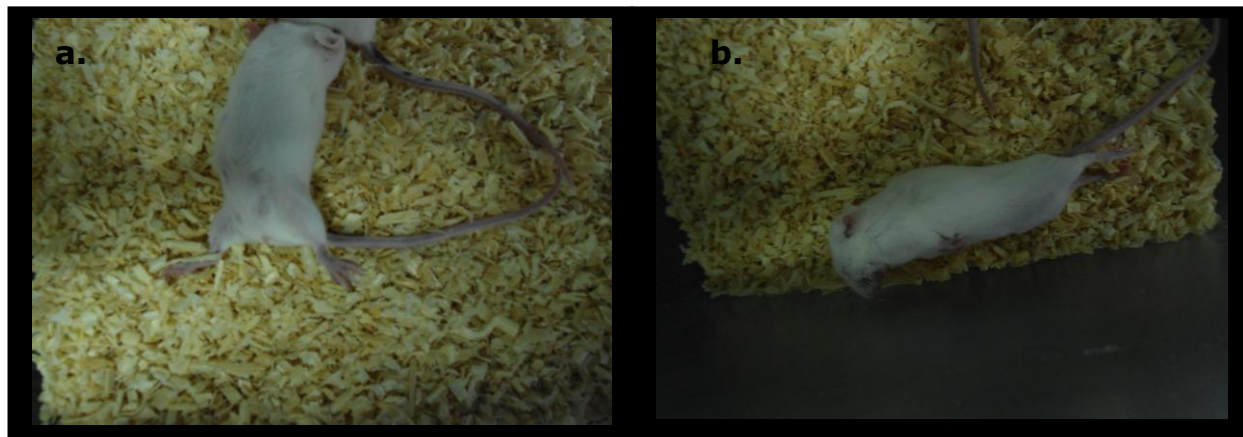


Figura 8. Crisis generalizada (a) y tónica (b) inducidas con PTZ

### 5.2.9 ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).

La determinación cualitativa de la naturaleza de los compuestos que están presentes en los diferentes liofilizados de los extractos acuosos de las *annonas* se realizó mediante la técnica de CCF. Las soluciones de cada uno de los extractos acuosos y el compuesto de referencia rutina se prepararon a una concentración de 1 mg/mL. Tanto para los liofilizados como para los compuestos de referencia el disolvente empleado fue agua destilada. Mediante el uso de un aplicador automático se aplicó un volumen de 22 y 5  $\mu$ L para cada extracto o compuesto de referencia, respectivamente, en bandas de 6 mm espaciadas por 5 mm de longitud. La fase móvil utilizada fue acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-metanol-agua 6.5:1.0:1.0:1.0:0.5 (v/v). Una vez que las placas se corrieron en la fase móvil, éstas se secaron a temperatura ambiente en una campana de extracción por aproximadamente 15 min. Posteriormente las placas fueron reveladas con una solución del reactivo 2'-aminoetildifenilborato al 1% metanol (NPR), la cual fue agregada por aspersión. Las placas se dejaron a temperatura ambiente en una campana de extracción por un tiempo de 5 min para permitir que se evaporara el exceso de reactivo e inmediatamente después fueron observadas y fotografiadas dentro de un gabinete con lámpara de luz UV a 365 nm. Las placas se analizaron en un densitómetro para CCF en el modo de fluorescencia y utilizando una lámpara de deuterio, los valores de  $R_f$  y los espectros de absorción de las muestras se obtuvieron en un rango de longitud de onda de 200-500 nm.

### 5.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) y se analizaron mediante el análisis de varianza (ANDEVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnett o ANDEVA por rangos seguida de la prueba de Dunn, en el caso de que los datos no pasaran la prueba de normalidad,

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

---

en comparación contra el grupo control. La significancia estadística se consideró para una  $P < 0.05$ .

**6. RESULTADOS.****6.1 ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA Y/O SEDANTE DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE ANNONA.****6.1.1 *Annona reticulata***

En la figura 9 se observa que en el modelo de campo abierto, tanto la infusión como la decocción de la *A. reticulata*, disminuyen significativamente la actividad ambulatoria en todas las dosis ensayadas (Fig. 9A). En el modelo de tablero con orificios, para la decocción se observa una reducción significativa en el número de orificios explorados en 100 ( $22.33 \pm 4.77$ ) y 300 mg/Kg ( $11.6 \pm 2.36$ ) y únicamente en 300 mg/Kg ( $7.5 \pm 0.99$ ) para la infusión (Fig. 9B). En el modelo de exploración en cilindro, el número de levantamientos disminuyó significativamente en la dosis de 100 y 300 mg/Kg tanto en infusión ( $4.33 \pm 1.56$  y  $0.00 \pm 0.00$ , respectivamente) como en la decocción ( $3.83 \pm 2.09$  y  $1.40 \pm 1.17$ , respectivamente) (Fig. 9C). Tanto la buspirona (10 mg/Kg) como el flavonoide rutina (300 mg/Kg) redujeron significativamente las conductas evaluadas en cada uno de los modelos (Fig. 9A-9C). El efecto ansiolítico y/o sedante de los extractos acuosos de *A. reticulata* en 300 mg/Kg fue similar a lo observado con buspirona (10 mg/kg) y rutina (300 mg/kg).

**6.1.2 *Annona cherimolia*.**

En la figura 10 se observa que tanto la infusión como la decocción de la *A. cherimolia* disminuyeron significativamente la actividad ambulatoria y el No de orificios explorados en todas las dosis probadas comparado con el control (Fig. 10A-B). En el modelo de exploración en cilindro, una disminución significativa en el número de levantamientos se presentó en 30 y 300 mg/Kg de la infusión ( $0.00 \pm 0.00$  y  $1.00 \pm 0.52$ , respectivamente) y de 100 a 300

mg/Kg de la decocción ( $0.50 \pm 0.22$  y  $3.17 \pm 1.38$ , respectivamente). El efecto de los extractos en 300 mg/Kg fue similar a lo obtenido con la buspirona (10 mg/Kg) y la rutina (300 mg/Kg) (Fig. 10C).

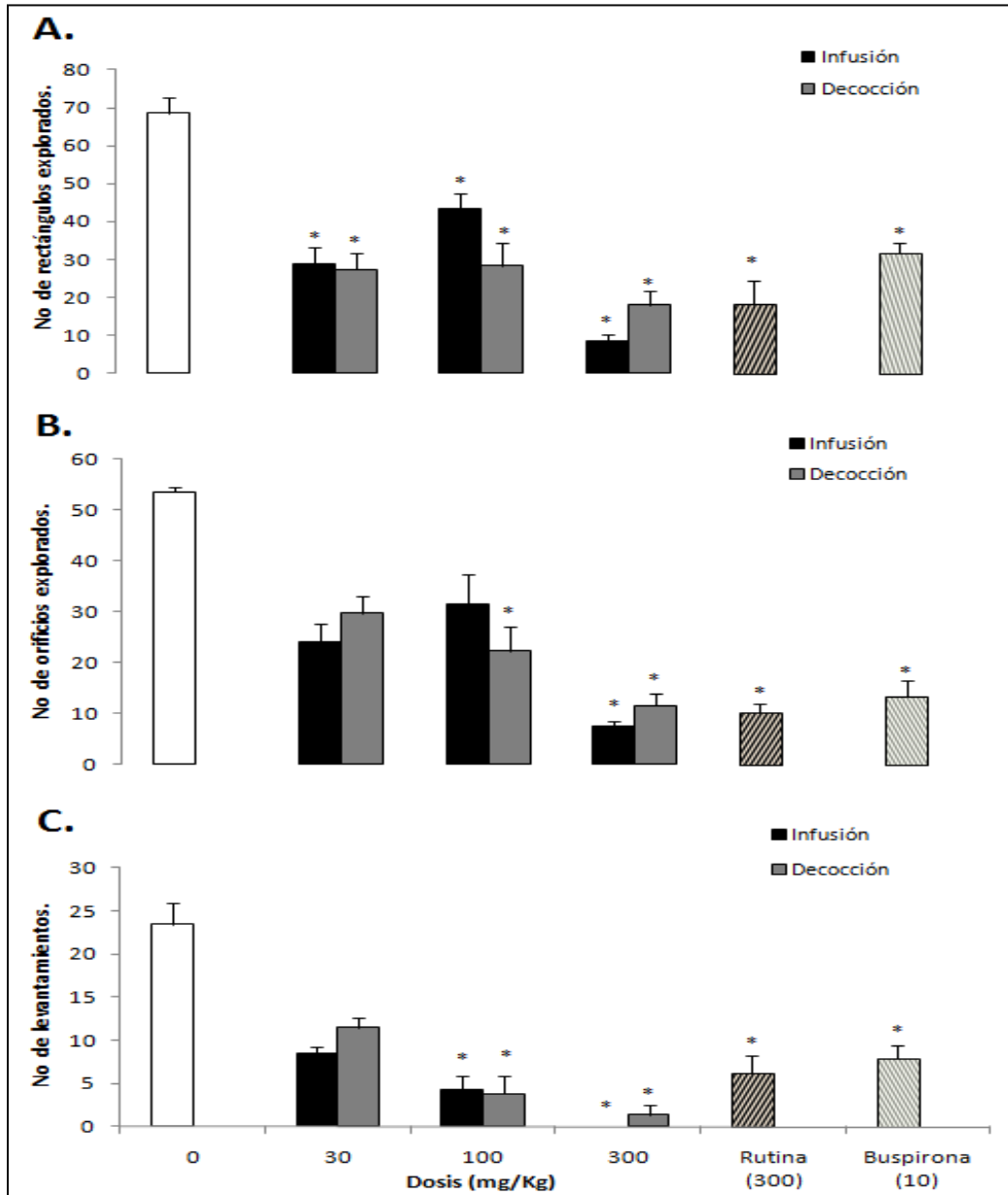


Figura 9. Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la *A. reticulata* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto (**A**), tablero con orificios (**B**) y cilindro (**C**). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  vs. control.

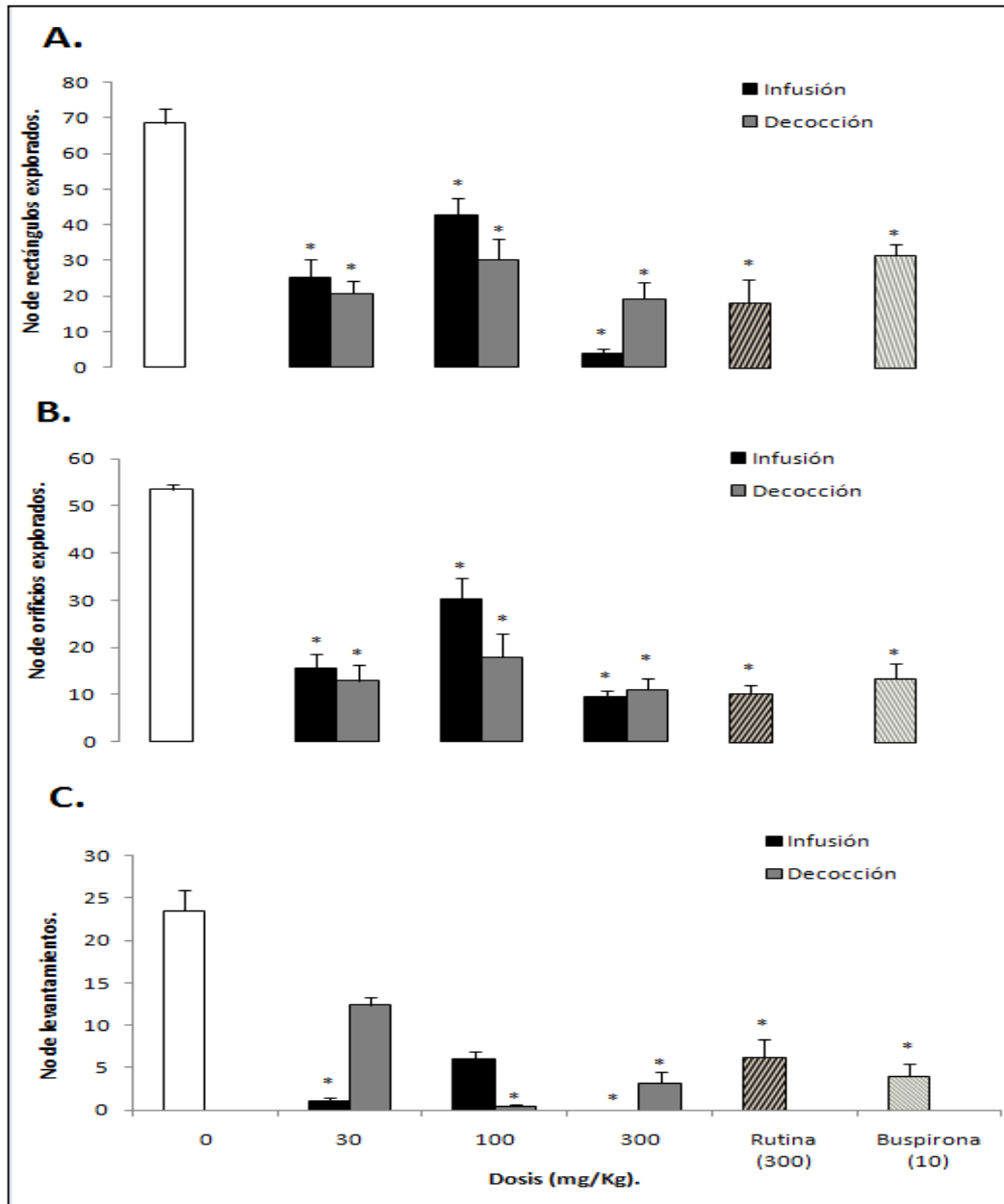


Figura 10. Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la *A. cherimolia* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cilindro (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05 vs. control.

### 6.1.3 *Annona purpurea*.

En la figura 11 se observa que tanto la infusión como la decocción disminuyen significativamente la actividad ambulatoria en todas las dosis ensayadas (Fig. 11A).

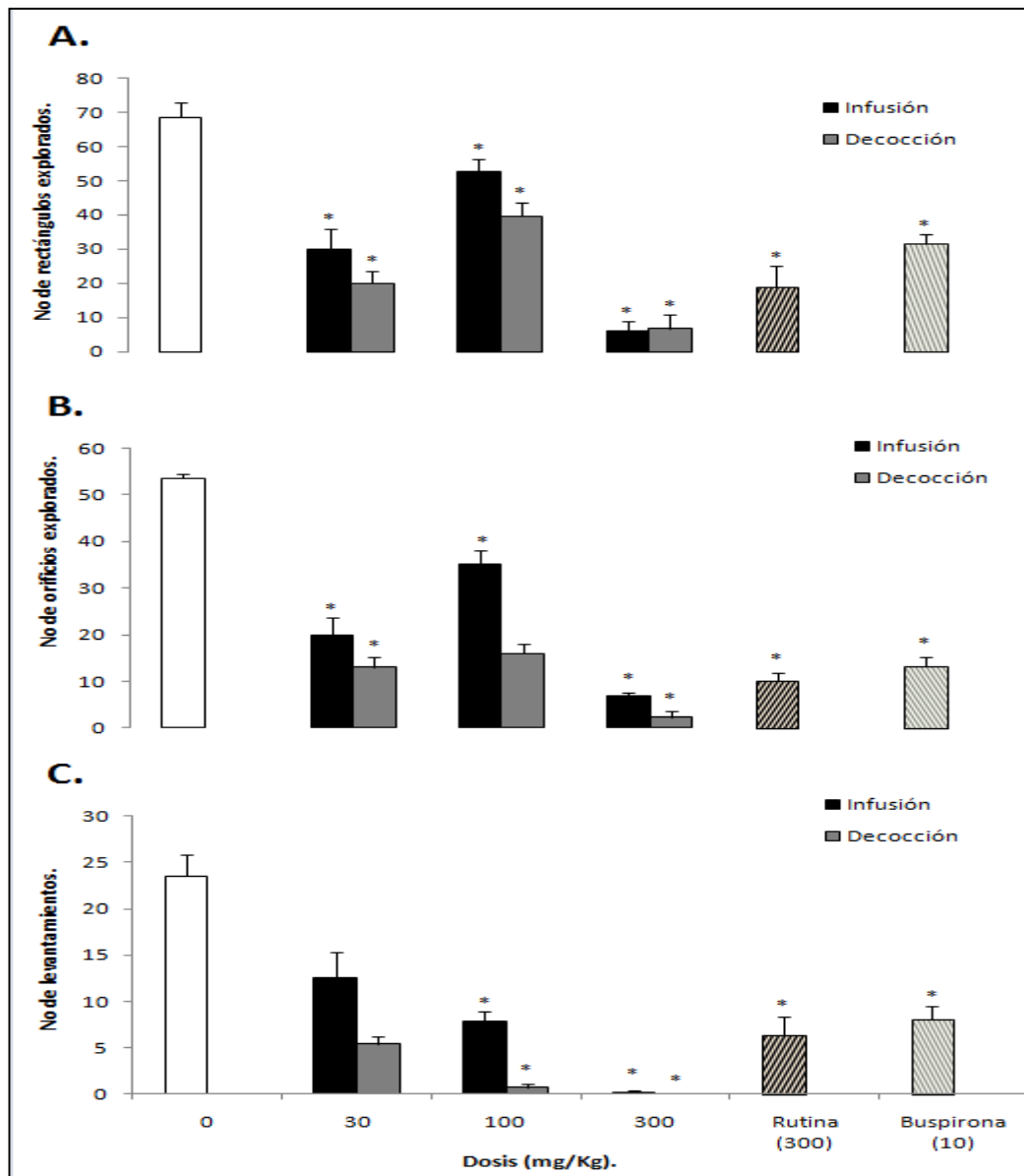


Figura 11. Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la *A. purpurea* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cilindro (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  vs. control.



Mientras que una reducción significativa fue observada en los orificios explorados en todas las dosis de la infusión y en las dosis de 30 ( $13.00 \pm 2.21$ ) y 300 mg/Kg ( $2.33 \pm 1.45$ ) para la decocción (Fig. 11B). En el caso del cilindro la disminución significativa en los levantamientos se obtuvo a las dosis de 100 y 300 mg/Kg, tanto en la infusión ( $7.83 \pm 1.00$  y  $0.20 \pm 0.20$ , respectivamente) como en la decocción ( $0.67 \pm 0.50$  y  $0.00 \pm 0.00$ , respectivamente) (Fig. 11C). El efecto ansiolítico y/o sedante de los extractos acuosos de la *A. purpurea*, en la dosis de 300 mg/Kg, fue mayor al alcanzado por la buspirona y la rutina en cada uno de los modelos evaluados.

### 6.1.4 *Annona diversifolia*.

En la figura 12 se observa que tanto la infusión como la decocción de la *A. diversifolia* en todas las dosis probadas disminuyeron significativamente la actividad ambulatoria (Fig. 12A) en comparación con el control. Por otra parte, se observa una reducción significativa en el número de orificios explorados (Fig. 12B) en todas las dosis evaluadas de la decocción, y únicamente en 300 mg/Kg ( $1.17 \pm 0.83$ ) para la infusión (Fig. 12C). En el caso del cilindro la disminución significativa en los levantamientos se obtuvo en 100 y 300 mg/Kg tanto en infusión ( $4.20 \pm 1.32$  y  $1.17 \pm 0.83$ , respectivamente) como en decocción ( $1.00 \pm 0.55$  y  $1.83 \pm 1.50$ , respectivamente) (Fig. 11C). El efecto ansiolítico y/o sedante de los extractos acuosos de la *A. diversifolia* en 300 mg/Kg fue mayor al alcanzado por la buspirona (10 mg/Kg) y la rutina (300 mg/Kg) en el modelo del campo abierto y en el de exploración en cilindro (Fig. 12A y 12C).

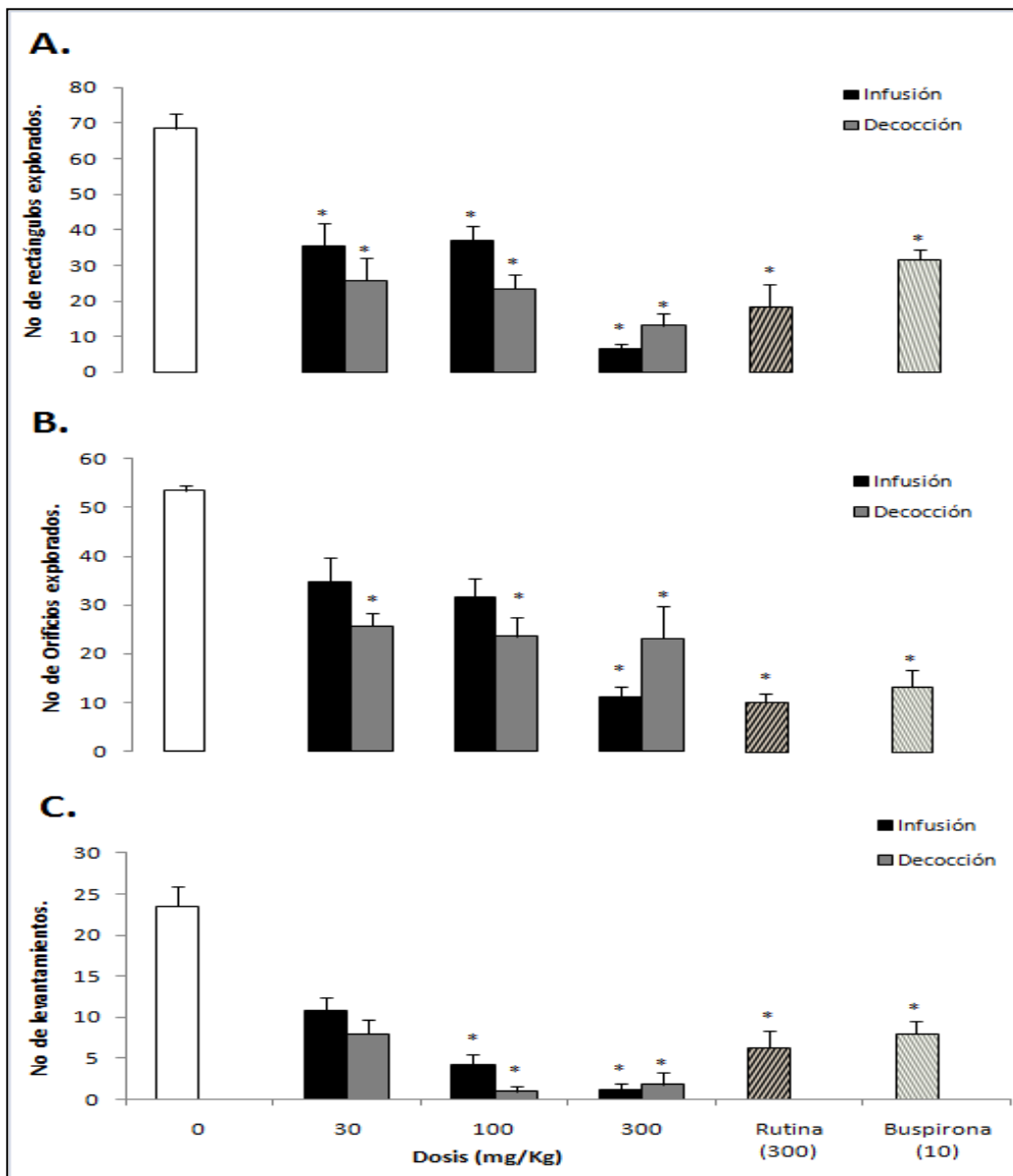


Figura 12. Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos acuosos de la *A. diversifolia* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cilindro (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05 vs. control.

### 6.1.5 RUTINA

En la figura 13 se muestra la evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante de del flavonoide rutina en comparación con el grupo control. En

estos gráficos se observa que solo 300 mg/Kg de rutina producen reducción significativa en la actividad ambulatoria ( $18.30 \pm 4.88$ ) y en el número de levantamientos ( $6.29 \pm 2.00$ ). Además de una disminución dosis dependiente y significativa en el número de orificios explorados para todas las dosis evaluadas (Fig. 13C).

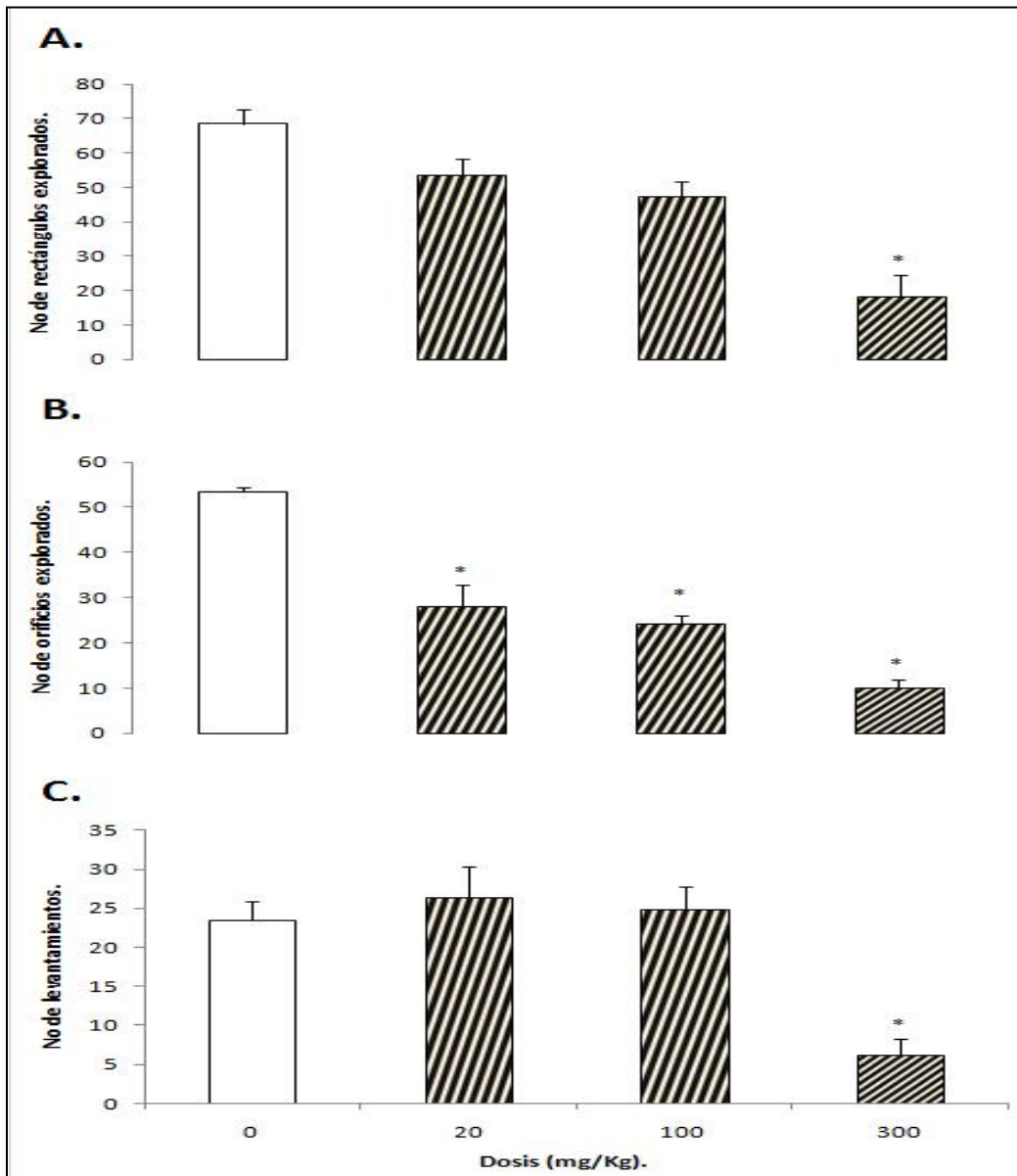


Figura 13. Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del flavonoide rutina (20, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cilindro (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05 vs. control.

**6.2 POTENCIACIÓN DEL SUEÑO INDUCIDO CON PENTOBARBITAL SÓDICO EN PRESENCIA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS ANONAS.****6.2.1 *Annona reticulata*.**

En la figura 14 se muestra que únicamente la decocción de la *A. reticulata* disminuyó significativamente la latencia de sedación en las dosis probadas (Fig. 14A) en comparación con el control. Mientras que se presenta una reducción significativa en latencia de hipnosis en 100 mg/Kg, tanto en infusión ( $2.55 \pm 0.07$  min) como en decocción ( $2.80 \pm 0.15$  min) (Fig. 14B). En tanto a la duración de la hipnosis se observó un aumento significativo en 30 y 300 mg/Kg en el caso de la infusión ( $44.03 \pm 4.96$  y  $56.63 \pm 4.92$  min, respectivamente), y en las dosis probadas en el caso de la decocción (Fig. 14C).

La buspirona (10 mg/Kg) y el flavonoide rutina (300 mg/Kg) produjeron aumento significativo con respecto al control en la duración de la hipnosis. Ninguna disminuyó la latencia de sedación o de hipnosis en las dosis probadas. En el caso de la duración de la hipnosis, los extractos acuosos (infusión y decocción) en 300 mg/Kg presentaron un efecto mayor al producido con buspirona y rutina.

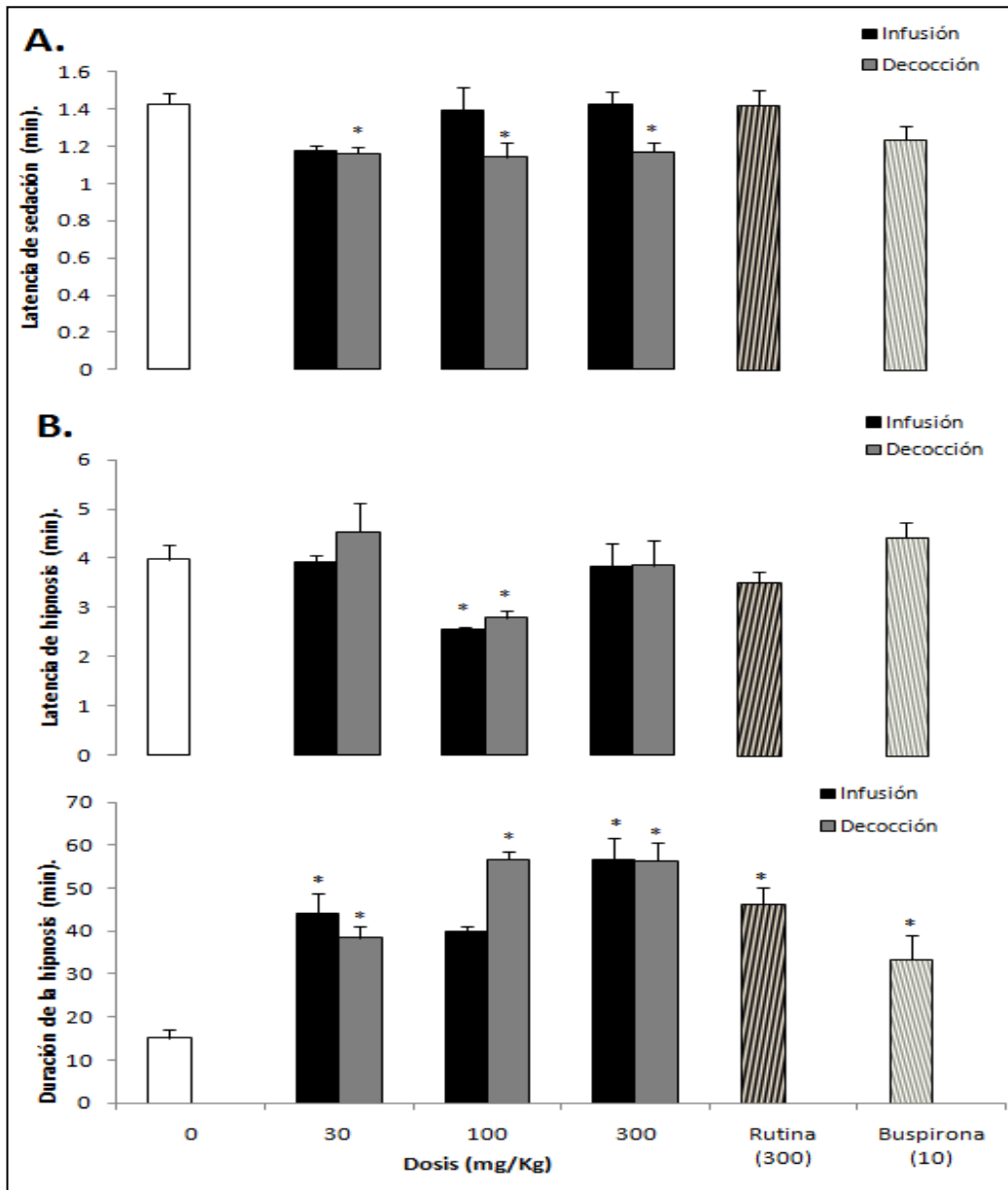


Figura 14. Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la *A. reticulata* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), bupirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. En el gráfico se muestra la latencia de sedación (A), la latencia de hipnosis (B) y la duración de la hipnosis (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  ANADEVa vs. control.

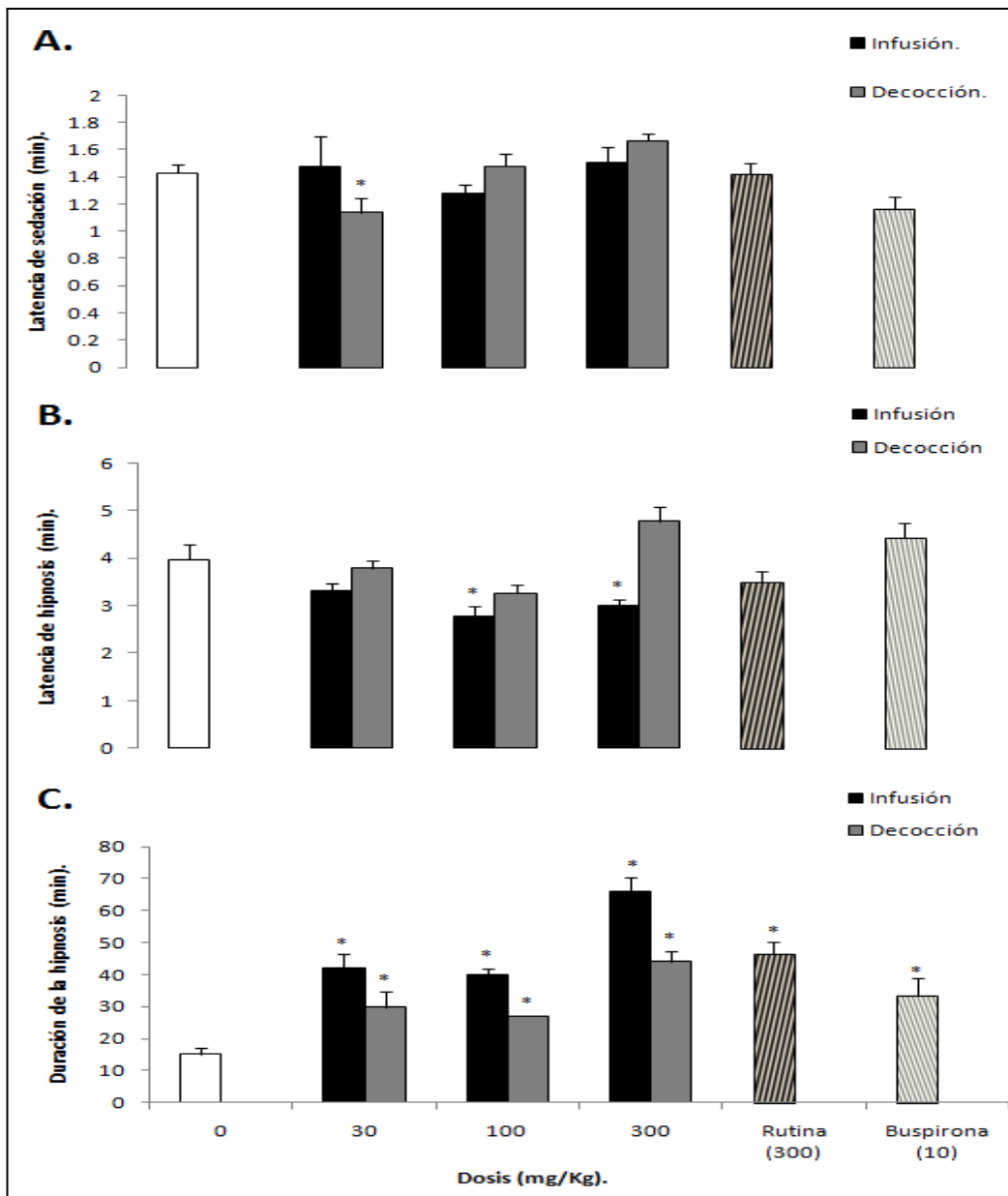
6.2.2 *Annona cherimolia*.

Figura 15. Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la *A. cherimolia* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. En el gráfico se muestra la latencia de sedación (A), la latencia de hipnosis (B) y la duración de la hipnosis (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  ANDEVA vs. control.

En la figura 15 se observa que solo 30 mg/Kg de la decocción disminuyo significativamente la latencia de sedación ( $1.14 \pm 0.11$  min) con respecto al

control. Por otra parte, 100 mg/Kg de la infusión ( $2.77\pm 0.23$  min) redujeron significativamente la latencia de hipnosis. En el caso de la duración de la hipnosis, un aumento significativo se produjo en las dosis evaluadas, tanto en infusión como en decocción. La infusión en 300 mg/Kg presentó un efecto mayor al de buspirona y rutina.

### **6.2.3 *Annona purpurea.***

En la figura 16 se observa que solo 100 mg/Kg de la infusión disminuyó significativamente la latencia de sedación ( $1.12\pm 0.05$  min) con respecto al control (Fig. 16A). La dosis de 100 mg/Kg de la infusión ( $2.50\pm 0.15$  min) y de la decocción ( $2.68\pm 0.15$  min) redujo significativamente la latencia de hipnosis (Fig. 16B). En el caso de la duración de la hipnosis, se presenta un aumento significativo en las dosis evaluadas, tanto en infusión como en decocción. Para esta evaluación, la infusión en 300 mg/Kg ( $51.07\pm 6.71$  min) y la decocción desde 100 mg/Kg ( $54.71\pm 4.00$  min) producen un efecto mayor al de buspirona y rutina.

### **6.2.4 *Annona diversifolia***

En la figura 17 se observa que ninguna de las dosis evaluadas disminuyó significativamente la latencia de sedación con respecto al control (Fig. 17A). Por otra parte, se observa con 300 mg/Kg de la decocción ( $6.17\pm 0.70$  min) un aumento significativo para latencia de hipnosis (Fig. 17B). Mientras que un aumento significativo se presentó desde de 100 mg/Kg, tanto en infusión ( $33.98\pm 6.19$  min) como en decocción ( $49.51\pm 2.44$  min) (Fig. 17C) en la duración de hipnosis. La infusión en 300 mg/Kg ( $47.94\pm 6.04$  min) y la decocción en 100 mg/Kg produjeron un efecto mayor al alcanzado por buspirona y rutina (Fig. 17C).

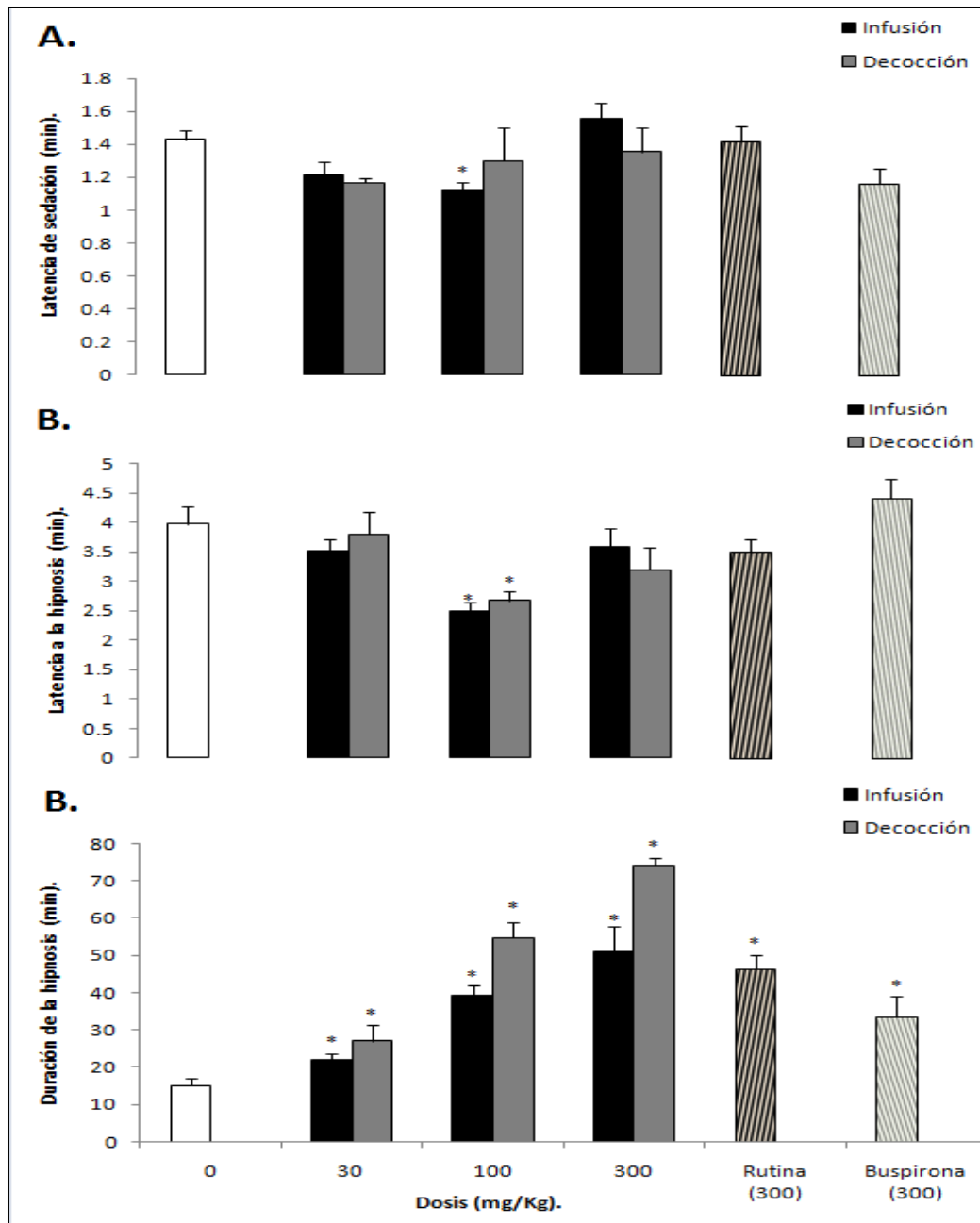


Figura 16. Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la *A. purpurea* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. En el gráfico se muestra la latencia de sedación (**A**), la latencia de hipnosis (**B**) y la duración de la hipnosis (**C**). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05 ANADEV A vs. control.



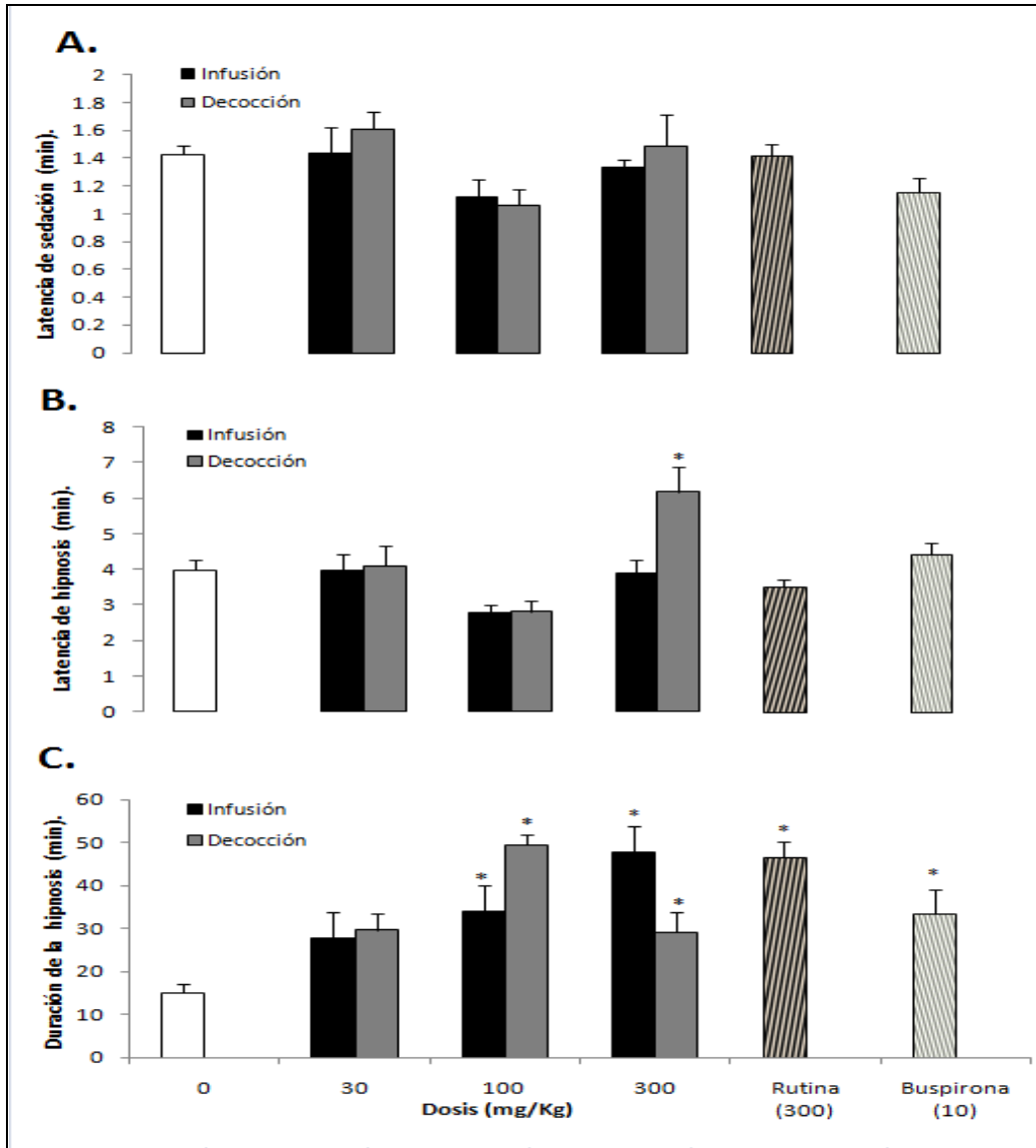


Figura 17. Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico de los extractos acuosos de la *A. diversifolia* (30, 100, 300 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), buspirona (10 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control. En el gráfico se muestra la latencia de sedación (A), la latencia de hipnosis (B) y la duración de la hipnosis (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  ANDEVA vs. control.

### 6.2.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FLAVONOIDE RUTINA EN LA POTENCIACIÓN DEL SUEÑO INDUCIDO CON PENTOBARBITAL SÓDICO.

En la figura 18 se observa que la latencia de sedación y de hipnosis no se modifican en presencia de rutina con respecto al control. La cual aumento

significativamente la latencia de hipnosis en 300 mg/Kg (razón por la cual se eligió ésta dosis para hacer la comparación en eficacia con los extractos acuosos de las annonas).

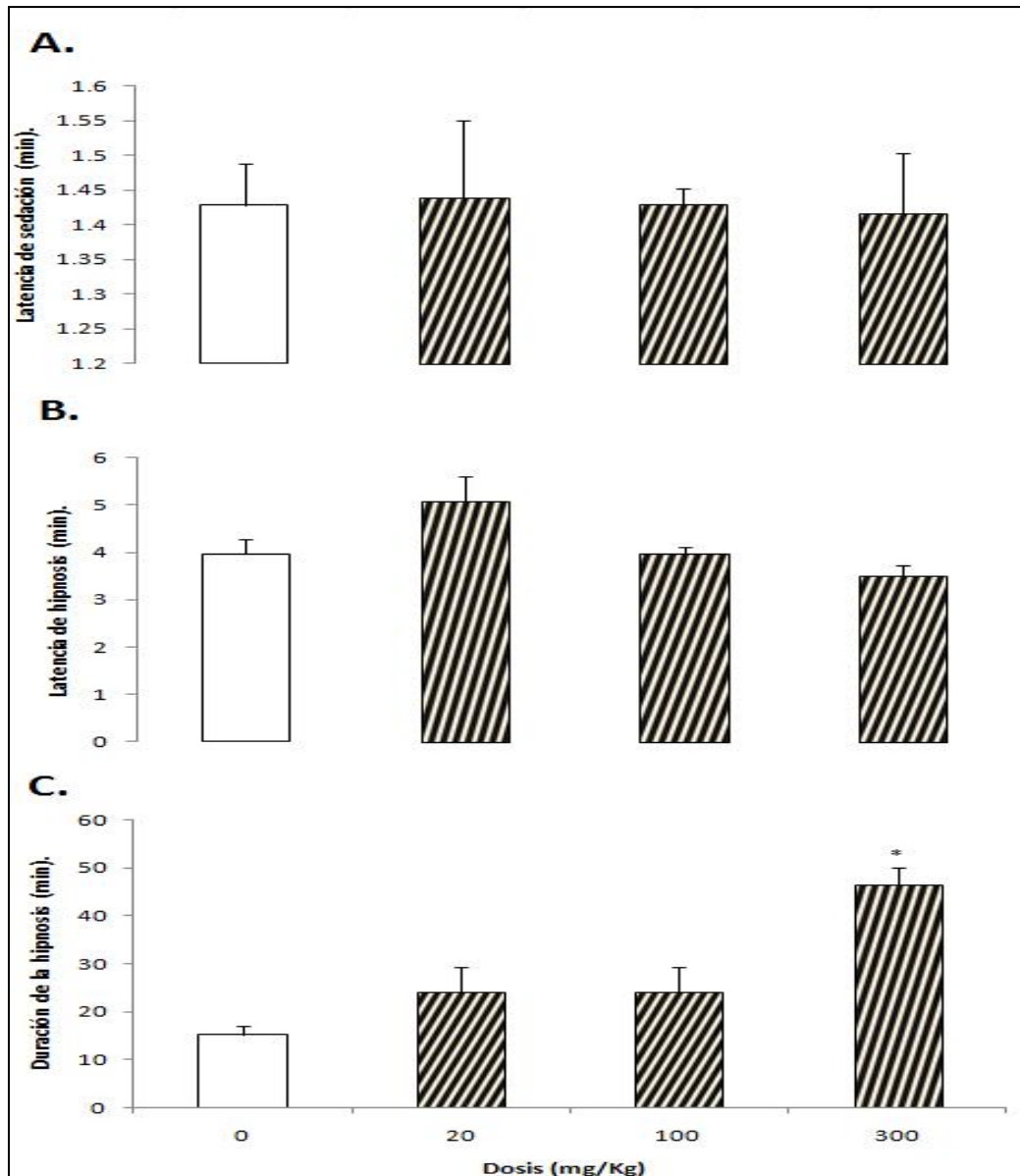


Figura 18. Evaluación de la potenciación del sueño inducido con pentobarbital sódico del flavonoide rutina (20, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control. En el gráfico se muestra la latencia de sedación (A), la latencia de hipnosis (B) y la duración de la hipnosis (C). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  ANDEVA vs. control.

### 6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIES DE *ANNONA*.

#### 6.3.1 *Annona reticulata*.

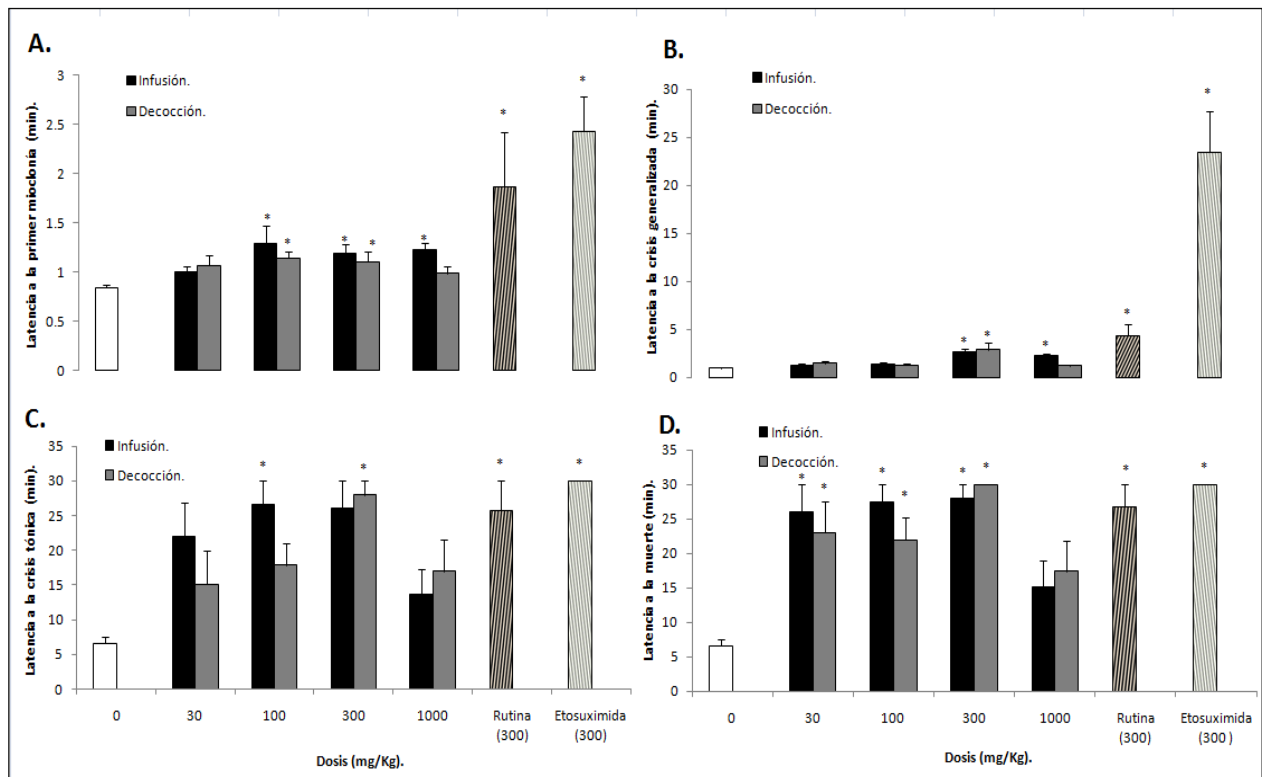


Figura 19. Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la *A. reticulata* (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de ethosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.). En el gráfico se muestra la latencia a la 1er. mioclonía (A), la latencia a la 1er. crisis generalizada (B), la latencia a la 1er. crisis tónica (C) y la latencia a la muerte (D). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ , ANDEVA vs. control.

La figura 19 muestra que el extracto acuoso de la *A. reticulata* obtenido por infusión presenta un efecto significativo a partir de 100 mg/Kg ( $1.29 \pm 0.18$  min) en la latencia a la 1er. mioclonia (Fig. 19A), y a partir de 300 mg/Kg ( $2.63 \pm 0.30$  min) en la latencia a la 1er. crisis generalizada (Fig. 19B). El efecto fue significativo solo en 100 mg/Kg ( $26.54 \pm 3.56$  min) en la latencia a

la 1er. crisis tónica (Fig. 19C), y en 30 ( $26.05 \pm 3.95$  min), 100 ( $27.48 \pm 0.18$  min) y 300 mg/Kg ( $28 \pm 2$  min) en la latencia a la muerte (Fig. 19D).

En la decocción, el efecto fue significativo en 100 ( $1.14 \pm 0.07$  min) y 300 mg/Kg ( $1.1 \pm 0.11$  min) en la latencia a la 1er. mioclonia; de 300 mg/Kg en la latencia a la 1er. crisis generalizada ( $2.91 \pm 0.73$  min) y la 1er. crisis tónica ( $27.94 \pm 2.96$  min); y de 30 ( $23.1 \pm 4.5$  min), 100 ( $21.93 \pm 3.33$  min) y 300 mg/Kg ( $30 \pm 0.00$  min) en la latencia a la muerte. En la dosis de 1000 mg/Kg se presenta una reducción del efecto protector para la infusión en la latencia a la crisis generalizada y tónica, y para la decocción en todas las crisis convulsivas evaluadas.

La rutina y la etosuximida en 300 mg/Kg, presentaron mayor eficacia que los extractos acuosos de la *A. reticulata*, en la latencia a la 1er. mioclonia y crisis generalizada. En 100 y 300 mg/Kg de la infusión y 100 mg/Kg de la decocción mostraron mayor eficacia que la rutina, tanto en la latencia a la 1er. crisis generalizada como en la muerte, mientras que dicha eficacia es igual a la que presenta la etosuximida (100% de eficacia). Los tratamientos se compararon estadísticamente con su respectivo control.

### **6.3.2 *Annona cherimolia*.**

La figura 20 muestra que la infusión produce efecto significativo a partir de 100 mg/Kg ( $1.28 \pm 0.18$  min) en la latencia a la 1er. mioclonia, y a partir de 30 mg/Kg ( $1.14 \pm 0.06$  min) en la crisis generalizada. Por otro lado, dicho efecto es significativo solo en 100 mg/Kg ( $27.13 \pm 2.87$  min) en la latencia a la 1er. crisis tónica y en 100 ( $27.42 \pm 2.6$  min) y 300 mg/Kg ( $23.75 \pm 4.1$  min) en la latencia a la muerte. En 1000 mg/Kg se muestra una reducción no significativa del efecto protector de la infusión con respecto al control, tanto en la latencia a la 1er. crisis tónica como en la muerte.

## 6. RESULTADOS.

En el caso de la decocción, el efecto fue significativo en 100 mg/Kg ( $1.87 \pm 0.45$  min) en la latencia a la 1er. mioclonía; y en 100 ( $3.54 \pm 0.92$  min) y 1000 mg/Kg ( $2.35 \pm 0.29$  min) en la crisis generalizada; y de 30 y 100 mg/Kg en la crisis tónica ( $24.32 \pm 3.82$  y  $25.89 \pm 3.66$  min, respectivamente) y la muerte ( $24.93 \pm 3.77$  y  $28.00 \pm 1.87$  min, respectivamente). En 300 y 1000 mg/Kg se presenta una reducción no significativa del efecto protector de la decocción con respecto al control (con excepción de la crisis generalizada, en la cual 1000 mg/Kg incrementan significativamente con respecto al control).

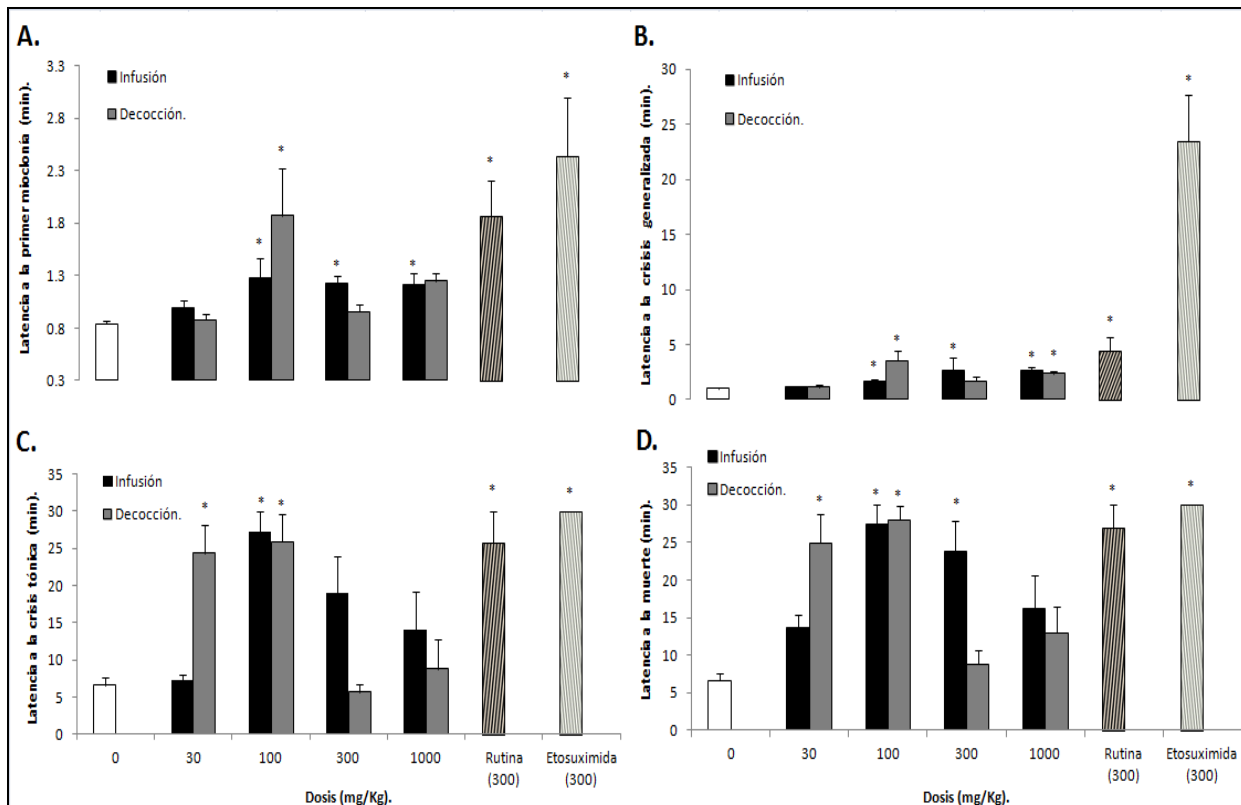


Figura 20. Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la *A. cherimolia* (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.). En el gráfico se muestra la latencia a la 1er. mioclonía (A), la latencia a la 1er. crisis generalizada (B), la latencia a la 1er. crisis tónica (C) y la latencia a la muerte (D). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ , ANDEVA vs. control.

La rutina y la etosuximida en 300 mg/Kg exhiben mayor eficacia que los extractos en la latencia a la 1er. mioclonía y crisis generalizada. Dicha

diferencia en eficacia se reduce en la latencia a la 1er. crisis tónica y a la muerte. Incluso a 100 mg/Kg de la infusión y decocción se observa una mayor eficacia que la rutina, tanto en la latencia a la 1er. crisis tónica como a la muerte, mientras que dicha eficacia es igual a la que presenta la etosuximida (100 % de eficacia).

### **6.3.3 *Annona purpurea.***

La figura 21 muestra que la infusión produce efecto significativo en 300 y 1000 mg/Kg en la latencia a la 1er. mioclonia ( $1.28 \pm 0.13$  y  $1.2 \pm 0.11$  min, respectivamente) y a la crisis generalizada ( $1.64 \pm 0.18$  y  $1.93 \pm 0.41$  min, respectivamente). Dicho efecto es significativo en 300 mg/Kg en la latencia a la 1er. crisis tónica ( $15.82 \pm 3.04$  min) y a la muerte ( $25.25 \pm 4.75$  min). En 1000 mg/Kg se presenta reducción no significativa del efecto protector de la infusión con respecto al control, tanto en la latencia a la 1er. crisis tónica como a la muerte.

En el caso de la decocción, el efecto es significativo en 300 ( $2.02 \pm 0.53$  min) y 1000 mg/Kg ( $1.19 \pm 0.08$  min) en la latencia a la 1er. mioclonia; de 300 mg/Kg en la latencia a la 1er. crisis generalizada ( $15.72 \pm 6.39$  min), crisis tónica ( $25.10 \pm 24.1$  min) y a la muerte ( $27.33 \pm 1.98$  min). En 1000 mg/Kg, se reduce no significativamente el efecto protector de la decocción con respecto al control (con excepción de la crisis mioclónica, en la cual 1000 mg/Kg producen un incremento significativo).

La etosuximida en 300 mg/Kg exhibe mayor eficacia que las dosis probadas de los extractos en el retardo de la latencia a la 1er. mioclonia y crisis generalizada. Dicha diferencia en eficacia se reduce en la latencia a la muerte, en donde la eficacia de los extractos en 100 mg/Kg, tanto en infusión como decocción, es igual a la de etosuximida (100 % de eficacia). Por otra parte, 300 mg/Kg de la decocción presento eficacia mayor a la

alcanzada por la misma dosis de rutina en el retardo de la latencia a la 1er. mioclonia y crisis generalizada.

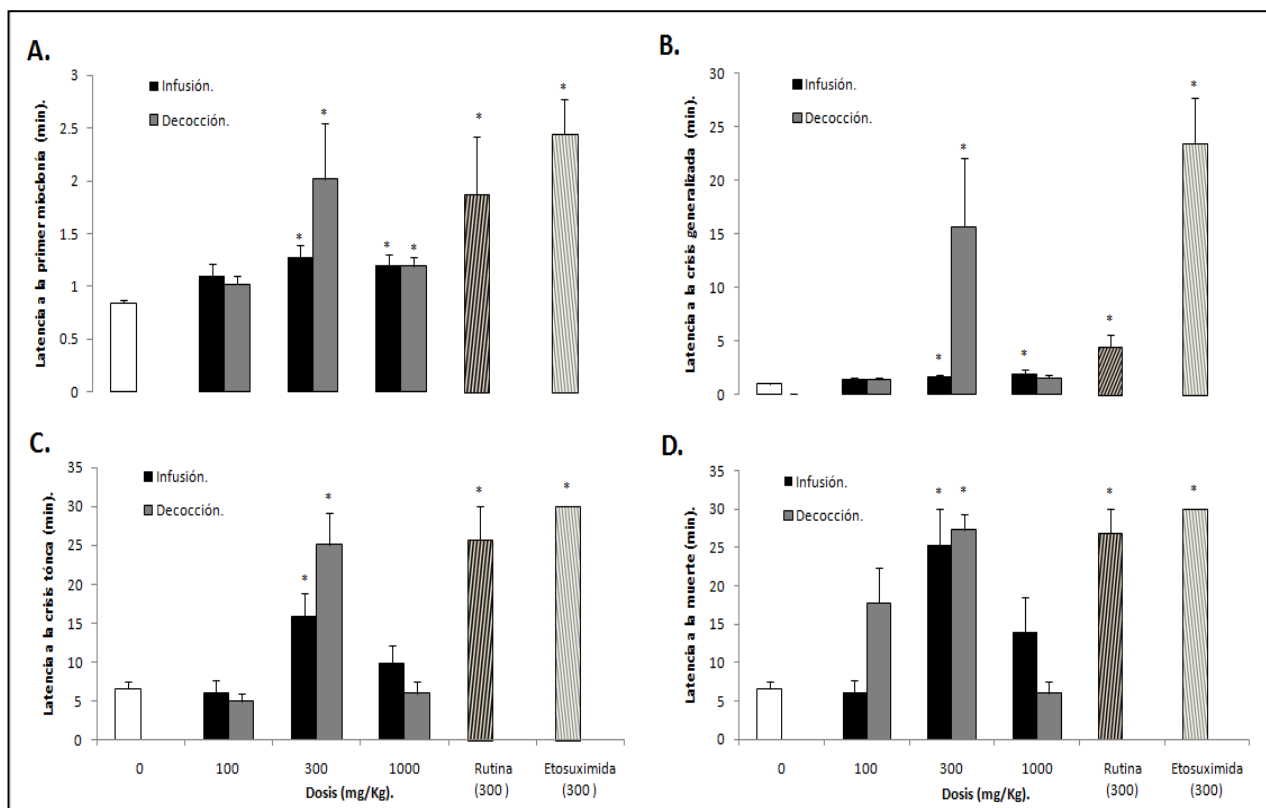


Figura 21. Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la *A. purpurea* (100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.). En el gráfico se muestra la latencia a la 1er. mioclonia (A), la latencia a la 1er. crisis generalizada (B), la latencia a la 1er. crisis tónica (C) y la latencia a la muerte (D). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05, ANDEVA vs. control.

### 6.3.4 *Annona diversifolia*.

La figura 22 muestra que la infusión produce efecto significativo en 300 y 1000 mg/Kg en la latencia a la 1er. mioclonia ( $1.20 \pm 0.06$  y  $1.71 \pm 0.24$  min, respectivamente) y crisis generalizada ( $2.39 \pm 0.77$  y  $9.63 \pm 4.28$  min, respectivamente). Por otro lado, dicho efecto es significativo solo en 100 mg/Kg en la latencia a la muerte ( $25.35 \pm 4.65$  min).

Por otra parte, la decocción muestran un efecto significativo en 300 y 1000 mg/Kg en la latencia a la 1er. mioclonia ( $1.15 \pm 0.04$  y  $1.65 \pm 0.09$  min,

## 6. RESULTADOS.

respectivamente) y crisis generalizada ( $4.41 \pm 0.52$  y  $5.76 \pm 0.84$  min, respectivamente); y de 30 ( $14.71 \pm 0.74$  min), 100 ( $21.02 \pm 3.6$  min) y 300 mg/Kg ( $18.6 \pm 1.74$  min) en la latencia a la muerte.

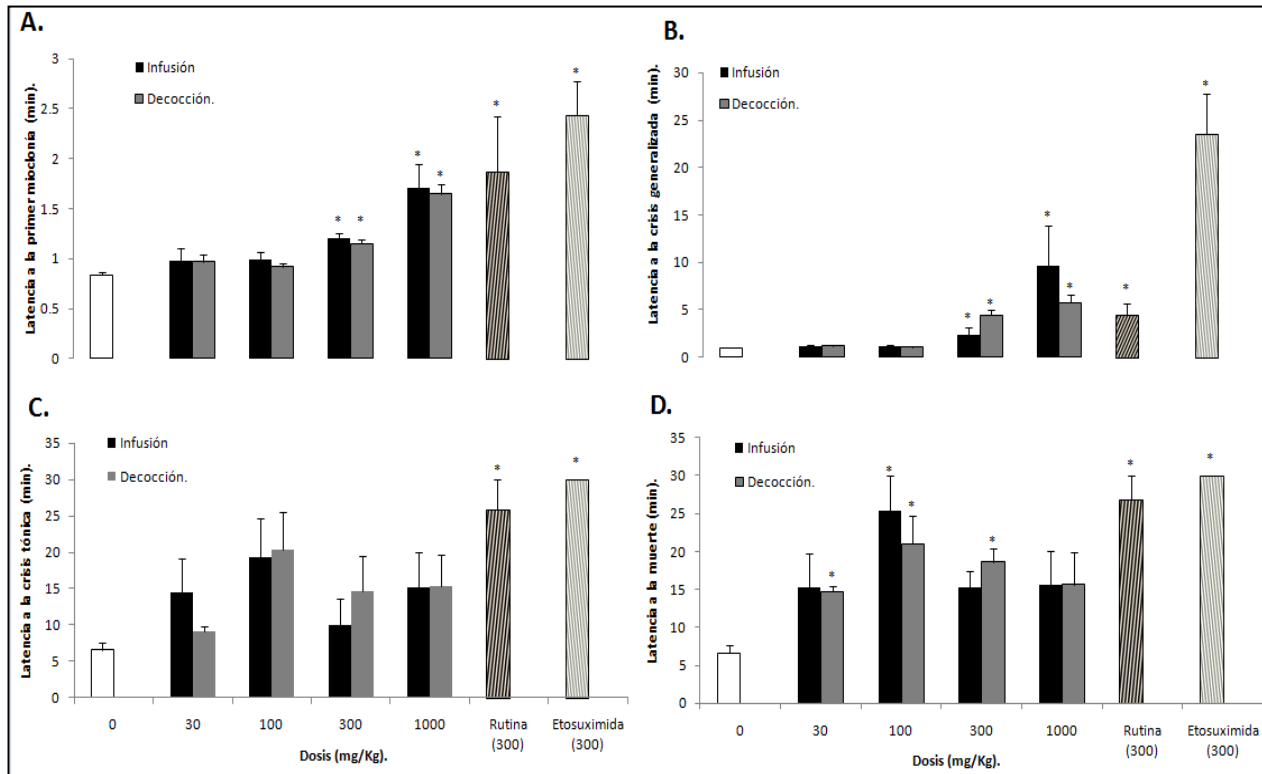


Figura 22. Evaluación de la actividad anticonvulsiva de los extractos acuosos de la *A. diversifolia* (30, 100, 300 y 1000 mg/Kg obtenidos por infusión y decocción), de etosuximida (300 mg/Kg) y rutina (300 mg/Kg) vía i.p. en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.). En el gráfico se muestra la latencia a la 1er. mioclonía (A), la latencia a la 1er. crisis generalizada (B), la latencia a la 1er. crisis tónica (C) y la latencia a la muerte (D). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05, ANDEVA vs. control.

Etosuximida en 300 mg/Kg exhibe mayor eficacia que las dosis probadas de los extractos en las crisis convulsivas evaluadas. En la latencia a la 1er. crisis generalizada, 1000 mg/Kg de la infusión y decocción produjeron mayor eficacia a la alcanzada por la rutina.



### 6.3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA DEL FÁRMACO DE REFERENCIA ETOSUXIMIDA.

En la figura 23 se muestra un comportamiento dosis-dependiente y significativo en 300 mg/Kg para etosuximida (razón por la cual se usó esta dosis para hacer la comparación en eficacia con los extractos acuosos de las anonas).

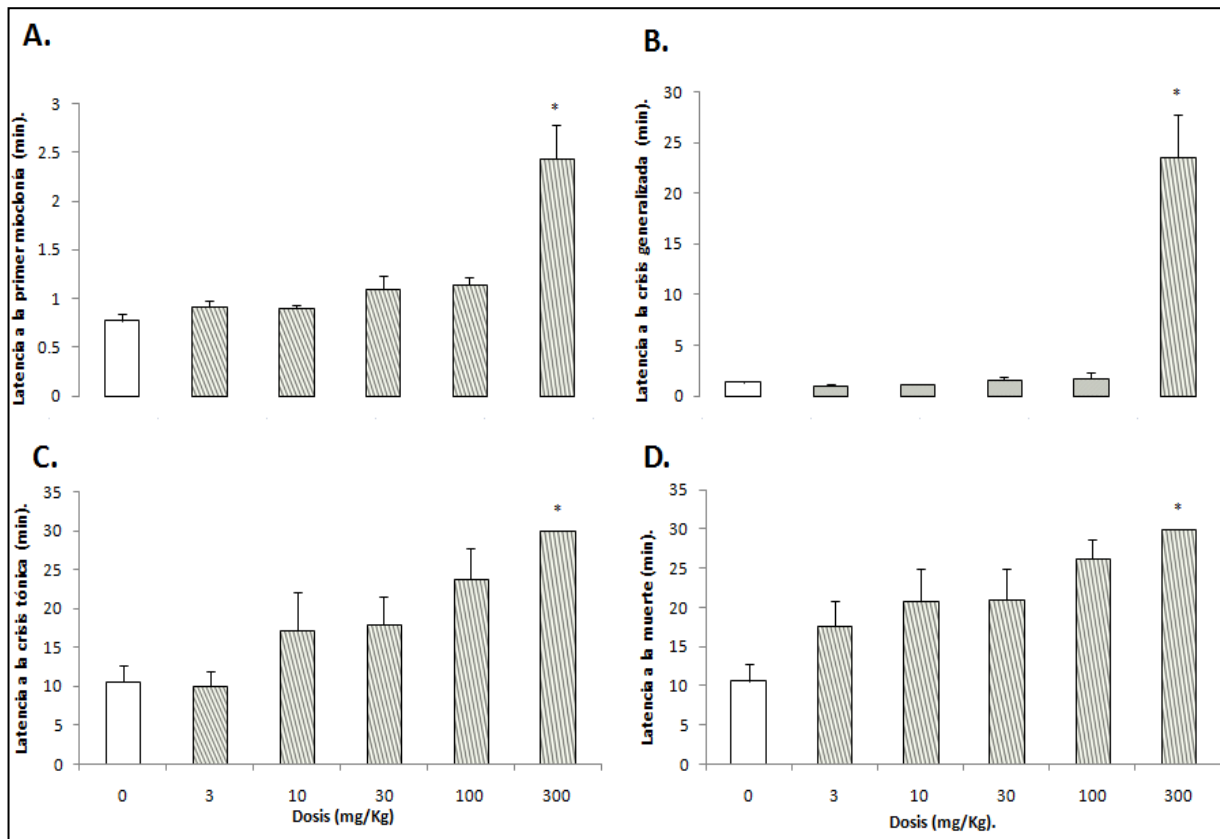


Figura 23. Evaluación de la actividad anticonvulsiva del fármaco de referencia etosuximida (3, 10, 30, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.) En el gráfico se muestra la latencia a la 1er. mioclonía (A), la latencia a la 1er. crisis generalizada (B), la latencia a la 1er. crisis tónica (C) y la latencia a la muerte (D). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ , ANDEVA vs. control.

### 6.3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA DEL FLAVONOIDE RUTINA.

En la figura 24 se observa un comportamiento dosis dependiente y significativo en la dosis de 300 mg/Kg (razón por la cual se eligió esta dosis

para hacer la comparación en eficacia con los extractos acuosos de las *annonas*).

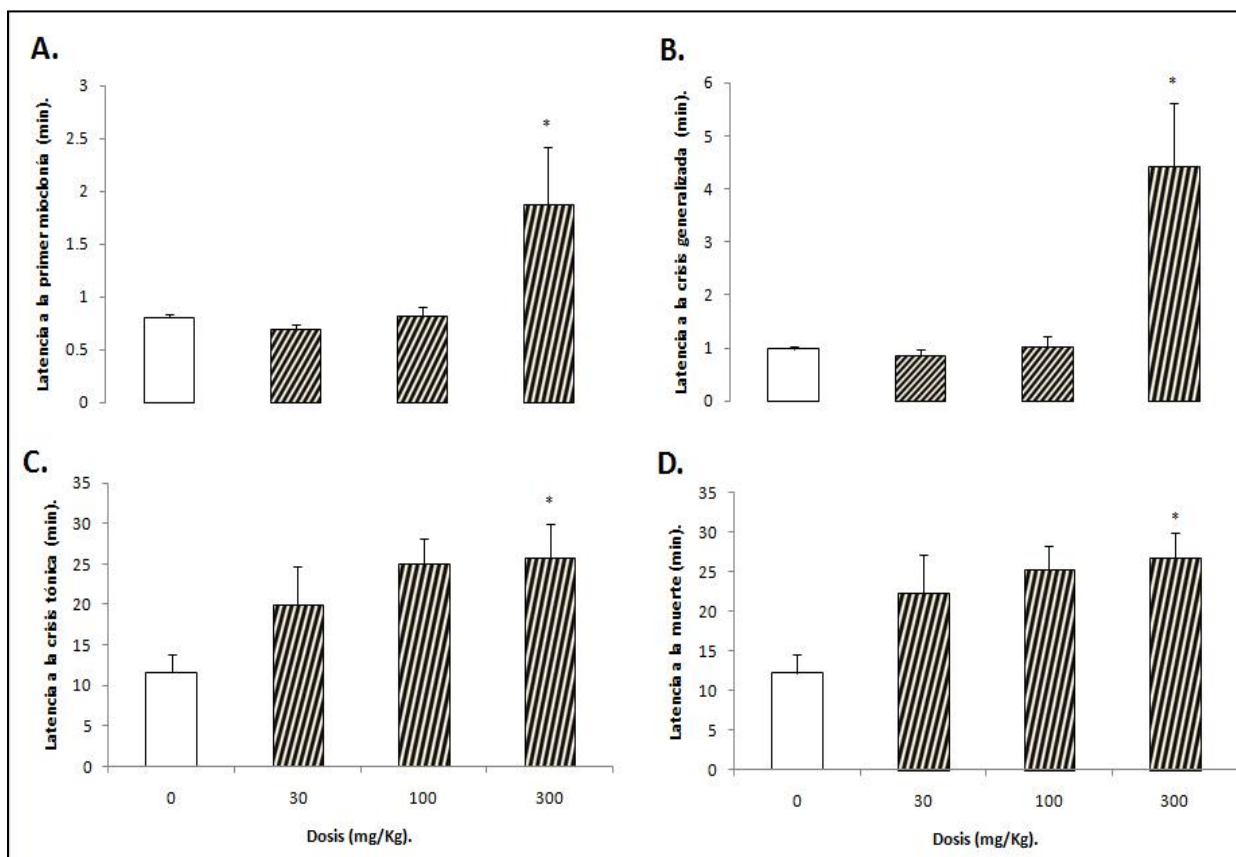


Figura 24. Evaluación de la actividad anticonvulsiva del flavonoide rutina (30, 100 y 300 mg/Kg, i.p.) en comparación con el grupo control en las crisis inducidas con PTZ (80 mg/Kg, i.p.). En el gráfico se muestra la latencia a la 1er. mioclonía (A), la latencia a la 1er. crisis generalizada (B), la latencia a la 1er. crisis tónica (C) y la latencia a la muerte (D). Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$ , ANDEVA vs. control.

#### 6.4 PRESENCIA DE COMPONENTES DE NATURALEZA FLAVONOIDE EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *ANNONA*.

En la figura 25 se observa que todas las muestras de los extractos, a excepción de la decocción de la *A. cherimolia* y *A. reticulata*, presentan una mancha en común con valor de  $R_f$  similar al obtenido para rutina (Tabla 6). Mientras que su aglicona quercetina se desplazo con el frente del disolvente.

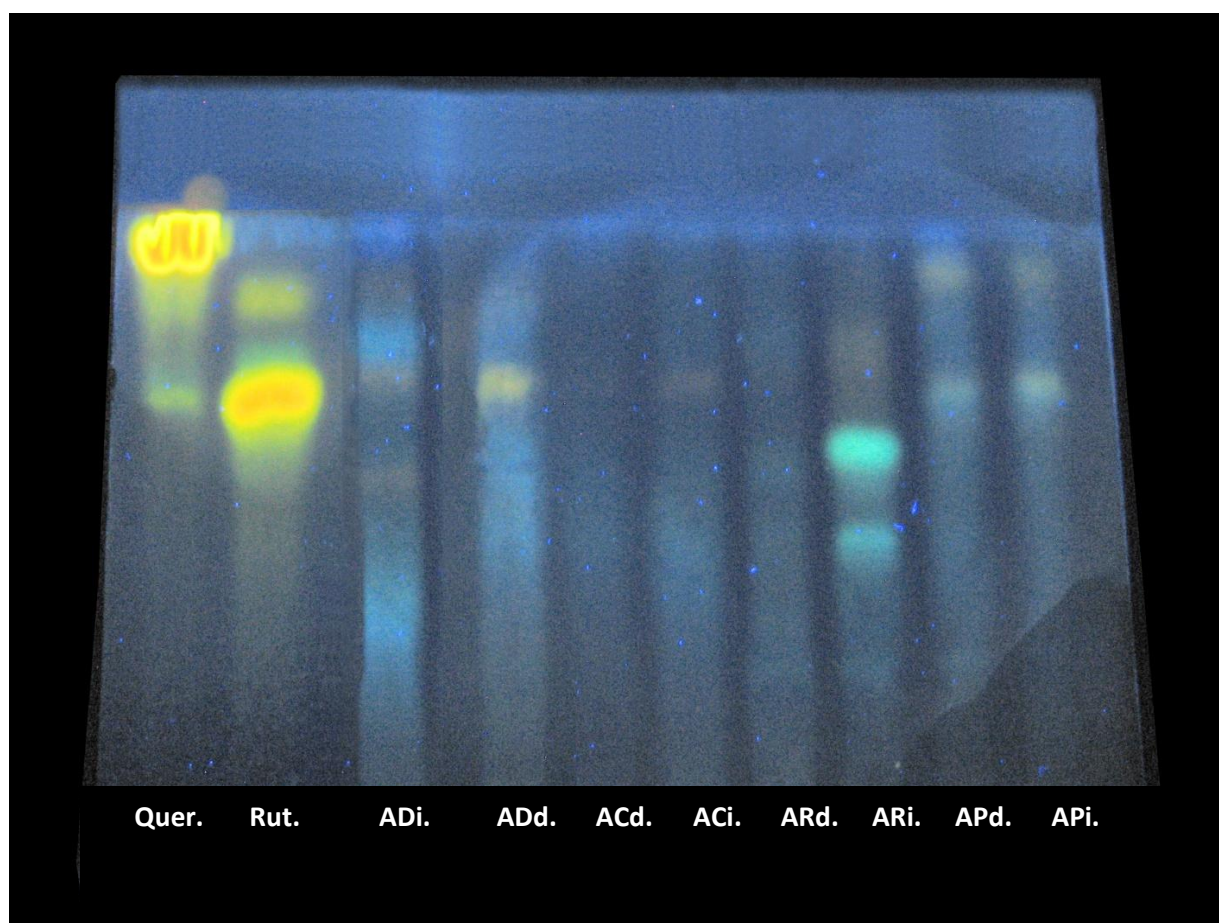


Figura 25. Cromatografía en capa fina de extractos acuosos de especies del género *Annona* obtenidos por infusión y por decocción: quercetina (Quer), rutina (Rut), infusión *A. diversifolia* (ADi), decocción *A. diversifolia* (ADd), decocción *A. cherimolia* (ACd), infusión *A. cherimolia* (ACi), decocción *A. reticulata* (ARd), infusión *A. reticulata* (ARi), decocción *A. purpurea* (APd) e infusión *A. purpurea* (Api) después de la derivatización con el revelador para flavonoides NPR.

Tabla 6. Valores de  $R_f$  correspondiente a la placa mostrada en la figura 25.

Muestra.	Valor de $R_f$ .
ADd.	0.62
ADi.	0.63
ACi.	0.62
ARi.	0.65
APd.	0.60
APi.	0.60
Quer.	1.00
Rut.	0.63

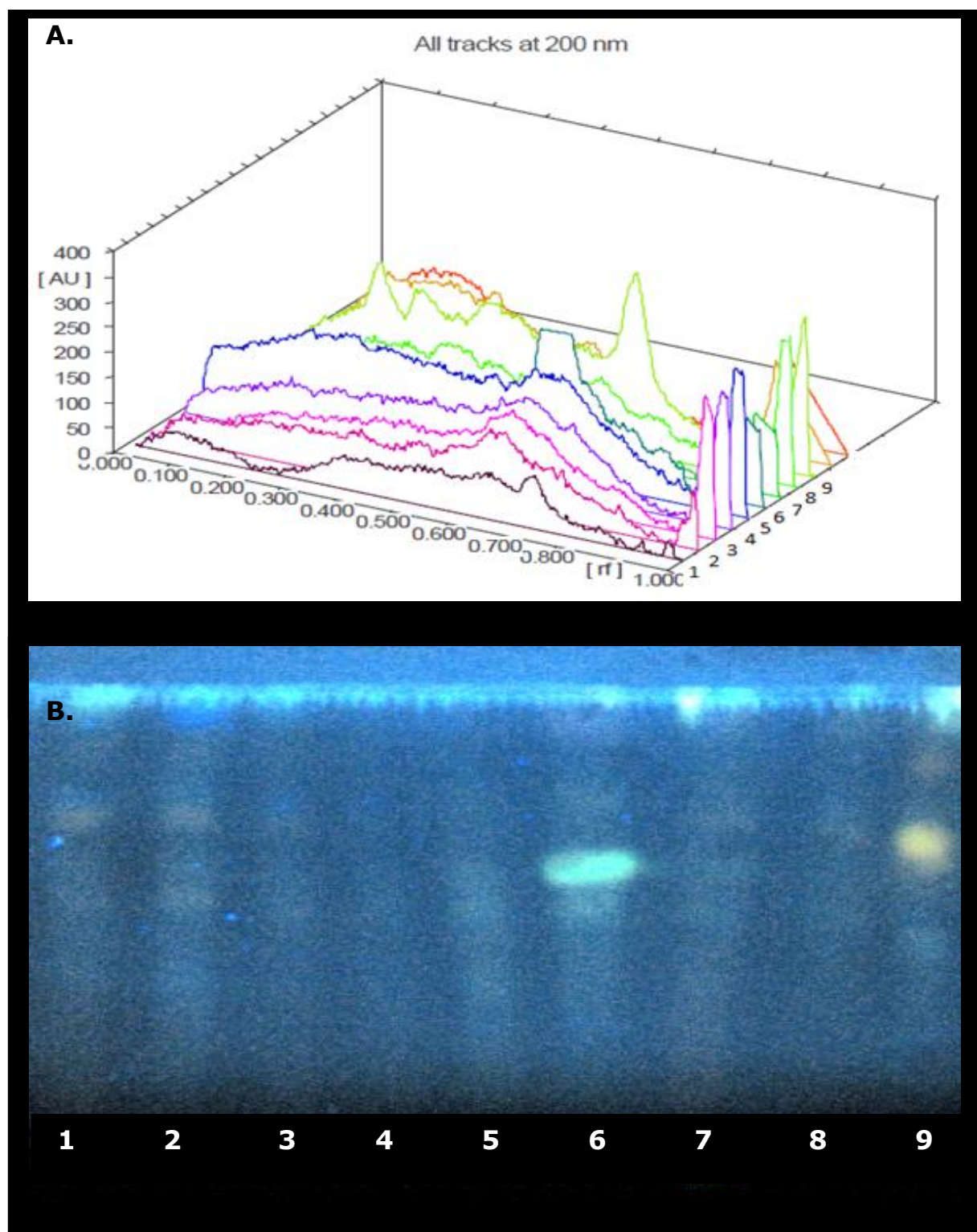


Figura 26. Intensidad de la absorción a una longitud de onda de 200 nm de extractos acuosos de especies del género *Annona* (A), los cuales fueron observados mediante CCF (B): decocción *A. diversifolia* (1), infusión *A. diversifolia* (2), infusión *A. cherimolia* (3), decocción *A. cherimolia* (4), decocción *A. reticulata* (5), infusión *A. reticulata* (6), decocción *A. purpurea* (7), infusión *A. purpurea* (8) y rutina (9), después de la derivatización con el revelador para flavonoides NPR.

Tabla 7. Valores de  $R_f$  correspondientes al máximo valor de % A.

<b>Muestra.</b>	<b>Valor de <math>R_f</math>.</b>	<b>% A.</b>
<b>1</b>	<b>0.70</b>	<b>21.72</b>
<b>2</b>	<b>0.63</b>	<b>14.60</b>
<b>3</b>	<b>0.58</b>	<b>23.00</b>
<b>4</b>	<b>0.62</b>	<b>13.65</b>
<b>5</b>	<b>0.66</b>	<b>12.43</b>
<b>6</b>	<b>0.61</b>	<b>19.40</b>
<b>7</b>	<b>0.65</b>	<b>8.17</b>
<b>8</b>	<b>0.62</b>	<b>11.7</b>
<b>9</b>	<b>0.64</b>	<b>19.70</b>

En la figura 26 se muestra la intensidad de la absorción de cada uno de los extractos acuosos y los compuestos de referencia rutina, quercetina y canferol a una longitud de onda de 200 nm (A); así como la placa cromatográfica correspondiente (B). El espectro de absorción se realizó para cada uno de los extractos y los compuestos de referencia en un rango de longitud de onda de 200 -500 nm. Sin embargo, debido a que tanto los extractos como la rutina presentaron máximos de porcentaje de área en valores de  $R_f$  muy similares a la longitud de 200 nm (tabla no 6), solo se muestra en el gráfico de intensidad de la absorción (en unidades de absorbancia, AU) en función del  $R_f$  a 200 nm.

### 7. DISCUSIÓN.

En México la ansiedad y la epilepsia se han tratado frecuentemente con los remedios herbolarios, dentro de los cuales se encuentran varias especies del género *Annona* y de las cuales anteriormente se mencionó que existen algunos estudios realizados con los extractos orgánicos hexánico y/o etanólico que reportan propiedades sedantes, ansiolíticas y/o anticonvulsivas (Gill, 1948; N´Gouemo *et al.*, 1997; López-Ruvalcaba *et al.*, 2006; González-Trujano *et al.*, 1998; 2006a; 2006b; 2009; Rejón-Orantes *et al.*, 2011). A pesar de la escasa pero referida información de los efectos sobre el SNC de especies de *Annona* (Estrada, 1994), en nuestro conocimiento ninguno de los reportes da evidencia sobre el efecto de los extractos acuosos de estas especies, que es precisamente la forma de preparación como la gente las utiliza, de tal manera que el presente proyecto de tesis describe los efectos de dichos extractos preparados como infusión y decocción y de uno de los metabolitos presentes en 4 especies del género *Annona* tales como: *A. cherimolia*, *A. diversifolia*, *A. reticulada* y *A. purpurea* como las más comunes de la población mexicana, las cuales se evaluaron utilizando diferentes modelos experimentales como sigue:

Para evaluar los efectos ansiolíticos y/o sedantes se utilizaron tres modelos validados y ampliamente descritos en la literatura para determinar actividad depresora sobre el SNC, principalmente para sustancias ansiolíticos-sedantes (Prut y Belzung, 2003; Martínez *et al.*, 2006; Ugalde *et al.*, 2005). Primeramente el modelo del campo abierto ("*open-field test*", (Hall, 1934)) permite observar la actividad locomotora de los ratones, cuyo aumento en el tiempo que los roedores pasan en un solo cuadrante del aparato sin modificación de la locomoción total o una disminución en el número de cruzamientos de las líneas marcadas en la superficie y de la actividad vertical son indicadores de un efecto ansiolítico y sedante (Prut y Belzung,



2003). El efecto de fármacos depresores del SNC y sus mecanismos de acción ha sido reportado utilizando el modelo de campo abierto y adicionalmente el modelo del tablero con orificios (Pérez-Ortega *et al.*, 2008). Martínez y cols. (2006) entre otros (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007; Pérez-Ortega *et al.*, 2008) reportaron que una disminución en la conducta de "head-dipping" es observada comúnmente con la administración de fármacos ansiolíticos. Sin embargo, Crawley (1985) reportó que es posible observar un aumento en dicha conducta después del tratamiento con fármacos ansiolíticos sugiriendo que el tipo de especie y el nivel de estrés de los animales utilizados en el estudio podría ser un factor en la respuesta conductual en el modelo. Con la finalidad de corroborar los efectos ansiolíticos y/o sedantes se trabajó también el modelo de exploración en cilindro (Hiller y Zetler, 1996; Oliva *et al.*, 2004; Ugalde *et al.*, 2005). En este modelo, debido al espacio limitado al que se expone al ratón, éste manifiesta su conducta de ansiedad mediante la exploración vertical del cilindro al colocar sus extremidades anteriores sobre la pared de vidrio denominadas levantamientos o erguimientos, donde la disminución en el número de levantamientos espontáneos implica un efecto ansiolítico y/o sedante (Martínez *et al.*, 2006; González-Trujano *et al.*, 2006; Aguirre-Hernández *et al.*, 2007; Pérez-Ortega *et al.*, 2008). En general, la disminución significativa de la actividad ambuladora del ratón en el modelo de campo abierto sugiere una actividad depresora mayor a la que un fármaco ansiolítico podría producir, sugiriendo un efecto ansiolítico y sedante. Dicho efecto se corrobora con la disminución significativa en la conducta en los modelos de exploración de orificios y levantamientos en el cilindro, los cuales permiten además conocer y comparar la eficacia de los tratamientos de prueba en comparación con la de uno o más ansiolíticos de referencia.

Los resultados del estudio de las diferentes especies de *Annona* probadas demuestran que tanto la preparación en infusión como en decocción de cada

uno de los extractos produce disminución significativa en las diferentes conductas evaluadas en comparación con el control desde la administración i.p. de la dosis de 30 mg/Kg. Esta disminución no sólo se observa en los modelos de exploración sino también en el modelo de campo abierto, lo cual sugiere que todos los extractos evaluados poseen actividad sedante. Estos efectos son parecidos a los observados con el fármaco de referencia buspirona en la dosis de 10 mg/Kg. La buspirona es un agonista parcial de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, ampliamente utilizado como ansiolítico con un efecto sedante poco apreciable (Rang *et al.*, 2003). Por lo que es posible sugerir que los extractos acuosos exhiben actividad como ansiolítico en dosis bajas que conforme se incrementan promueven el efecto de sedación.

De manera preliminar se realizó, mediante cromatografía en capa fina, el análisis de la presencia de componentes de tipo flavonoide y para ello se utilizó como referencia de flavonoides a la rutina. Este flavonoide nos permitió corroborar que el revelado era específico para éste tipo de compuestos y además nos permitió analizar si existía la presencia del mismo en las muestras evaluadas. Nuestra placa reveló positiva a contenido de flavonoides de acuerdo con los diferentes valores de R<sub>f</sub>, entre los cuales se encontró que efectivamente la rutina, como estándar de referencia, corre con un R<sub>f</sub> de 0.64 y que es parte de los metabolitos que se presenta en todas las muestras de las anonas estudiadas. Se sabe que los extractos acuosos al ser de naturaleza polar permitirán extraer en su mayoría componentes de tipo polar. Los flavonoides constituyen una familia relativamente diversa de moléculas aromáticas que son derivadas de fenilalanina y malonil-CoA. A lo largo de esta vía pueden formarse muchos productos tales como los flavonoles, los flavandioles, las antocianidas, las proantocianidinas (taninos) y una serie de otros polifenoles diferentes (Kodan *et al.*, 2002) Además de funcionar como pigmentos en flores, frutos, semillas y hojas, los flavonoides también tienen un papel clave en la



señalización entre las plantas y los microbios, en defensa como agentes antimicrobianos, en la disuasión de la alimentación en algunos parásitos, en la protección contra los rayos UV (Pietta *et al.*, 2000) y como productos naturales con actividad terapéutica (Winkel, 2001).

La presencia de rutina se observó en las placas de CCF como posible constituyente, lo cual se refuerza con una publicación reciente de *Annona squamosa* en la que se describe la presencia de éste flavonoide (Desai *et al.*, 2011) como uno de los posibles compuestos activos, tanto en la preparación por infusión como por decocción, el efecto de la rutina se evaluó en los diferentes modelos y se observó que produce efecto como ansiolítico en un rango de dosis de 20 a 100 mg/kg y como sedante en la dosis de 300 mg/Kg. Estos datos sugieren que la rutina es responsable parcial de la actividad como ansiolítico-sedante de los extractos acuosos de las especies de *Annona* evaluadas. Al revisar en la literatura se encontró que estudios previos han reportado la actividad depresora del SNC para la rutina (Viola *et al.*, 1995; Paladini *et al.*, 1999).

Por otra parte, la administración de los diferentes extractos identificados en los modelos con actividad depresora del SNC como ansiolítico-sedantes es capaz de provocar la potenciación en la actividad depresora conocida para el pentobarbital sódico (42 mg/kg, i.p.) (González Trujano *et al.*, 1998) al aumentar significativamente la hipnosis inducida en los ratones desde la dosis de 30 mg/Kg. Incluso, en el caso de la *A. reticulata* se observó un inicio más rápido en el efecto sedante y con la *A. cherimolia* en 100 mg/kg el efecto hipnótico inducidos con el pentobarbital al reducir significativamente la latencia de sedación y de hipnosis, respectivamente. El pentobarbital sódico pertenece al grupo de los barbitúricos, los cuales son derivados de la malonil urea (ácido barbitúrico) cuyo mecanismo depresor involucra la facilitación de las acciones del aminoácido inhibidor GABA, al

unirse a su receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> y aumentar la duración de apertura del canal del ión cloruro en múltiples regiones del SNC (Brunton, 2006), aunque cabe señalar que los barbitúricos son pocos selectivos en sus efectos ya que deprimen acciones de los neurotransmisores excitadores y ejercen efectos no sinápticos en la membrana en paralelo con la neurotransmisión del GABA, esto puede explicar la capacidad de producir anestesia clínica completa, con efectos centrales muy pronunciados que dan como resultado su estrecho margen terapéutico (Mendoza, 2008). Los efectos de reducción en la latencia a la sedación e hipnosis y, principalmente el aumento en el tiempo de duración del efecto del pentobarbital sódico corroboran los efectos depresores de los extractos acuosos de las diferentes especies de *Annona* probadas.

Después de corroborar la actividad depresora, se evaluó el efecto de los extractos sobre la excitabilidad inducida por PTZ, que es posible observar conductualmente manifestada en los ratones como convulsiones de tipo mioclonia, clónico-tónico y tónica; ésta última al producir depresión respiratoria también puede provocar la muerte. En esta prueba se observó que todos los extractos producen incremento significativo en la latencia a la primer mioclonia, a la primer crisis generalizada (clónico-tónica), y a la crisis tónica inducidas en presencia del agente convulsivante PTZ, un antagonista no selectivo del receptor GABA<sub>A</sub>. El cual de acuerdo con Pellar y Wilson (1977) reduce principalmente la conductancia del ión cloruro y en menor medida las de los iones potasio y sodio. Con el retardo del inicio de las crisis se corrobora que los extractos acuosos también poseen actividad anticonvulsiva. En la literatura se reporta que los habitantes de distintos lugares en África, la India (Nadkarmi *et al.*, 2000), e incluso en México (González-Trujano *et al.*, 1998) usan las hojas de diferentes especies de *Annona* para controlar las convulsiones y la epilepsia, preparadas en infusión, decocción o incluso en vinagre (Estrada, 1985). En la India los

médicos rurales piden a los pacientes con epilepsia mascar las hojas de *A. squamosa* para controlar las convulsiones (Nadkarmi *et al.*, 2000; Porwat y Sharma, 2011). Y aunque diversos estudios indican que los extractos etanólico y hexánico de las hojas de algunas especies producen actividad anticonvulsiva en roedores. Ninguno ha descrito la actividad y los metabolitos responsables de la actividad de los extractos acuosos.

La actividad anticonvulsiva de los extractos fue similar a la producida por la ethosuximida, un antiepiléptico de uso frecuente en la clínica para tratar la epilepsia de pequeño mal, y con la de la rutina (300 mg/kg) que posiblemente participa en combinación con otros constituyentes de la planta para producir los efectos anticonvulsivos del extracto acuoso.

**8. CONCLUSIÓN.**

Los resultados del presente proyecto de tesis validan el uso de especies del género *Annona* como ansiolítico-sedantes y anticonvulsivos, usados en la medicina tradicional. Además, se describe que el flavonoide rutina es uno de los metabolitos activos que participa parcialmente en la actividad atribuida a estas cuatro especies.

### 9. PERSPECTIVAS.

El presente estudio farmacológico corrobora el efecto depresor sobre el SNC, de los extractos acuosos de cuatro especies del género *Annona*; esto permite considerar a dichas especies como candidatas para estudios que conlleven aislar compuestos puros de utilidad terapéutica en las afecciones de este sistema. Los estudios a proponer son:

- Caracterización e identificación de los compuestos activos contenidos en los extractos acuosos de las hojas de las especies evaluadas.
- Cuantificación del contenido de rutina en cada una de las muestras mediante HPLC.
- Búsqueda de los de los mecanismos de acción de los compuestos activos.
- Búsqueda de otras actividades terapéuticas.

### 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADAMS R., VICTOR M., ROPPER., 1999, A. Epilepsia y otros trastornos convulsivos. Manual de principios de neurología. 6ª ed. México, Editorial Interamericana McGraw-Hill, 9: 275-302.

AGUIRRE-HERNÁNDEZ E, MARTÍNEZ AL, GONZÁLEZ-TRUJANO ME, MORENO J, VIBRANS H, SOTO-HERNÁNDEZ M., 2007. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1):140-145

ARGYROPOULOS S., SANDFORD J., NUTT D. 2000. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 2: pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacology & Therapeutics*, 88: 213-227.

BAZYZAN A., ZHULIN V., KARPOVA M., KLISHINA N., GLEBOV R., 2001. Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylentetrazole challenge. *Brain Research*, 888: 212-220.

BENASSINI O., 2001. La atención psiquiátrica en México hacia el siglo XXI. *Salud Mental*, 24 (6): 54-55.

BERG A., BERKOVIC S., BRODIE M., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51: 676-685.

BILKEI-GORZÓ A., GYERTYÁN I., 1996. Some doubts about the basic concept of hole-board test. *Neurobiology (Bp)*, 4:405-415.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- BOISSIER R., SIMON P., 1962. La reaction d'exploration chez la souris. *Therapie*, 17: 1225-1232.
- BRADFORD H., 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress in neurobiology*, 47: 477-511.
- BRUNO V., BATTAGLIA G., COPANI A., 2001. Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes as Targets for Neuroprotective Drugs. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21: 1013-1033.
- CARBALLO A., MARTÍNEZ A., GONZÁLEZ-TRUJANO M., PELLICER F., VENTURA-MARTÍNEZ R., DÍAZ-REVAL I., LÓPEZ-MUÑOZ F., 2010. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. *Pharmacology, Biochemical and Behavior*, 95(1):6-12.
- CLARK K., PERSON A., 1997. Exploratory behaviour in chronic disulfotam poisoning in mice. *Psychopharmacologia (Berl)*, 20: 169 -171.
- CRAWLEY J., 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9: 37-44.
- DE DEYN P., MARESCAU B., MACDONALD R., 1990. Epilepsy and the GABA-hypothesis a brief review and some examples. *Acta Neurologica Belgica*, 90(2):65-81.
- D'HOOGHE R., DE DEYN P. P., VAN DE VIJVER G., ANTOONS G., RAES A., 1999. Uraemic guanidine compounds inhibit g-aminobutyric acid-evoked whole cell currents in mouse spinal cord neurones. *Neuroscience Letters*, 265: 83-86.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- DESAI N., BARHATE C., BIYANI S., KULKARNI S., NAGARSENKER M., 2011. Quantitative Analysis of Flavonoids in *Annona squamosa* Leaf Extracts and its Pellet Formulation by Validated High Performance Thin-Layer Chromatographic Technique. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 24: 306-311.
- DINGLEDINE R., BORGES K., BOWIE D., TRAYNELIS S., 1999. The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 51: 8-61.
- ENGEL J., 2006. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*, 70: 5-10.
- ENGELBORGHS S., D'HOOGHE R., DE DEYN P., 2000. Pathophysiology of epilepsy. *Acta Neurologica Belgica*, 100: 201-213.
- EKONOMOU A., SMITH A., ANGELATOU F., 2001. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylentetrazole-induced "kindling" model of epilepsy. *Molecular Brain Research*, 95: 27– 35.
- ESTRADA A., 1994. Caracterización de la Ilama (*Annona diversifolia* Saff) en Salitre Palmerillos, Mpio. de Amatepec. Edo. De México. Tesis.
- FISHER R., 1989. Animal models of the epilepsies. *Brain Research Reviews*, 14: 245– 278.
- FISHER R., BOAS W., BLUME W., ELGER C., GENTON P., LEE P., ENGEL J., 2005. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4):470–472.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- FOLLESA P., TARANTINO A., FLORIS S., MALLEI A., PORTA S., TULIGI G., CAGETTI E., CADDEO M., MURA A., SERRA M., BIGGIO G., 1999. Changes in the gene expression of GABA-A receptor subunit mRNAs in the septum of rats subjected to pentylentetrazol-induced kindling. *Molecular Brain Research*, 70: 1-8.
- GETOVA D., FROESTL W., BOWERY N., 1998. Effects of GABA-B receptor antagonism on the development of pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Brain Research*: 809: 182– 188.
- GEURTS F, 1981. *Annonaceous Fruits*. Royal Tropical Institute, Amsterdam, the Netherlands: 16 pp.
- GILL R, 1948. Curariform drug, *Brit.*619: 7.
- GONZÁLEZ-TRUJANO M., NAVARRETE A., REYES B., HONG E., 1998. Some Pharmacological Effects of the Ethanol Extract of Leaves of *Annona diversifolia* on the Central Nervous System in Mice. *Phytotherapy Research*. 12: 600-602.
- GONZÁLEZ-TRUJANO M., NAVARRETE A., REYES B., CEDILLO-PORTUGAL E., HONG E., 2001. Anticonvulsant Properties and Bio-Guided isolation of palmitone from Leaves of *Annona diversifolia* Saff. *Planta Medica*. 67: 136-141.
- GONZÁLEZ-TRUJANO M., MARTÍNEZ A., REYES-RAMÍREZ A., NAVARRETE A., REYES-TREJO B., 2006A. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces anxiolytic like effect in mice. *Planta Medica* 72(8): 703-707.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- GONZÁLEZ-TRUJANO M., TAPIA E., LÓPEZ-MERAZ L., NAVARRETE A., REYES-RAMÍREZ A., MARTÍNEZ A., 2006B. Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia* 47(11): 1810-1817.
- GONZÁLEZ-TRUJANO M., LÓPEZ-MERAZ L., REYES-RAMÍREZ A., AGUILLÓN M., MARTÍNEZ A., 2009. Effect of repetitive administration of the *Annona diversifolia* Saff. extracts and palmitone on rat amygdala kindling, EEG and behavior. *Epilepsy and Behavior*, 16: 590-595.
- HALL C., 1934. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18: 385- 403.
- HARA M., SASA M., KAWABATA A., SERIKAWA T., YAMADA T. *et al.*, 1993, Decreased dopamine and increased norepinephrine levels in the spontaneously epileptic rat, a double mutant rat. *Epilepsia*, 34: 433-440.
- HILLER K., ZETLER G., 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis*: behavioral and anticonvulsive properties. *Phytotherapy Research* 10, 145-151.
- HOLLMANN M., HEINEMANN S., 1994. Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17: 31-108.
- ILAE, 1989. Commission on Classification and Terminology on the International Against Epilepsy: Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30: 389-399.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- INY L., PECKNOLD J., SURANYI B., 1994. Studies of a neurochemical link between depression, anxiety, and stress from [3h] imipramine and [3h] paroxetine binding on human platelets. *Biological Psychiatry*, 36: 281 -91.
- KERRY J., NEMEROFF M., 2000. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, 12: 2-19.
- KODAN ATSUSHI., KURODA HIROYUKI., SAKAI FUKUMI., 2002. A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 3335 – 3339.
- KRAUSS, G., KAPLAN P., FISHER R., 1989. Parenteral magnesium sulfate fails to control electroshock and pentylentetrazol seizures in mice. *Epilepsy Research*, 4: 201-206.
- KUPFERBERG, H., 2001. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 42 (Suppl. 4): 7 –12.
- LASON W., TURCHAN J., PRZEWLOCKA B., LABUZ D., MACHELSKA H., PRZEWLOCKI R., 1998. Effects of pentylentetrazol kindling on glutamate receptor genes expression in the rat hippocampus. *Brain Research*, 785: 355– 358.
- BRUNTON L., BRUCE C., BJORN k., 2006. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS*. 12a ed. McGraw-Hill, 20: 593-594.
- LEÓN J, 1987. *Botánica de los Cultivos Tropicales*. IICA, San José, Costa Rica.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- LYDIARD B., BIELSKI R., TOBIAS K., 2003. The efficacy of pregabalin in treating psychic and somatic symptoms in generalized anxiety disorder (GAD). *European Neuropsychopharmacology*, 13 (Suppl 4):S377, 3.055.
- LÓPEZ M., NAVARRO J., 1997. Actualización de los receptores gabaérgicos: complejo macromolecular GABAA/v/C1. *Psiquiatría Biológica*, 4(3).
- LOPEZ-RUBALCAVA, C; PINA-MEDINA, B; ESTRADA-REYES, R; HEINZE G; MARTINEZ-VAZQUEZ M., 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences*, 78 (7): 730-737.
- MACDONALD L., KELLY M., 1995. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*, 36 Suppl. 2: S2-12.
- MALIZIA, A. L., CUNNINGHAM, V. J., BELL, C. M., 1998. Decreased brain GABA<sub>A</sub>—benzodiazepine receptor binding in panic disorder: preliminary results from a quantitative PET study. *Archives of General Psychiatry*, 55: 715-720.
- MEANA J., BARTUREN F., GARCÍA-SEVILLA J., 1992.  $\alpha$ 2-Adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biological Psychiatry*, 31:471–490.
- MARTÍNEZ A., DOMÍNGUEZ F., OROZCO S., CHÁVEZ M., SALGADO H., GONZÁLEZ M., GONZÁLES-TRUJANO M., 2006. Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. Leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 250-255.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- MAYBERG H. S., SADZOT B., MELTZER C. C., FISHER R. S., LESSER R. P., 1991. Quantification of mu and non-mu opiate receptors in temporal lobe epilepsy using positron emission tomography. *Annals Neurology*, 30: 3-11.
- MELDRUM B., 1994. Epileptic seizures. In: *Basic Neurochemistry* 5th edition. SIEGEL G.J., AGRANOFF B. W., ALBERS R. W., MOLINOFF P. B. (eds.). New York, Raven Press, 1994, 885-898.
- MENDOZA., 2008. *Farmacología Médica*. Ed. Panamericana, 2: 308.
- MORI A., HIRAMATSU M., NAMBA S., NISHIMOTO A., OHMOTO T., 1987. Decreased dopamine level in the epileptic focus. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*, 56: 157-164.
- MYCEK M., HARVEY R., CHAMPE P., 2006. *Farmacología* 2a ed. McGraw-Hill Interamericana, 105; 15: 171.
- NADKARNI A., 2000. In *Indian Materia Medica*, Vol. I. Popular Prakashan Ltd Mumbai India: 116.
- N'GOUEMO P., KOUDOGBO B., TCHIVOUNDA P., NGUEMA A., ETOUA M., 1997. Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylenetetrazol-induced convulsive seizures in mice. *Phytotherapy Research*, 11: 243-245.
- OCHSE J., SOULE J., DIJKMAN M., WEHLBURG C., 1974. "Otros Cultivos Frutales." In: *Cultivo y Mejoramiento de Plantas Tropicales y Subtropicales*. Ed. Limusa: 587-518.
- OLIVIA I., GONZÁLEZ M., ARRIETA J., ENCISO R., NAVARRETE A., 2004. Neuropharmacological profile of hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* procera roots in mice. *Phytotherapy Research* 18, 290-296.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- PALADINI A., TEPPER J., 1999. GABAA and GABAB antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons *in vivo*. *Synapse*, 32:165–176.
- PELLMAR T., WILSON W., 1977. Synaptic mechanism of pentylentetrazole: selectivity for chloride conductance. *Science*, 197: 912– 914.
- PÉREZ-ORTEGA G, GUEVARA-FEFER P, CHÁVEZ M, HERRERA J, MARTÍNEZ A, MARTÍNEZ AL, GONZÁLEZ-TRUJANO ME. 2008. Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 461-468.
- PIETTA P., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Natural Products* 63(7): 1035–1042.
- PINTO A., CORDEIRO M., ANDRADE S., FERREIRA F., 2005. *Annona* species. International centre for under utilised crops, University of Southampton SO17 1BJ, UK.
- PORWAL, M. y SHARMA K., 2011. Evaluation of anticonvulsant activity of *Annona Squamosa* linn. leaves in mice. *Journal of Cell and Tissue Research* 11(2):2879-2884.
- PRZEWLOCKA B., LASON W., MACHELSKA H., VAN LUIJTELAAR G., COENEN A. *et al.*, 1995. Kappa opioid receptor agonists suppress absence seizures in WAG/Rij rats. *Neuroscience Letters*, 186: 131-134.
- PRUT L., BELZUNG C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, 463: 3-33.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- RAMANJANEYULU, R., TICKU M., 1984. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *European Journal of Pharmacology*, 98: 337-345.
- RANG H., DALE M., RITTER J., MOORE P., 2003. *Farmacología* 5a ed. Elsevier, 32: 462-471.
- ROCHA L., ACKERMANN R., ENGEL J., 1996. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy Research*, 24: 65- 72.
- RUÍZ S., MORETT A., 1997. Las Annonas en el México Prehispánico. *Memorias Congreso Internacional de Anonáceas*. Chapingo, Estado de México. 12-14 noviembre. 169-186.
- SAVIC I., SVANBORG E., THORELL J., 1996. Cortical benzodiazepine receptor changes are related to frequency of partial seizures: a positron emission tomography study. *Epilepsia*, 37: 236-244.
- SCHILDKRAUT J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American Journal of Psychiatry*, 122:609-22.
- SCHROEDER H., BECKER A., HOELLT V., 1998. Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylenetetrazole-kindled rats. *Experimental Brain Research*, 120: 527-530.
- SEVY S., PAPADIMITRIOU G., SURMONT D., GOLDMAN S., MENDLEWICZ J., 1989. Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects. *Biological Psychiatry*, 25:141-152.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- SINGER A., CROWLEY D., THOMPSON I., 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*, 21: 123 – 130.
- SNEAD O. C. III., 1995. Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Annals of Neurology*, 37: 146-157.
- 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. *European Journal of Pharmacology*, 350: 21–29.
- TANJA M., ULRIKE Z., JÜRGEN M., 2007. Epidemiology of anxiety disorders. *Psychiatry*, 6: 136-142.
- TIIHONEN J., KUIKKA J., RASANEN P., 1997. Cerebral benzodiazepine receptor binding and distribution in generalized anxiety disorder: a fractal analysis. *Molecular Psychiatry*, 6: 463-471.
- UGALDE M., REZA V., GONZÁLEZ M., BHARATHI A., KHAN I., NAVARRETE A., 2005. Isobolographic analysis of sedative interaction between six central nervous system drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57: 1-9.
- VILLAMAR A., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 3 vols., Instituto Nacional Indigenista (INI), Mexico.
- WALSH L., LI M., ZHAO T., CHIU T., ROSENBERG H., 1999. Acute pentylentetrazol injection reduces rat GABAA receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine binding site density. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289: 1626– 1633.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

WINKEL B., 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485–493.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epilepsy. WHO Factsheet, 2011: number 999.

YUSTA A., 2005. Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. *Emergencias*, 17: (S68-S73).

**APÉNDICE A.**

**COMPONENTES QUÍMICOS COMUNES ENCONTRADOS EN ANNONAS**

Tabla 10. Algunos de los más comunes compuestos químicos encontrados en diferentes partes de la *Annona cherimolia*, *A. reticulata*, *A. muricata*, *A. senegalensis* y *A. esquamosa*.

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
<b>Acetogeninas.</b>						
4-deoxyannoreticuín	Hopp et al., 1998					c
Alumunequin	Cortés et al., 1993b; Duret et al., 1994	r, s				
Annocherin	Woo et al., 2000	s				
Annogalene	Sahpaz et al., 1996	s				
Annoncherimolin	Kim et al., 2001	s				
Annomolin	Kym et al., 2001	s				
Annomonicin	Chang et al., 1993		h			
Annomuracins A, B	Wu et al., 1995 a c			h		
Annomuracin E	Kym et al., 1998			h		
Annonacin 10 one	Wu et al., 1995 a c; Rieser et al., 1996			h,s		
Annonacin A	Wu et al., 1995 a c			s		
Annomuricatin B cyclopeptide	Vhao-Ming et al., 1998			s		

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Annonastatin	Nonfon et al., 1990					s
Annopentocin A, B, C	Zeng et al., 1996			h		
Annorecticuin	Chang et al., 1993; Chang et al., 1998		h,s			
Annorecticuin 9	Hopp et al., 1997					C
Annorecticuin 9 one	Chang et al., 1993; Chang et al., 1998		h,s			
Annosenegalin	Sahpaz et al., 1996				s	
Annosquamosins A, B cyclopeptides	Chao-Ming et al., 1997					C
Anonacins	Nonfon et al., 1990					S
Anonins	Nonfon et al., 199 ; Pinto & Silva, 1994		s	h,s		S
Arianacin	Reiser, 1996			s		
Aromin A	Chen et al., 1999	t,h,s				
Asimicin	Nonfon et al., 1990					S
Bullatacin	Li et al., 1990; Hernandez & Angel, 1997; Hang et al., 1999		s			C,S
Bullatacinone	Li et al., 1990; Duret et al., 1994; Hernandez & Angel, 1997	r				C,S
Chermolin 1	Cortés et al., 1993 b	s				

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Cherimolin 2	Cortés et al., 1993 b	s				
Cis-4-deoxyannoreticuín	Hopp et al., 1998					C
Cis-annonacin	Reiser, 1996; Woo et al., 1999 a			s		
Cis-annoarin 10 one	Reiser, 1996			s		
Cis-and trans annomuricin C,D,E	Kim et al., 1998 a			h		
Cis-goniothalamycin	Wu et al., 1995 c; Rieser, 1996			h,s		
Cis,trans-bullatacinone	Chang et al., 1998		s			
Cis,transisomurisolenin	Chang et al., 1998		s			
Cis,trans-murisolinone	Chang et al., 1998		s			
Cyclopeptide muricatonins A,B	Wu et al., 1995 c			s		
Donhexocin	Yu et al., 1998			s		
Epomuricenins A,B	Roblot et al., 1993			s		
Gigantetrocin A	Wu et al., 1995 c			h,s		
Isoannoreticuín	Chang et al., 1993		h			
Isocherimolin 1	Duret et al., 1994	r				
Isomolvizarin 1	Duret et al., 1994	r				
Isomolvizarin 2	Duret et al., 1994	r				
Javoricin	Reiser, 1996			s		

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Liriodenine	Philipov et al., 1994			s		
Laherradurin	Cortés et al., 1993 b	s				
Molvizarin	Hishamet al., 1994		ct			
Muricapentocin	Kim et al., 1998 a			h		
Muricatocins A,B,C	Wu et al., 1995 c			h		
Muricin	Pinto &Silva, 1994			t,h,s		
Muricinin	Pinto &Silva, 1994			s		
Muricatetrocins A,B	Wu et al., 1995 b			h,s		
Muricoreacin	Kim et al., 1998 b			h		
Murihexocin C	Kim et al., 1998 b			h		
Murihexol	Yu et al., 1998			s		
Otivarin	Cortés et al., 1993 a	s				
Panatellin	Gleye et al., 1998			r		
Reticulatacin	Gleye et al., 1998			r		
Reticulatacin 10 one	Gleye et al., 1998			r		
Reticulacinone	Hisham et al., 1994		ct			
Rolliniastatin	Chang et al., 1993		H			
Rolliniastatin 2	Hisham et al., 1994		ct			
Sabedelin	Gleye et al., 1998			r		
Solamin	Myint et al., 1991; Chang et al., 1993; Gleye et al., 1998		h,s	r,s		

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Squamocin	Duret et al., 1994; Hernandez & Angel, 1997	R	s			S
Squamone	Li et al., 1990; Chang et al., 1993		h			C
Squamotacin	Hopp et al., 1996					C
Uvariamicin I	Gleye et al., 1998			r		
Uvariamicin IV	Gleye et al., 1998			r		
2,4-cis, trans- annocherinone	Woo et al., 2000	s				
2,4-cis, trans- isoannonacin	Wu et al., 1995 b; Woo et al., 1999 a	s		h		
2,4-cis, trans- squamoxinone	Hopp et al., 1997					C
2,4-cis, trans-mosinone A	Hopp et al., 1997					C
<b>Alcaloides.</b>						
(-) Roemerine	Bhakuni et al., 1972; Oliver-Bever, 1986; Cassady, 1990; You et al., 1995; Chuliá et al., 1995; Fatope et al., 1996	r	h,s		H	H
Anonaine	Yang & Chen, 1970; Bhakuni et al., 1972; Fresno & Cañavate, 1983; Bridg, 1984.	r,ct,h,p ,c,s	r,c	h	r,h,c	r,h,c

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Aporphine	Cassady, 1990; Salluja et al., 1990; Maeda et al., 1993; Chuliá et al., 1995; You et al., 1995; Fatope et al., 1996	r	s		H	H
Benzylloquinoline	Maeda et al., 1993		s			
Caffeine	Lizana & Reginato, 1990	s				
Corydine	Oliver-Bever, 1986		h,s			c,r,t,s
Dehydroroemerine	Chuliá et al., 1995	r				
$\alpha$ -Glucine	Oliver-Bever, 1986					c,r,t,s
Isoboldine	Philipov et al., 1995				r,h,c	
Isocorydine	Oliver-Bever, 1986					c,r,t,s
Isoquinoline	Leboeuf et al., 1981; Maeda et al., 1993		s	h,s,r, c		
Lanuginosine	Fresno & Cañavate, 1983	ct,h,p,c ,s				
Liriodenin	Fresno & Cañavate, 1983; Morton, 1987; Philipov et al., 1995	ct,h,p,c ,s	r,c	s	r,h,c	
Norcorydine	Oliver-Bever, 1986					c,r,t,s
Norisocoryline	Bhakuni et al., 1993					H
Pyrimidine- $\beta$ -carboline	Maeda et al., 1993		s			

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
<b>Otros compuestos.</b>						
$\beta$ -farnesene essential oil	Leal, 1990					h
$\alpha$ -pirene essential oil	Leal, 1990					H
$\beta$ -pirene essential oil						h
Aliphatic ketone	You et al., 1995				h	
Alkanes	You et al., 1995				h	
Alkanols	You et al., 1995				h	
Aminoacids	You et al., 1995				c	
Amyl caproic acid	Pinto & Silva, 1994			p		
Amyloids	Kooiman, 1967			s		
Annosquamosins A,B diterpenoids	Wu et al., 1996		s			f,c
Cherimoline	Chen et al., 1998	t,h				
Cherimonaine	Chen et al., 1998	t,h				
Coclamine	Khan et al., 1997			p		
Couximine	Khan et al., 1997			p		
Cohibins A,B	Gleye et al., 1997			r		
Dihydroferuloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
Diterpenes	Mukhopadhyay et al., 1993					r,ct
Ent-kaurenoides	Fatope et al., 1996				cr,t,s, c	



COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
Essential oils (others)	Bridg, 1964; MacLeod & Pieris1981; Jivoretz et al., 1998	h,s	h,r	f	f	s,h
Esthers	Idstein et al., 1984; You et al., 1995	p				
Flavonoids	Cassady, 1990; Langanson et al., 1994				h	
Geranyl caproic acid	Pinto & Silva, 1994				h	
Kaurane diterpenoids	Adeogan & Durodola, 1976; Maeda et al., 1993; Wu et al., 1996	t,h	s		c	f,r
Lactam amide	Chen et al., 1998	t,h				
Limorene essential oil	Leal, 1990					S
Monoterpenoids	You et al., 1995				h	
Murisolin	Khan et al., 1997			p		
n-trans-caffeoyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-cis-caffeoyltiramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-cis-feruloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-cysferuloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				

COMPUESTOS	REFERENCIAS	A.c.	A.r.	A.m.	A.se.	A.sq.
n-fatty acyl tryptamine	Maeda et al., 1993		s			
n-p-coumaroyltyramine	Chen et al., 1998	t				
n-trans feruloylmethoxytyramine	Chen et al., 1998	t,h				
n-trans feruloyltyramine	Chen et al., 1998	t,h				
Purine	Chen et al., 1998	t				
Reticulin	Khan et al., 1997			p		
Rhamnoside	Salluja et al., 1990					h,s
Saponins	Salluja et al., 1990; Langanson et al., 1994				H	S
Sesquiterpenoids	You et al., 1995				H	
Stepharine	Khan et al., 1997			p		
Steroids	Chen et al., 1998	t				
Sterols	You et al., 1995				H	
Tannins	Burkill, 1996; Langanson et al., 1994	h	h	p	H	
Trans orimene essential oils	Leal, 1990					S

**APÉNDICE A.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>A.c.</b>	<b>A.r.</b>	<b>A.m.</b>	<b>A.se.</b>	<b>A.sq.</b>
Volátiles (terpenes, hidrocarburos, ésteres, carbonilos).	Idstein <i>et al.</i> , 1984.	P				
Abreviaturas: r-raíces; cr-corteza de raíz; t-tallo; ct-corteza del tallo; h-hoja; f-fruta; p-pulpa; c-corteza; s-semilla.  A.c- <i>A. cherimolia</i> ; A.r- <i>A. reticulata</i> ; A.m- <i>A. muricata</i> ; A.se- <i>A. senegalensis</i> y A.sq- <i>A. squamosa</i> .						

Tomada de Pinto *et al.*, 2005.